



Modelagem empírica do processo de biodegradação de efluentes protéicos por enzimas de *Carica papaya sp.*

Joana P. M. Biazus¹, José C. C. Santana² & Roberto R. de Souza²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi modelar empiricamente a biodegradação de efluentes protéicos por enzimas papaínas do látex de *Carica papaya sp.* num biorreator agitado, para facilitar a otimização do processo por metodologia de análise de superfície de resposta (RSM) e aplicar em tratamento de efluentes provenientes de indústrias de processamento de carne. As análises das curvas de biodegradação mostraram que o tempo de residência para os biorreatores está entre 28 e 30 h. O modelo empírico que mais se ajustou aos dados de biodegradação sob influência dos fatores (pH e temperatura) foi o de um hiperplano e a região de operação otimizada para a degradação de proteínas pelas papaínas foi aquela que apresentou os maiores valores de temperatura e menores valores de pH.

Palavras-chave: modelagem empírica, enzimas de *Carica papaya*, biodegradação

Empirical modeling of biodegradation process of proteic effluents by enzymes of *Carica papaya sp.*

ABSTRACT

The objective of this research was to model empirically the proteic effluent biodegradation by papains enzymes from *Carica papaya sp.* in an agitated bioreactor, to facilitate the optimization process by response surface methodology (RSM) and to apply in treatment of effluents from meat processing industries. The analysis of biodegradation curves showed that bioreactors residence time is between 28 and 30 h. Hiper plane empirical model was the one that best fitted to biodegradation data under the influence factors (pH and temperature) and the optimized operation zone for the protein biodegradation by papains was the one that presented the high temperature and low pH values.

Key words: empirical modeling; *Carica papaya* enzymes, biodegradation

¹ DEQ/UFS, Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos s/nº, Rosa Elze, CEP 49480-000, São Cristóvão, SE, Fone: (79) 3212-6687. E-mail: rrsouza@ufs.br; (79) 3212-6676; joana_biazus@yahoo.com.br

² Faculdade de Química/UNICAMP, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Dist. Barão Geraldo s/n, CP 6066, CEP 13083-970, Campinas, SP. Fone: (19) 3289-8147. E-mail: jccurvelo@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As 3.4.4.10 e 3.4.4.11 peptídeo peptidohidrolases, papaína e quimopapaína, são enzimas proteolíticas comumente conhecidas como papaínas. Estas hidrolases possuem ação sobre peptídeos, amidas e ésteres, especialmente sobre bases aminoácidas, leucina ou glicina, sendo encontradas no látex do fruto verde do mamoeiro, *Carica papaya* (Dixon & Weeb, 1971).

As papaínas possuem massa molar de aproximadamente 20,7 kDa, pH ótimo próximo de 5, sendo que no caso específico da albumina de ovos o pH ótimo é 7. Essas enzimas possuem uma estabilidade térmica que lhes proporciona atividades catalíticas a temperaturas variando de 4 °C até 70 °C, sendo apenas dependentes do pH, que é crítico em condições ácidas abaixo do seu ótimo. Seus sítios apresentam os grupos tióis, que são ativos quando se encontram sob a forma reduzida. Desta maneira, as substâncias como o cianeto, a cisteína e o sulfeto, são agentes ativadores, enquanto agentes oxidantes e metais pesados são inibidores desta enzima (Lima et al., 2001).

As papaínas possuem aplicações variadas, destacando-se sua utilização no amolecimento de carnes e fibras de tecidos, na estabilização e clarificação de bebidas, no uso clínico como auxiliar digestivo, além de tantas outras (Wiseman, 1985).

O lançamento de efluentes líquidos em um curso d'água pode resultar em variações das características deste, levando a contaminação da fauna e flora circunvizinhas, causando prejuízo a todos que dependem deste ecossistema. Um efluente que não atenda às condições estabelecidas pelo CONAMA n° 20 (Brasil, 1986) e pela Lei dos crimes ambientais (MMA/IBAMA, 2003) necessita ser tratado, tornando-se necessária a instalação de estações de tratamento que atendam as exigências deste efluente. Os resíduos constituintes do efluente de abatedouros e frigoríficos compõem-se basicamente de sangue, gordura e outros materiais orgânicos e inorgânicos. Este efluente se compõem, em parte, de proteínas, como hemoglobinas e albuminas, dentre outras; sendo quase sempre descartados, em mananciais, sem tratamento algum (Pardi et al., 1993).

O planejamento fatorial de experimentos é uma ferramenta utilizada em otimizações de processos que reduz a quantidade de ensaios a serem realizados no experimento, através de "design" de aproximações geométricas que proporcionam uma forma simples, confiável e eficiente de análise dos dados, já que se utiliza à metodologia de análise de superfície de resposta (RSM). Seus modelos são avaliados por parâmetros estatísticos específicos, contidos na metodologia de análise de variância dos dados (ANOVA). Nesta metodologia de otimização, as variáveis independentes são conhecidas como sendo os fatores, suas variações são chamadas de níveis, enquanto que as variáveis dependentes são tidas como sendo as respostas (Barros Neto et al., 1995 e 2001).

Este trabalho objetivou a obtenção de um modelo empírico que avaliasse a influência do pH e da temperatura (T) sobre a biodegradação de proteínas contidas em efluentes simulados de indústrias de processamento de carne, obtido por uma oti-

mização por planejamento fatorial do tipo 2², sendo que esta simulação foi feita em escala laboratorial, num biorreator contendo enzimas proteolíticas do látex do fruto da *Carica papaya* (mamoeiro), papaínas, para que as condições ótimas, obtidas neste trabalho, sejam aplicadas em tratamento de efluentes provenientes de abatedouros e frigoríficos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das enzimas: as enzimas foram isoladas a partir do látex do fruto verde de culturas *Cariaca papaya*. Em 20 mL água destilada misturou-se 10 g de látex e 3 g NaCl. Esta mistura foi centrifugada a 3000 rpm, por 15 min e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a 5 °C, para uso posterior como concentrado enzimático (Lima et al., 2001).

Preparo das soluções: prepararam-se soluções tampão fosfato nos valores de pH de 5 e 7; segundo a metodologia descrita por Morita & Assumpção (1995) e soluções de albumina de soro bovino (BSA) a 300 mg L⁻¹ (utilizada neste trabalho como solução simuladora, por ser padrão analítico) a valores de pH de 5 e 7.

Montagem dos Biorreatores: estes foram montados em erlenmeyer de 500 mL, hermeticamente fechados, com dois dutos (um para a circulação de ar e outro para a coleta de amostras com uma seringa), com agitação magnética, contendo 250 mL da solução simuladora do efluente, a temperaturas de 25 °C ± 1 e 30 °C ± 1 e pH 5 e 7, respectivamente. Ao ser adicionado à solução simuladora do efluente, esterilizou-se o meio em autoclave (Cadogan & Hanks, 1995, Adds et al., 1998). A esses biorreatores foram adicionados 5,0 mL do concentrado enzimático contendo papaínas, a seguir o sistema foi posto em agitação e o tempo inicial de biodegradação foi marcado. As temperaturas foram escolhidas por serem próximas das condições ambientais de temperatura, nas quais a maioria dos reatores industriais utilizados no tratamento de efluentes opera, para reduzir gastos com consumo de energia e descartar efluentes com a temperatura próxima da dos corpos hídricos que receberão este efluente. Os pH utilizados neste trabalho foram aqueles apresentados na literatura como ótimos das papaínas (Lima et al., 2001; Pardi et al., 1993).

Determinação da concentração de proteína total: a concentração de proteína total (C_i, em mg L⁻¹) foi acompanhada ao longo do tempo de operação do biorreator (t, em h), sendo determinada pelo método de Bradford modificado (Bradford, 1976). As concentrações inicial (C₀, em mg L⁻¹) e final (C_f, em mg L⁻¹) de proteínas serviram de parâmetros para o cálculo do índice de degradação de proteínas (D_{Prot}), utilizando-se a Eq. 1:

$$D_{Prot} = \left(1 - \frac{C_f}{C_0}\right) * 100 \quad (1)$$

Otimização dos experimentos: realizou-se um planejamento fatorial dos experimentos, do tipo 2², tendo o pH (adimensional) e a temperatura (T, em °C) como os fatores que influenciam no valor do índice de biodegradação (D_{Prot},

adimensional) de proteínas, com triplicata nos níveis +1 e -1 (Valores obtidos na faixa de estabilidade das curvas da Figura 1). A codificação das variáveis seguiu as seguintes equações:

$$x_1 = \text{pH} - 6 \quad (2)$$

$$x_2 = \frac{T - 27,5}{2,5} \quad (3)$$

Os dados encontrados passaram por uma regressão quadrática pelo método dos mínimos quadráticos em modelos empíricos planos e hiperplanos. A avaliação do ajuste dos dados aos modelos empíricos propostos foi feita pela metodologia da análise de variância (ANOVA) e a otimização do sistema reacionário pela metodologia da análise da superfície de resposta (RSM), descritas em Barros Neto et al. (1995 e 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as curvas formadas pela variação da concentração de proteínas (na forma adimensional) com o tempo. Essas curvas apresentam alta declinação inicial com velocidade média de degradação de proteínas de aproximadamente $150 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, sendo reduzida depois para valores abaixo de $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (próximo de 5 h de operação), até ficar praticamente constante e igual a zero. A degradação estabilizou-se após atingir valores próximos de 90 e 70%, a 30 e a 25 °C respectivamente, entre 28 a 30 h de funcionamento dos biorreatores correspondentes aos devidos ensaios. A Tabela 1 apresenta os ensaios realizados e seus respectivos valores médios de biodegradação, bem como os valores preditos pelo modelo. A análise gráfica mostra que o látex de mamoeiro (*Carica papaya*) possui boa atividade proteolítica e que estas enzimas, após determinado tempo de reação, sofrem inibição pela alta concentração de produtos formados ou pela baixa concentração do reagente, presentes no meio reacional (nas condições estudadas), o que provoca o deslocamento do sentido da reação (Dixon & Weeb, 1971; Lima et al., 2001; Wiseman, 1985); entretanto, o biorreator

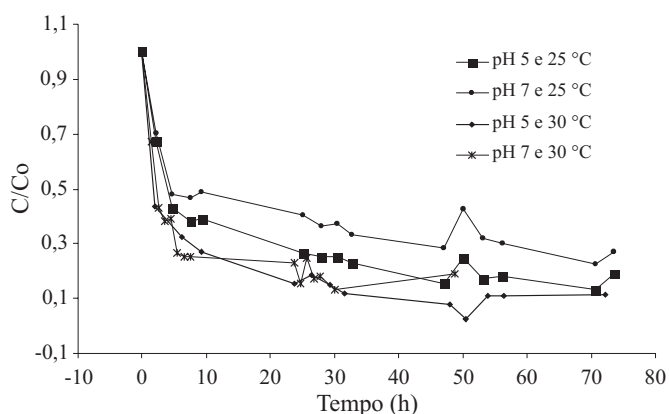


Figura 1. Curvas de biodegradação de proteínas pelas enzimas papaínas nos diferentes pHs e temperaturas estudadas

Tabela 1. Matriz de planejamento utilizada para a realização do experimento

Ensaio	x_1	x_2	pH	T (°C)	$D_{\text{Prot}} \text{ Experim.}$	$D_{\text{Prot}} \text{ predito}$	(erro) ²
1	-1	-1	5	25	81,07	81,58	0,257
2	-1	-1	5	25	81,98	81,58	0,163
3	-1	-1	5	25	81,68	81,58	0,011
4	1	-1	7	25	73,02	73,34	0,100
5	1	-1	7	25	73,89	73,34	0,306
6	1	-1	7	25	73,10	73,34	0,056
7	-1	1	5	30	89,10	89,04	0,004
8	-1	1	5	30	88,76	89,04	0,077
9	-1	1	5	30	89,25	89,04	0,046
10	1	1	7	30	88,14	88,20	0,004
11	1	1	7	30	88,31	88,20	0,011
12	1	1	7	30	88,16	88,20	0,002

operando a pH 5 e temperatura de $30 \text{ °C} \pm 1$, apresentou melhor desempenho de degradação, atingindo valores próximos a 90% da concentração de proteína total.

A Eq. 4, apresenta o modelo empírico obtido pela regressão dos dados experimentais de D_{Prot} para otimizar a degradação de proteínas por papaínas, sob influência do pH (x_1) e da temperatura (x_2), com seus devidos erros para cada estimativa dos parâmetros. Observa-se que esses erros são relativamente pequenos, variando de 2 a 11% dos valores médios dos parâmetros, o que demonstra uma precisão melhor durante as análises, já que ditos erros são calculados pela variância entre as repetições em cada ponto.

Todos os parâmetros foram estatisticamente significativos, não podendo ser excluídos da equação. O primeiro parâmetro representa a média global de degradação de proteínas e foi relativamente alta. O segundo parâmetro mostra uma influência negativa do pH sobre a degradação de proteínas, ou seja, à medida que se aumenta o pH, reduz-se a degradação, enquanto o terceiro e quarto parâmetros mostram que o efeito da temperatura e dos fatores combinados foi positivo sobre a degradação de proteínas, elevando com o aumento da temperatura (para o pH constante, já que o efeito do segundo parâmetro é negativo).

$$D_{\text{prot}} = 83,04 - 2,27x_1 + 5,58x_2 + 1,85x_1 * x_2 \quad (4)$$

(± 0,21) (± 0,21) (± 0,21) (± 0,21)

A Tabela 2 mostra a avaliação do modelo pela metodologia da análise de variância (ANOVA), a qual indica que o modelo é estatisticamente significativo, pois, ao serem comparados os valores dos testes F calculado (F_{calc}) e tabelado (F_{tab}), obtém-se uma razão $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ de 283,5; segundo Barros Neto et al. (2001), quando esta razão é maior que 1, o modelo é estatisticamente significativo e, se for maior que 5, modelo será além de significativo, preditivo.

Além desta análise, a ANOVA apresenta a correlação múltipla (R^2) a qual, quanto mais próxima da unidade, mais ajustados são os dados experimentais ao modelo, e as porcentagens de variâncias explicáveis simples e máximas

Tabela 2. Avaliação do ajuste de dados e significância estatística do modelo, a 95% de confiança

FV	SQ	GL	MQ	F _{Calc}	F _{Tab}
Regressão	447,65	3	149,22		
Resíduos	1,034	8	0,1292	1154	4,07
Falta de Ajuste	0,002	0			
Erro Puro	1,036	8	0,1295		
Total	449,17	11			
% de Variância Explicável				99,66	
% máxima Variância Explicável				99,77	
Coeficiente de Determinação (R ²)				0,9966	

FV-fonte de variação; SQ-soma quadrática; GL-graus de liberdade; MQ-média quadrática

que, quanto mais próximos de 100%, menos erros estarão sendo adicionados ao modelo devido à falta de ajuste, a erros experimentais e outros tipos de erro (Barros Neto et al., 1995 e 2001).

Com a análise de variância (ANOVA), Tabela 2 e os parâmetros teste F, R² e % de variância explicável, pode-se afirmar que o modelo empírico (Eq. 4) é estatisticamente significativo e preditivo, para um nível de 95% de confiança.

As Figuras 2 e 3 mostram as superfícies de resposta e as curvas de níveis, respectivamente, geradas em Software Statística for Windows 5.0, através do uso dos dados obtidos experimentalmente, após uma otimização por planejamento fatorial 2². Percebe-se a tendência do índice de degradação (D_{Prot}) em aumentar com a diminuição do pH e com o aumento da temperatura (T).

Nota-se também, que para valores altos de temperatura, o pH não influencia no valor do índice de degradação, o que é bastante visível, tanto para a superfície de resposta quanto para as curvas de níveis. Neste caso, pode-se fazer uma avaliação melhor da influencia do pH e da temperatura que as comparações feitas na Figura 1, já que a otimização abrange um caso geral de análise dos dados deste estudo (região ótima), enquanto as curvas de biodegradação abrangem apenas um caso específico (ótimo pontual).

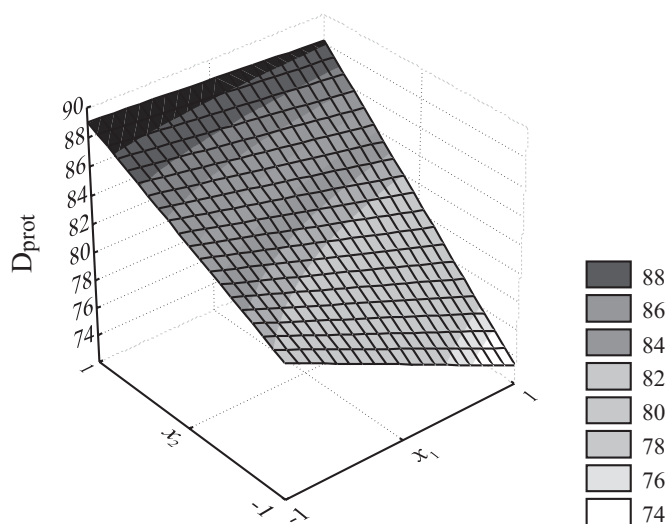


Figura 2. Superfície de resposta que melhor descreve a biodegradação de proteínas por enzimas papaínas

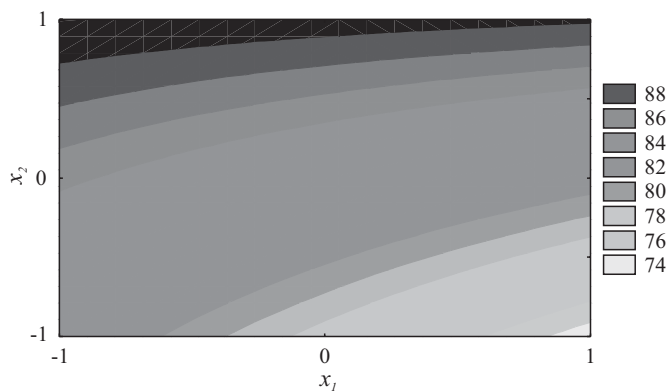


Figura 3. Curvas de níveis geradas pelo modelo ótimo para descrever a biodegradação de proteínas por enzimas papaínas

Desta forma, pode-se dizer que, para tratar efluentes de indústrias de processamento de carne, ao se aplicar enzimas papaínas, deve-se operar o biorreator numa faixa de temperatura próxima dos 30 °C (nível 1) com o meio ajustado próximo ao pH 5 (nível -1); alcançando-se um índice de biodegradação próximo a 89,04% de redução da concentração de proteínas totais, nestas condições estudadas.

Assim, este trabalho veio a contribuir com a melhoria dos sistemas de tratamento de efluentes provenientes das indústrias de processamento de carne por aumentar o desempenho dos biorreatores ao se utilizar as enzimas papaínas, reduzindo o impacto ambiental causado pelo descarte de boa parte dos compostos orgânicos (proteínas) nos corpos hídricos das regiões circunvizinhas.

CONCLUSÕES

1. A taxa de reação das enzimas papaínas estudadas neste trabalho alcanço valores próximos a 150 mg L⁻¹ h⁻¹ e o tempo de residência do efluente no biorreator foi de 28 a 30 h.
2. O modelo empírico proposto neste trabalho apresentou dependência hiperplana da biodegração de proteína (D_{Prot}) com o pH e a temperatura do meio reacional, sendo que a avaliação pela metodologia ANOVA indicou que o modelo pode ser usado na simulação do tratamento de efluentes protéicos, pois teve bom ajuste e é preditivo.
3. A região ótima para o tratamento de efluentes protéicos está nas vizinhanças do pH 5 e na temperatura de 30 °C, onde a biodegradação da proteína total alcança valores próximos a 90%, nas condições estudadas neste trabalho.

LITERATURA CITADA

Adds, J.; Larkcom, E.; Miller, R. Microorganisms and biotechnology. Croatia: Thomas Nelson and Sons, 1998, p.19-33.
 Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. v.1, 1.ed., Série Manuais, Campinas: UNICAMP, 1995, 302p.

- Barros Neto, B.; Scarminio, I. S. ; Bruns, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. V.1, 1.ed. Coleção Livros-Textos, Campinas:UNICAMP, 2001, 406p.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- Brasil. Resolução CONAMA N° 20, de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do território Nacional. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>. 25 Abr.2004.
- Cadogan, A.; Hanks, J. *Microbiology & biotechnology: Biology, advanced studies*. 1.ed. Croatia: Thomas Nelson and Sons, 1995, p.31-64.
- Dixon, M.; Weeb, E. C. *Enzymes*. 2.ed., London: Longman Group Ltd, 1971, p.246-750.
- Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimidell, W. *Biotechnology industrial. processos fermentativos e enzimáticos*. 1.ed., v.01, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001, p.367-371.
- MMA/IBAMA – Ministério do Meio Ambiente/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Lei da Vida: A lei dos crimes ambientais. Lei n° 9.605, de 12 de fevereiro de 1988 e Decreto n° 3.179, de 21 de setembro de 1999, Brasília, 2003.
- Morita, T.; Assumpção, R. M. V. *Manual de soluções, reagentes e solventes. Padronização–preparação–purificação*. 2.ed., São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1995, 276p.
- Pardi, M. C.; Santos, I. F.; Souza, E. R.; Pardi, H. S. *Ciência, higiene e tecnologia da carne. ciência e tecnologia da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação*. v.1, Goiânia: UFG, 1993, p.49-105.
- Wiseman, A. *Handbook of enzyme biotechnology*. 2.ed., Cinchesteer: Ellis Horwood Ltd. 1985, p.355-357.