



XI SILUBESA

Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental

28/03 a 02/04/2004 - Natal - Rio Grande do Norte - Brasil

II-016 – UMA AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE LOWRY NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES SANITÁRIOS

Adriana Cristina Poli Miwa ⁽¹⁾

Licenciada em Ciências Exatas com Habilitação em Química no ano de 2000 pela Universidade de São Paulo campus São Carlos. Mestre em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP) em 2003. Doutoranda em Hidráulica e Saneamento na EESC/USP, com início em 2003.

Patrícia Bortoletto de Falco ⁽²⁾

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos em 1997. Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental pela Universidade de São Paulo em 1999. Início do doutorado em 2000 na área de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Maria do Carmo Calijuri ⁽³⁾

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos em 1982. Mestre em Ecologia e Recursos Naturais pela mesma Universidade em 1985. Doutora em Hidráulica e Saneamento, 1988, pela Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo e Livre-docente pela mesma Universidade em 1999. Coordenadora do Programa de PG em Hidráulica e Saneamento e Presidente da Comissão de PG da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Endereço⁽¹⁾: Rua Dr. Nestor de Campos, 272 – Planalto Paraíso – São Carlos - SP - CEP: 13562-040 - Brasil - Tel: (16) 272-4705



adrimiwa@sc.usp.br

RESUMO

O uso de lagoas de estabilização para tratar esgoto doméstico tem crescido nos últimos anos e estas lagoas apresentam algumas vantagens, como baixo custo operacional e de implantação, utilização de energia solar, entre outras. As proteínas são as principais biomoléculas presentes no esgoto e são consideradas fator limitante para os processos biológicos que ocorrem nessas lagoas. Alguns métodos espectrofotométricos para determinação de proteínas foram testados anteriormente e o de Lowry mostrou-se mais adequado para amostras provenientes de lagoas de estabilização. Entretanto, a escolha deste método requer atenção para os possíveis interferentes como altas concentrações de lipídeos, cálcio, magnésio, entre outros.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo comprovar a eficiência do método de Lowry por meio da verificação da degradação da amostra em relação ao tempo de análise e da presença de substâncias interferentes em amostras provenientes de esgoto sanitário. Também foi realizada amostragem nictemeral que poderá colaborar no entendimento dos processos que ocorrem nesses sistemas.

Através da análise de degradação das amostras, observou-se aumento na concentração de proteínas a partir do terceiro dia e não foi constatada a presença de substâncias interferentes no método de Lowry. Portanto, o método de Lowry foi comprovado ser adequado para determinação de proteínas em amostras provenientes de lagoas de estabilização que tratam esgoto doméstico.

PALAVRAS-CHAVE: Lagoas de estabilização, Proteínas, Lowry, Interferentes, Amostras ambientais.

INTRODUÇÃO

A aplicação de sistemas de tratamento de água residuária que visa a prevenção da poluição ambiental deve ser conseguida, sempre que possível, com o desenvolvimento de sistemas confiáveis, simples, econômicos e de fácil operação e manutenção. Quando existe disponibilidade de grandes áreas com custo pouco significativo, as lagoas de estabilização constituem-se um processo adequado ao tratamento de esgoto sanitário. Essas lagoas suportam sobrecargas hidráulicas e orgânicas durante vários dias e utilizam energia solar em lugar de energia elétrica dos sistemas aeróbios convencionais.

As lagoas são classificadas de acordo com a concentração de oxigênio presente em função de sua profundidade, sendo divididas em anaeróbias, facultativas e aeróbias, representando o habitat de uma diversidade de organismos que se reproduzem conforme a disponibilidade de alimento. Na lagoa anaeróbia ocorre clarificação do esgoto por meio da sedimentação de sólidos e da posterior degradação biológica destes realizada no fundo da lagoa (KELLNER & PIRES, 1998). Tanto na lagoa anaeróbia como na facultativa, ocorre degradação de compostos orgânicos complexos (proteínas, carboidratos e lipídeos) por meio de vários processos, transformando-os em compostos mais simples como ácidos orgânicos voláteis, dióxido de carbono, hidrogênio, acetato e metano. Uma série de interações metabólicas ocorre entre as diversas comunidades microbianas que regulam o funcionamento desses ambientes.

As proteínas são as principais biomoléculas presentes no sistema de tratamento e nem sempre são completamente degradadas. São também os compostos responsáveis pela DQO remanescente no efluente de reatores anaeróbios tratando esgoto doméstico (TORRES, 1992). Alguns trabalhos (MACKIE & BRYANT, 1990; CONFER & LOGAN, 1997; BATSTONE *et al.*, 1997; VIDAL *et al.*, 2000) enfocaram a degradação de proteínas em águas residuárias, mas nunca em lagoas de estabilização.

Levando-se em consideração as diversas origens das águas residuárias, torna-se bastante evidente a necessidade de se proceder a estudos mais detalhados, relativos à matéria orgânica. Esses estudos referem-se a determinação de proteínas, carboidratos e lipídeos.

Os métodos para determinação de proteínas são vários, mas há necessidade de estipular um método simples e viável economicamente com análise rápida e reprodutiva. Dos métodos testados por MIWA *et al.* (2003), o de Lowry foi o mais adequado para amostras provenientes de lagoas de estabilização. Este método consiste na mistura de alguns reagentes com a solução contendo proteínas, produzindo um complexo de coloração azul. É bastante específico, pois, segundo COLOWICK & KAPLAN (1957), quantifica substâncias que contêm duas ou mais ligações peptídicas, enquanto o método de Bradford, segundo RAUNKJAER (1994), quantifica proteínas que tenham estruturas macromoleculares, com 8-9 ligações. Diversos fatores devem ser analisados antes da escolha da metodologia, porém o conhecimento da natureza dos constituintes da amostra e suas concentrações aproximadas são essenciais.

Segundo ZAIA *et al.* 1998, esse método apresenta alguns interferentes como altas concentrações de cálcio e magnésio, açúcares, lipídeos, glicina, EDTA e tris. Os interferentes podem aumentar a absorbância do branco, diminuir a absorvidade ou até formar precipitados, além da amostra conter outros compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda utilizados nos métodos. RAUNKJAER *et al.* (1994) analisaram amostras de águas residuárias verificando a presença de interferentes através da adição de padrão à essas amostras. Outros autores (POLACHECK & CABIB, 1981; RODRÍGUEZ-VICO *et al.*, 1989) apresentaram outros procedimentos para eliminação de interferentes no método de Lowry.

Este trabalho teve como objetivo comprovar a eficiência do método de Lowry através da verificação da degradação da amostra, em relação ao tempo de análise, e da presença de substâncias interferentes. Além disso, também foi objetivo do trabalho verificar a concentração de proteínas ao longo da ETE a fim de colaborar para o entendimento dos processos biológicos envolvidos na estabilização da matéria orgânica nestas lagoas, já que as proteínas são consideradas fator limitante para tais processos e os métodos espectrofotométricos para sua determinação em amostras de diversas origens não tem sido estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em um sistema de lagoas de estabilização (ETE de Novo Horizonte, SP) desenvolvido pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) e está em funcionamento desde fevereiro de 1999. O sistema é constituído por tratamento preliminar (gradeamento e desarenador) e três lagoas em série (anaeróbia, facultativa 1 e facultativa 2). As características operacionais do sistema estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Características operacionais da ETE de Novo Horizonte – SP.

	Unidade	Lagoa Anaeróbia	Lagoa Facultativa 1	Lagoa Facultativa 2
Volume Útil	m ³	19.951	39.018	32.916
Largura da Lâmina	m	68	111	88
Comprimento da Lâmina	m	83	219	224
Altura da Lâmina	m	3,5	1,7	1,8
Área Média	ha	0,57	2,29	1,83
Taxa de Aplicação	kgDBO/ha/dia	2.835	246	142
Tempo de Detenção Hidráulico	dias	5	10	8

Em maio/2002 foi realizada uma variação nictemeral no sistema de tratamento, coletando-se no afluente bruto (E1), saída da lagoa anaeróbia (E2), facultativa 1 (E3), facultativa 2 (E4) e efluente final (E5). As coletas foram realizadas aproximadamente nos seguintes horários: T0 - 10h; T1 - 16h; T2 - 22h30; T3 - 3h30; T4 - 9h. Realizou-se coleta de amostras em diferentes profundidades: sub-superfície (S), meio (M) e interface água-sedimento (F). Em campo, amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,45 µm de porosidade após coleta e resfriadas até serem transportadas ao laboratório.

O método utilizado para determinação de proteínas foi o de Lowry conforme descrito em LOWRY *et al.* (1951). Este consiste na adição de hidróxido de sódio, carbonato de cálcio, sulfato de cobre e tartarato de sódio a uma mistura contendo proteínas. Um complexo de coloração azulada é produzido devido a reação da proteína com o íon cobre em solução alcalina (reação biureto). Acrescenta-se reagente Folin-fenol Ciocalteau que sofre redução quando reage com proteínas. As amostras foram então submetidas à leituras de absorbância a 750 nm em espectrofotômetro DR 4000, Hach. Neste estudo foram utilizados três padrões de proteínas: soroalbumina bovina, caseína e ovoalbumina (Sigma), e as diluições nas concentrações da solução estoque (1 g.L⁻¹) para realização das curvas padrão ficaram entre 0 e 100 mg.L⁻¹.

Em T0 foi realizado um estudo de degradação da amostra, onde as mesmas foram mantidas refrigeradas por sete dias consecutivos nos quais determinou-se a concentração de proteínas. A análise de adição de padrão à amostra foi realizada para identificar se havia substâncias interferentes na água residuária com a utilização do método de Lowry para o ambiente estudado, também em T0. Para esse estudo da análise de adição de padrão à amostra foi utilizado o padrão soroalbumina bovina (Sigma) com diluições de 0 a 100 mg.L⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença entre os padrões de proteínas utilizados. O coeficiente de variação ficou entre 6,91 e 7,16% (Tabela 2) e, portanto, optou-se por utilizar somente soroalbumina em todas as análises deste trabalho.

Tabela 2: Média (mg.L⁻¹), desvio padrão e coeficiente de variação (%) referentes aos três padrões de proteínas utilizados.

Estações de coleta	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação
E1	65,5	4,6	7,02
E2	45,4	3,2	7,05
E3S	37,9	2,7	7,12
E3M	34,9	2,5	7,16
E3F	37,6	2,6	6,91
E4S	37,0	2,6	7,03
E4M	36,1	2,5	6,92
E4F	37,3	2,6	6,97
E5	36,8	2,6	7,06

Na variação nictemeral, observou-se degradação de 44% de proteínas presentes no sistema de lagoas de estabilização em T0. As concentrações de proteínas obtidas neste período podem ser observadas na Figura 1.

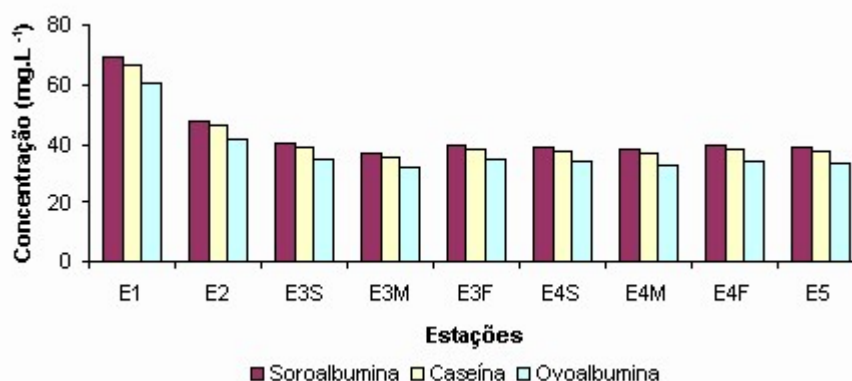


Figura 1: Variação das concentrações de proteínas (mg.L⁻¹) em T0.

Na Tabela 3, podem ser observados os valores de concentração de proteínas obtidos na variação nictemeral realizada em maio/2002 com o padrão soroalbumina.

Tabela 3: Variação nictemeral da concentração de proteínas (mg.L⁻¹) utilizando soroalbumina como padrão.

Estações de coleta	T0	T1	T2	T3	T4
E1	69,3				85,4
E2	48,0	45,7	54,3	47,7	47,3
E3S	40,1	39,1	41,1	44,7	35,4
E3M	36,9	40,9	39,1	39,8	35,1
E3F	39,8	41,1	42,7	40,7	38,5
E4S	39,1	46,8	41,4	42,5	37,0
E4M	38,1	43,0	43,0	43,8	36,3
E4F	39,5	44,9	44,3	43,0	35,3
E5	38,9				37,2

As concentrações de proteínas não apresentaram diferenças significativas entre os horários amostrados. Na entrada do sistema (E1), a concentração de proteínas passou de 69,3 mg.L⁻¹ (T0) para 85,4 mg.L⁻¹ (T4). Foram observadas algumas variações nas diferentes profundidades, mas não foram significativas. A maior concentração de proteínas obtida foi em T4, E1 (85,4 mg.L⁻¹) e a menor em T4, E3M (35,1 mg.L⁻¹). Através dos coeficientes de variação calculados entre os diferentes horários de coleta, verificou-se que as diferenças foram pequenas entre os diferentes horários (Tabela 4).

Tabela 4: Média (mg.L⁻¹), desvio padrão e coeficiente de variação (%) das concentrações de proteínas entre os diferentes horários de coleta ao longo da ETE.

Estações de coleta	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação
E1	77,3	11,4	15
E2	48,6	3,3	7
E3S	40,1	3,3	8
E3M	38,3	2,3	6
E3F	40,6	1,6	4
E4S	41,4	3,7	9
E4M	40,8	3,4	8
E4F	41,4	4,0	10
E5	38,0	1,2	3

Os maiores coeficientes de variação foram 15% (E1) e 10% (E4F). Apesar de se esperar uma diminuição nesses valores ao longo do sistema, na lagoa facultativa 2 houve aumento no coeficiente de variação em relação às outras estações.

Na variação nictemeral, observou-se que a maior parte da degradação de proteínas ocorreu na lagoa anaeróbia, onde um processo complexo envolve diferentes tipos de microrganismos. As pequenas variações ocorridas nas lagoas facultativas 1 e 2 (Tabelas 3 e 4) podem ser explicadas pela ação das bactérias, que num primeiro momento degradam proteínas em compostos menores em busca de energia (McINERNEY, 1988) e num segundo, reaproveitam peptídeos, aminoácidos e amônia para síntese de proteínas bacterianas (MACKIE & BRYANT, 1990).

A análise de degradação da amostra durante sete dias consecutivos pode ser observada na Figura 2.

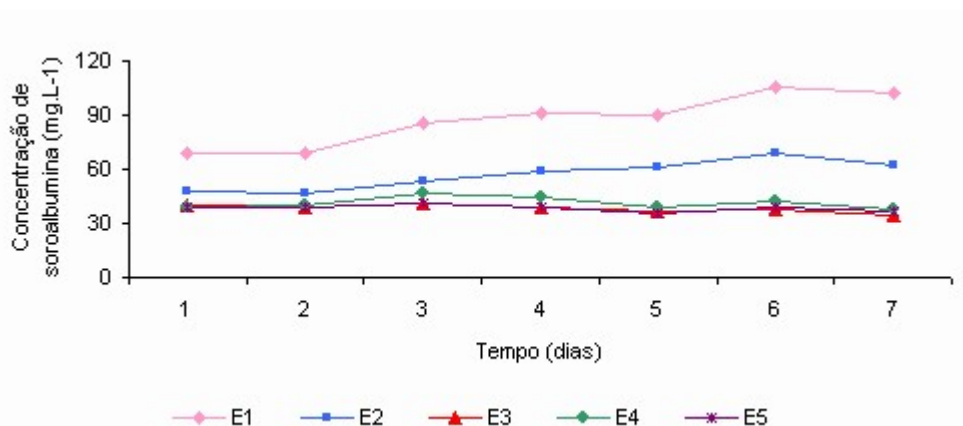


Figura 2: Degradação da amostra durante período de sete dias.

Nesta análise, não foram observadas diferenças nos valores de concentração de proteínas nos dois primeiros dias. Após esse período, as amostras das estações E1 e E2 apresentaram aumento nas concentrações de proteínas, provavelmente devido à síntese de proteínas. A concentração de proteínas em E2 no segundo dia foi de 69,2 mg.L⁻¹ e no terceiro aumentou para 85,5 mg.L⁻¹. Atingindo um máximo no sexto dia (105,2 mg.L⁻¹).

Nas amostras das estações E3, E4 e E5, as concentrações de proteínas apresentaram cerca de 16% de decréscimo na concentração de proteínas a partir do terceiro dia. Na amostra da estação E3, por exemplo, obteve-se concentração de proteínas de 39,2 mg.L⁻¹ no segundo dia e 36,3 mg.L⁻¹ no quinto dia.

Para o estudo da adição de padrão às amostras, foram realizadas análises de regressão linear para obter as equações das retas (Figura 3). Os valores dos coeficientes angulares não apresentaram diferenças significando que substâncias interferentes não estavam presentes em amostras provenientes de lagoas de estabilização.

O coeficiente angular para o padrão foi de 0,0027 e para adição de padrão de 0,0026. Este resultado corroborou com aquele obtido por RAUNKJAER *et al.* (1994). Estes autores também realizaram o mesmo experimento com soroalbumina e demonstraram que a amostra não apresentou substâncias interferentes na água residuária utilizada. Os autores encontraram coeficientes angulares para padrão de 0,00258 e para adição de padrão de 0,00256.

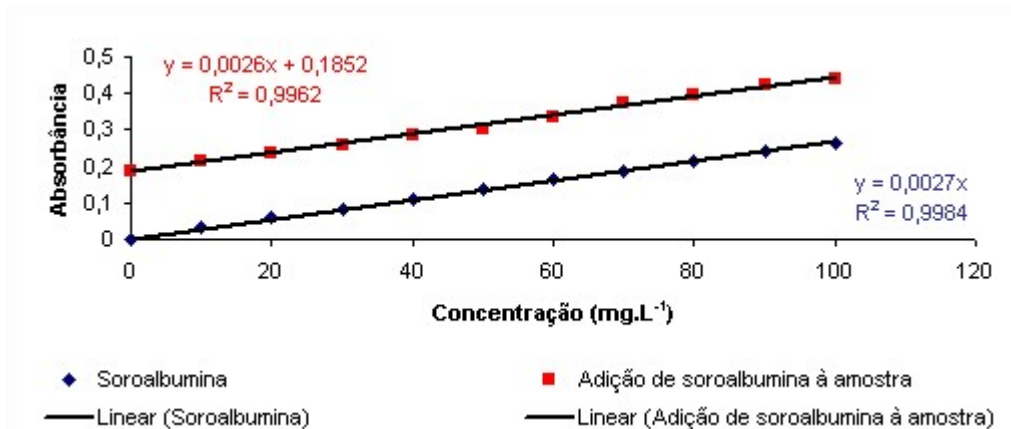


Figura 3: Adição de padrão soroalbumina à amostra.

Como os parâmetros de projeto de unidades de tratamento dependem das características da água residuária a ser tratada e da operação do sistema e nem sempre as determinações usuais (Demanda Bioquímica de Oxigênio e Demanda Química de Oxigênio) fornecem informações suficientes para uma investigação adequada, torna-se necessária a procura de metodologias mais apropriadas, bem como sua confirmação, para a identificação e quantificação de compostos importantes no processo de estabilização da matéria orgânica.

Este trabalho também mostra a importância de estudos mais detalhados dentro do sistema de lagoas. Não se deve considerar somente afluente bruto e efluente final devido às variações nas concentrações de proteínas observadas em cada lagoa. Apesar de serem pequenas, estas variações poderão influenciar na eficiência total do sistema.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

O sistema não apresentou variações significativas nas concentrações de proteínas, porém, estudos mais detalhados são necessários.

Para amostras provenientes de lagoas de estabilização para tratamento de efluentes sanitários, o tempo mínimo de armazenamento das mesmas, de acordo com este trabalho, foi de 2 dias. A partir disso, a amostra deverá ser descartada.

Pela análise de adição de padrão à amostra constatou-se que não houve substâncias interferentes no método proposto. Portanto, esta análise confirmou a validade do método de Lowry na determinação de proteínas em lagoas de estabilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATSTONE, D.; KÉLLER, J.; NEWELL, B.; NEWLAND, M. Model development and full scale validation for anaerobic treatment of protein and fat based wastewater. *WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY*, v. 36, n. 6-7, p. 423-431, 1997
- COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. Biuret method. 1957. In: *Methods in Enzymology*, v. III, p. 450-451, Academic Press, New York, 1957.
- CONFER, D. R.; LOGAN, B. E. Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures I. Bovine serum albumin. *WATER RESEARCH*, v. 31, n. 9, p. 2127-236, 1997
- KELLNER, E.; PIRES, E. C. Lagoas de estabilização: projeto e operação. ABES, 1998
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. BIOL. CHEM.*, v. 193, p. 265-276, 1951.
- MACKIE, R.I.; BRYANT, M.P. Efficiency of bacterial protein synthesis during anaerobic degradation of cattle waste. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, v. 56, n. 1, p. 87-92, 1990

7. McINERNEY, M. J. Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and protein. 1988. In: ZEHNDER, J. B. Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley & Sons, cap. 8, p. 373-416, 1988.
8. MIWA, A. C. P.; CALIJURI, M. C.; FALCO, P. B. Determinação de proteínas em lagoas de estabilização. 2003. 22º Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental. Saneamento Ambiental: Ética e Responsabilidade Social, 14-19 de setembro de 2003, Joinville, Santa Catarina.
9. POLACHEK, I; CABIB, E. A simple procedure for protein determination by the Lowry method in dilute solutions and in the presence of interfering substances. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, v. 117, p. 311-314, 1981
10. RAUNKJAER, K; HVITVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P. H. Measurements of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. WATER RESEARCH, v. 28, p. 251-262, 1994.
11. RODRÍGUEZ-VICO, F.; MARTÍNEZ-CAYUELA, M.; GARCÍA-PEREGRÍN, E.; RAMÍREZ, H. A procedure for eliminating interferences in the Lowry method of protein determination. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, v. 183, p. 275-278, 1989
12. TORRES, P. Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (uasb) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários. São Carlos. 1992. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo 1992.
13. VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. BIORESOURCE TECHNOLOGY, v. 74, p. 231-239, 2000
14. ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. QUÍMICA NOVA, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.