

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA EM AMOSTRAS DE LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO

EVALUATION OF SPECTROPHOTOMETRIC METHODS FOR PROTEIN DETERMINATION IN WASTE STABILIZATION PONDS SAMPLE

ADRIANA CRISTINA POLI MIWA

Química. Doutora em Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo

PATRÍCIA BORTOLETTO DE FALCO

Bióloga. Doutora em Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo

MARIA DO CARMO CALIJURI

Bióloga. Professora Titular do Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo

Recebido: 27/11/06 Aceito: 26/05/08

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo principal comparar cinco métodos espectrofotométricos para determinação de proteínas em amostras provenientes de estações de tratamento de efluentes sanitários. O intuito foi definir uma metodologia de aplicação rápida, fácil e confiável para este tipo de amostra. As lagoas de estabilização, como sistemas de tratamento biológico, têm como principais constituintes proteínas, carboidratos e lipídeos, mas também apresentam muitos compostos interferentes, como por exemplo, uréia, detergentes e compostos fenólicos, que podem prejudicar a quantificação de tais parâmetros. Os métodos analisados foram Lowry, Biureto, Bradford e Ácido bicinonínico. O método de Lowry mostrou-se mais adequado às características da amostra, com boa reprodutibilidade, reagente específico, custo moderado e ausência de substâncias interferentes.

PALAVRAS-CHAVE: Concentração de proteínas, lagoas de estabilização, métodos espectrofotométricos, método de Lowry.

ABSTRACT

This research had as main objective to compare five spectrophotometric methods for protein determination in samples proceeding from sanitary effluent of treatment plant. Intention was to define a methodology that is of fast and easy and reliable application for this type of sample. The stabilization ponds, as systems of biological treatment, have as main constituent proteins, carbohydrates and lipids, but also they present many interfering composites, for example, phenolic urea, detergents and composites, that can harm the quantification of such parameters. The analyzed methods had been Lowry, Biuret, Bradford and Acid bicinoninic. The method of Lowry revealed more adequate to the characteristics of the sample, with good reproducibility, specific reagent, moderate cost and absence of interfering substance.

KEYWORDS: Protein concentration; waste stabilization ponds; spectrophotometric methods, Lowry methods.

INTRODUÇÃO

As proteínas, devido a sua complexidade, constituem fator limitante para o tratamento biológico de águas residuárias. Um sistema de tratamento mais eficiente pode estar diretamente relacionado com a concentração de proteína. Concentrações relativas destas substâncias, geralmente acima de 300 mg.L⁻¹, causam problemas durante o tratamento anaeróbio (Vidal et al, 2000; Tommaso et al, 2002). Estas macromoléculas são as responsáveis

por problemas na cinética de degradação e Demanda Química de Oxigênio (DQO) remanescente em reatores anaeróbios que tratam, principalmente, efluentes de indústria de laticínio e esgoto sanitário (Torres, 1992; Gadelha, 2000; Tommaso et al 2002).

Levando-se em consideração as diversas origens das águas residuárias, torna-se evidente a necessidade de estudos detalhados relativos ao teor de matéria orgânica, seja de forma direta, ou indireta como, por exemplo, através da determinação da concentração de

proteínas. As estações de tratamento de águas residuárias avançadas, que removem nutrientes, ou mesmo as mais simples, requerem conhecimento mais aprofundado sobre o metabolismo da matéria orgânica, através, por exemplo, da determinação de proteínas, carboidratos e lipídeos, para otimizar o planejamento e operação. Para que estas estações de tratamento possam determinar com facilidade e segurança as concentrações destas macromoléculas, é preciso conhecer o método a ser utilizado e, para isso, testes de

metodologias para amostras específicas se faz necessário.

Existem vários métodos para a determinação de proteínas totais, que foram desenvolvidos para diferentes amostras, tais como células bacterianas (Biureto), proteínas dissolvidas (Bradford), soluções que contenham detergentes (BCA – Ácido Bicinconínico), proteína pura (absorção UV), alimentos (Biureto, Lowry, Bradford), plasma sanguíneo (Biureto, Lowry, Bradford), plantas (Lowry), entre outras.

Cada método apresenta um princípio diferente e precisa ser analisado separadamente. O método **Biureto** (Gornall et al, 1949) envolve a mistura de sulfato de cobre e hidróxido de sódio com tartarato de sódio, que estabiliza o cobre em solução. Segundo Zaia et al (1998), ocorre a formação de um complexo quadrado planar do cobre com a ligação peptídica da proteína, em meio alcalino. Geralmente, as concentrações de proteínas são superestimadas, uma vez que todos os compostos com grupos $-NH_2$ são medidos (Itzhaki & Gill, 1964). O método descrito por Itzhaki & Gill (1964) utiliza somente sulfato de cobre e hidróxido de sódio na formação do complexo. Apresenta limite de detecção de 1×10^{-3} mg.L⁻¹ e leitura de absorbância em 310 nm (Wilson & Walker, 1995). Várias substâncias presentes no esgoto sanitário absorvem na região de 310 nm, podendo causar interferência nas leituras superestimando as concentrações de proteínas. O complexo formado no método do Biureto também pode ser lido a 540 nm, porém com menos sensibilidade. Stickland (1951) propôs um método para determinar proteínas totais em células bacterianas com os mesmos reagentes daquele proposto por Gornall et al (1949), porém com posterior centrifugação para eliminar material celular e hidróxido de cobre, ambos insolúveis.

O método de **Lowry** apresenta limite de detecção de 0,7 mg.L⁻¹ e leituras de absorbância em comprimento de onda 750 nm (Lowry et al, 1951). Neste método, ocorre redução dos constituintes ativos do reagente folin-fenol por meio das cadeias laterais de alguns aminoácidos que contribuem segundo Zaia et al (1998), com quatro elétrons ou pela retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela for-

mação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas, tornando a reação biureto mais sensível. Segundo Wilson & Walker (1995), o limite de detecção deste método é de 1×10^{-5} mg.L⁻¹.

No método de **Bradford**, as leituras são feitas a 595 nm (Bradford, 1976) e o limite de detecção é de 2×10^{-5} mg.L⁻¹ (Wilson & Walker, 1995). Ocorre ligação do corante azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para isto ocorrer, a proteína deve ter estrutura macromolecular, ou seja, de 8-9 ligações peptídicas no mínimo. A ligação ocorre em dois minutos e esta dura aproximadamente duas horas (Bradford, 1976). Segundo Zaia et al (1998), no pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

No método **BCA - Ácido Bicinconínico** (Smith et al, 1985), com leituras a 562 nm e limite de detecção de 0,5 mg.L⁻¹, ocorre formação de complexo colorido com BCA, pela redução do Cu^{+2} , em meio alcalino, com proteínas (Zaia et al, 1998). Smith et al (1985) declararam que este método monitora os íons cobre monovalentes produzidos na reação de proteínas com cobre bivalente, aumentando a sensibilidade do método, como ocorre no de Lowry. Existem outras substâncias capazes de reduzir o Cu^{+2} a Cu^{+1} tais como ácido úrico e glicose que causam interferência na determinação (Smith et al, 1985). Segundo Wilson & Walker (1995), o limite de detecção é de 5×10^{-7} mg.L⁻¹.

O método da **proteína bruta** é baseado na determinação do nitrogênio total Kjeldahl (NTK) (APHA, 1999) e conseqüente multiplicação por 6,25 (James, 1995). Este fator é referente à média de nitrogênio protéico de 16% presente nos compostos. Neste método o limite de detecção é de 0,1 mg.L⁻¹.

Para Zaia et al (1998), vários fatores podem ser analisados antes da escolha da metodologia para determinação de proteína total, como sensibilidade, reprodutibilidade, simplicidade, poucas substâncias interferentes, disponibilidade de volume de amostra, rapidez, baixo custo, similaridade às concentrações ambientais e toxicidade do reagente. Poucos estudos metodológicos têm sido realizados para comparar o desempenho dos métodos espectrofotométricos na

determinação de proteínas em amostras ambientais, especialmente em águas residuárias.

Estudos analíticos baseados na determinação de proteínas podem render informações sobre a influência das condições ambientais sobre os processos predominantes nos sistemas de tratamento biológico de efluentes e também sobre a eficiência dos mesmos. No caso das lagoas de estabilização, sistemas dependentes da atividade biológica e potencial redutor e produtor de proteínas, o conhecimento das concentrações destas pode auxiliar no entendimento das relações substrato-biomassa e, conseqüentemente, no seu desempenho.

Nesta pesquisa, os métodos espectrofotométricos Lowry, Biureto, Bradford e Ácido bicinconínico e Proteína bruta foram utilizados para determinar a concentração de proteínas em amostras provenientes de lagoas de estabilização. Estes métodos, baseados na formação de compostos coloridos devido à reação de grupos ou radicais específicos da molécula de proteína com reagentes químicos, foram selecionados por apresentarem rapidez e facilidade de aplicação. As vantagens e desvantagens de cada método também foram consideradas para estas amostras. A presença de substâncias interferentes foi verificada após a comparação dos métodos por meio da adição padrão.

METODOLOGIA

As amostras ambientais foram provenientes de um sistema de lagoas de estabilização localizado no sudeste do Brasil, estado de São Paulo, na cidade de Novo Horizonte (SP). Este sistema apresenta tratamento primário (gradeamento e caixa de areia), uma lagoa anaeróbia seguida de duas facultativas, em série.

Foram feitas amostragens em fevereiro, maio, agosto e novembro de 2002 para realização das análises com coletas em cinco estações: afluente bruto (af), efluente da lagoa anaeróbia (ean), lagoa facultativa 1 (lf1), lagoa facultativa 2 (lf2) e efluente final (ef). As amostras, filtradas em campo (filtros de fibra de vidro Whatman, 0,45 μ m de porosidade), para eliminar problemas relacionados à turbidez, foram armazenadas em frascos de polietileno e mantidas refrigeradas até o momento da análise.

Os métodos de determinação de proteínas utilizados foram: Lowry (Lowry et al, 1951), Biureto (Itzhaki & Gill, 1964), Bradford (Bradford, 1976) e Ácido bicinconínico (BCA) (Smith et al, 1985). No método BCA, foram realizadas incubações sob diferentes temperaturas: (i) temperatura ambiente por duas horas; (ii) 37°C por 30 minutos; (iii) 60°C por 30 minutos, conforme sugerido pelo próprio método, visto que os autores declararam que aumentando a temperatura, acelera-se a formação do complexo cobre-proteína.

A proteína padrão soro albumina bovina (SIGMA) foi utilizada como padrão em todos os métodos. O preparo da solução estoque (1,0g.L⁻¹) se deu pela solubilização da soro albumina bovina em água. As curvas padrão foram feitas com diluições variando em cada método, sendo que, para o método de Lowry e BCA, variaram de 0-100mg.L⁻¹, para Biureto, de 0-400mg.L⁻¹ e, para Bradford, de 0-40mg.L⁻¹.

A reprodutibilidade dos métodos Lowry, Biureto, Bradford e BCA foi testada em quintuplicata. Foram feitas análises de estabilidade do complexo formado por meio de leituras de absorbância em diferentes intervalos de tempo, de acordo com o método analisado. No método de Lowry, as leituras foram realizadas imediatamente no final do teste e após 10, 20 e 30 minutos. Nos métodos Biureto e Bradford, as leituras de absorbância foram realizadas imediatamente após o final do teste e após 10 minutos. No BCA, os intervalos foram de 0, 10 e 15 minutos.

Os dados foram submetidos à análise de variância (programa *Statistica*) para testar as diferenças entre os métodos avaliados e, conseqüentemente, escolher um dos métodos para aplicação na determinação de proteínas em amostras provenientes de sistemas de tratamento de esgoto. A análise foi realizada admitindo-se nível de corte de probabilidade aceito de 5% ($p < 0,05$).

A partir destas análises, apenas para o método escolhido, foi feita análise de adição de padrão soro albumina para verificação de substâncias interferentes, visto que amostras provenientes de lagoas de estabilização podem conter diversas substâncias complexas, as quais interferem na determinação de proteína. A verificação de substâncias interferentes foi feita através da adição de padrão soro albumina bovina à

amostra. Pela leitura de absorbância do padrão e da adição de padrão à amostra, verificou-se a presença ou não de substâncias interferentes.

RESULTADOS

Para cada método analisado foram feitas curvas padrão (Tabela 1) onde foram determinados os parâmetros analíticos para padrão soro albumina bovina. O melhor coeficiente de regressão foi obtido na curva padrão do método BCA (i), porém todos os outros apresentaram coeficientes acima de 0,9. As curvas padrão obtidas em cada método foram lineares.

Em relação às concentrações de proteínas (Figura 1), no método de Lowry, elas estiveram entre 32,45±0,37 mg.L⁻¹ (lf1) e 46,58±0,29 mg.L⁻¹ (af). As maiores concentrações foram obtidas no método Biureto, entre 62,00±1,34 mg.L⁻¹ (ef) e 70,56±1,84 mg.L⁻¹ (af). As menores concentrações foram obtidas no método de Bradford, entre 10,25±0,26 mg.L⁻¹ (af) e 16,18±0,22 mg.L⁻¹ (ef). No método BCA, as concentrações de proteína estiveram entre 35,02±0,19 mg.L⁻¹

(BCA i, ef) e 62,20±0,19 mg.L⁻¹ (BCA i, af). As concentrações obtidas nas incubações ii e iii foram maiores que as obtidas na incubação i.

Também foi observado aumento nas concentrações de proteína na lagoa facultativa 2 (lf2) nos métodos de Lowry (38,90±0,37mg.L⁻¹), BCA i (39,61±0,19mg.L⁻¹), BCA ii (47,25±0,15mg.L⁻¹) e BCA iii (53,93±0,06mg.L⁻¹). O aumento foi de 19,9% no método de Lowry, 10,5% no BCA i, 21,9% no BCA ii e 27,9% no BCA iii, em relação às concentrações obtidas na lagoa facultativa 1 (lf1). Estes aumentos serão discutidos em outra ocasião, quando as concentrações de proteínas serão comparadas com outras variáveis físicas, químicas e biológicas.

A reprodutibilidade de cada método foi testada em quintuplicata (Lowry, Biureto, Bradford e BCA) e foram comparadas por meio de análise estatística descritiva básica (Figuras 2 e 3). O método do Biureto apresentou maiores desvios padrão (1,84, af). Os menores desvios padrão foram obtidos no método BCA iii, sendo o mínimo 0,06 na lagoa facultativa 2 (lf2).

Tabela 1 – Parâmetros analíticos para determinação de proteína

Método	Equação de regressão	Coefficiente de regressão (r ²)
Lowry	A = 0.0031C	0.9914
Biureto	A = 0.0018C	0.9910
Bradford	A = 0,0102C	0,9111
BCA (i)	A = 0.0061C	0.9957
BCA (ii)	A = 0.0088C	0.9922
BCA (iii)	A = 0.0168C	0.9891

Padrão: soro albumina bovina (BSA)

A: absorbância; C: concentração.

BCA (i): Temperatura ambiente/2h; (ii): 37°C/30 min; (iii): 60°C/30 min.

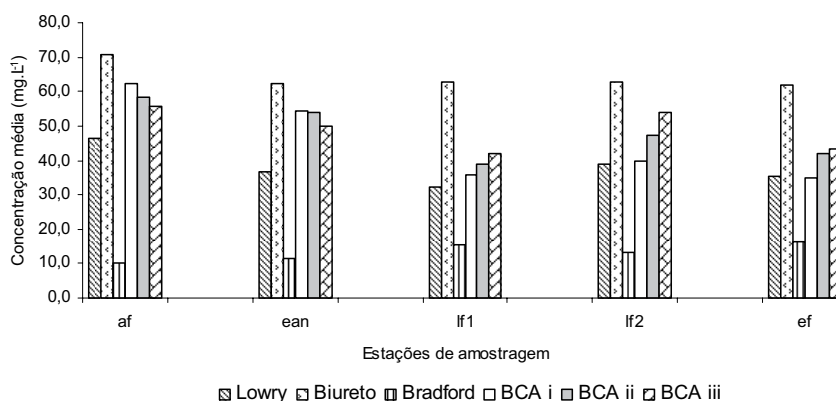


Figura 1 - Concentrações médias de proteína obtidas pelos diferentes métodos analisados

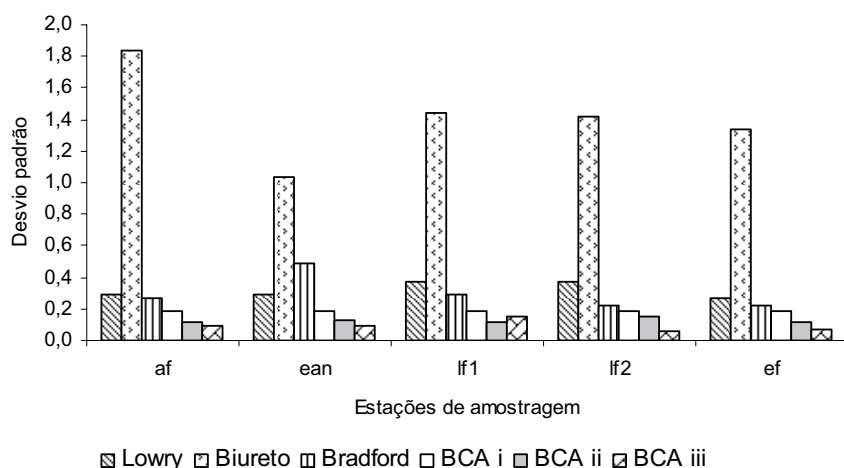


Figura 2 – Desvio-padrão para os diferentes métodos analisados

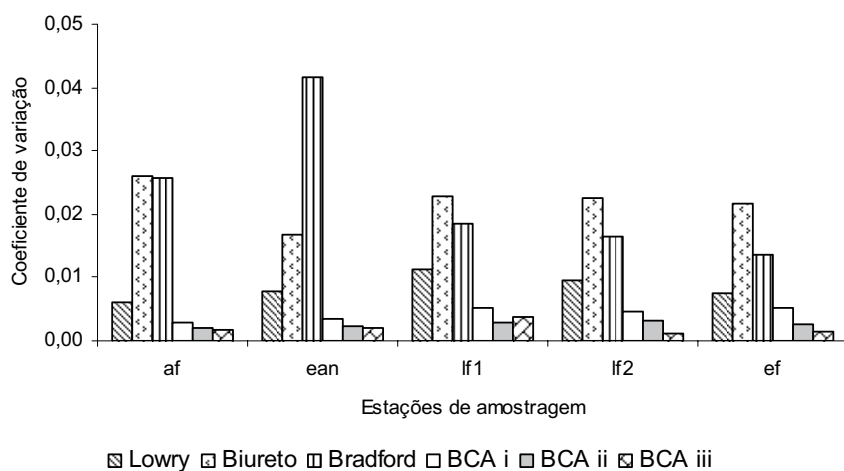


Figura 3 - Coeficiente de variação para os diferentes métodos analisados

Os coeficientes de variação foram maiores nos testes Biureto e Bradford. O valor máximo obtido foi 0,0416 no método de Bradford, no efluente da lagoa anaeróbia (ean). Nos outros métodos, os coeficientes foram menores, indicando boa reprodutibilidade dos mesmos. O valor mínimo (0,0011) foi obtido na lagoa facultativa 2 (lf2), no método do BCA iii.

Leituras de absorbância em diferentes intervalos de tempo foram feitas para analisar a estabilidade do complexo formado em cada método (Figura 4). Para o método de Lowry, ficou evidente que é necessário aguardar 20 minutos após a adição do último reagente para que ocorra a formação do complexo. Após este tempo, as absorbâncias diminuem e, conseqüentemente, a estimativa ficará subestimada. No afluente bruto, a absorbância com 20 minutos foi de $0,145 \pm 0,001$ e com 30 minutos diminuiu para $0,142 \pm 0,001$, significan-

do perda na estabilidade do complexo formado.

A diminuição na absorção no método Biureto no afluente bruto foi de $0,011 \pm 0,003$, mas equivale a aproximadamente $6,22 \pm 1,99 \text{ mg.L}^{-1}$. O complexo formado no método de Bradford apresentou diminuição de $0,004 \pm 0,003$ unidades na absorbância de afluente bruto após 10 minutos, porém a diferença em termos de concentração de proteínas é equivalente a $0,41 \pm 0,27 \text{ mg.L}^{-1}$. Ou seja, no método do Biureto, as leituras devem ser realizadas após o término do ensaio, já para o método de Bradford, não se observou diferença significativa nos valores de absorbância medidos em diferentes horários, visto que a diminuição foi próxima ao desvio-padrão.

No método BCA, as leituras para todas as incubações podem ser realizadas após o final do período de incubação ou mesmo após 10 minutos. Neste teste,

as absorbâncias obtidas após 10 e 15 minutos de incubação não diminuíram revelando que o complexo apresentou boa estabilidade. De acordo com Smith et al (1985), o desenvolvimento da cor procede-se imediatamente, até mesmo à temperatura ambiente, mas pode ser acelerado pela incubação em banho à temperatura constante. Este fato não foi observado para estas amostras, que mesmo acelerando a reação com incubações, não houve diferenças nas absorbâncias.

Através da análise de variância (Tabela 2), ficou evidente que as concentrações de proteínas obtidas em alguns métodos são significativamente diferentes. Por esta análise, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os métodos Lowry, Biureto e Bradford; Biureto, BCA i e BCA ii; e Bradford e BCAii. Os métodos com semelhanças significativas ($p > 0,05$) foram Lowry, BCA i, BCA ii e BCA iii; Biureto e Bradford; BCA i, BCA ii e BCA iii. A partir deste resultado e das análises anteriores, escolheu-se o método de Lowry para determinação de proteínas em amostras provenientes de lagoas de estabilização.

Para auxiliar a escolha, foi verificada a presença de substâncias interferentes através da adição de padrão soro albumina bovina à amostra. Segundo Zaia et al (1998), estas substâncias interferentes podem aumentar a absorbância do branco, reduzir a absorvidade específica ou formar precipitado. Na Figura 5 pode ser observado o coeficiente angular obtido da análise de regressão linear com padrão soro albumina (\diamond) e adição deste padrão à amostra (\square). Os coeficientes angulares para padrão (0,0027) e adição de padrão à amostra (0,0026) não apresentaram diferenças significativas evidenciando a ausência de substâncias interferentes na amostra para o método escolhido (método de Lowry). Este resultado corroborou aquele obtido por Raunkjaer et al (1994). Os autores obtiveram coeficiente angular para o padrão de 0,00258 e para amostra com padrão de 0,00256 utilizando soro albumina bovina. As substâncias que poderiam interferir na quantificação de proteínas através deste método seriam compostos fenólicos, lipídeos, detergentes, carboidratos, cálcio, magnésio entre outras (Peterson, 1979; Zaia et al, 1998). Estas podem estar presentes em baixas quantidades.

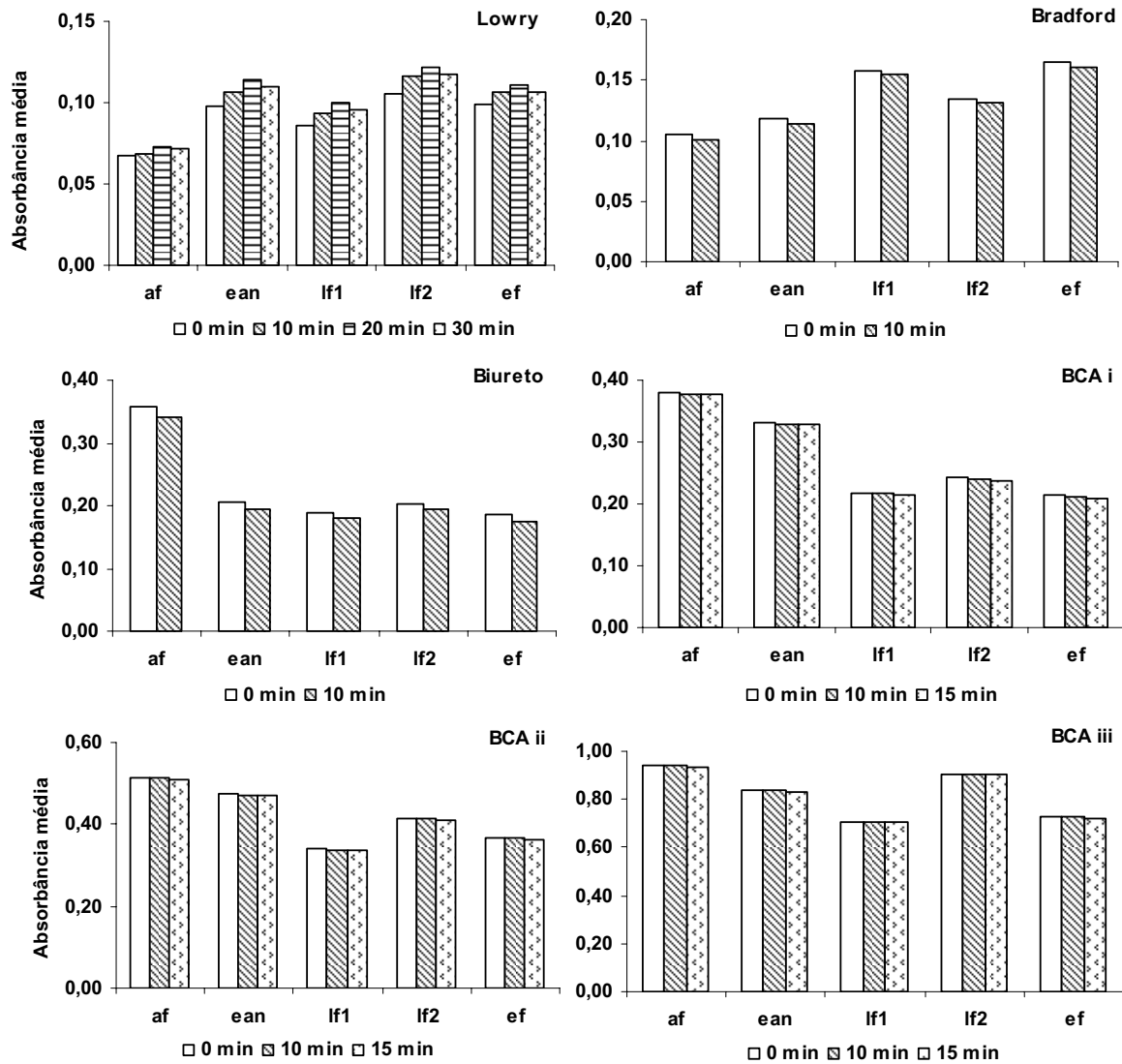


Figura 4 – Absorbâncias médias em diferentes tempos para cada método espectrofotométrico

Tabela 2 – Análise de variância entre os métodos testados

	Lowry	Biureto	Bradford	BCA i	BCA ii
Lowry					
Biureto	0,01*				
Bradford	0,03*	0,35			
BCA i	0,32	0,03*	0,06		
BCA ii	0,42	0,02*	0,04*	0,40	
BCA iii	0,15	0,09	0,16	0,27	0,19

* = $p < 0,05$.

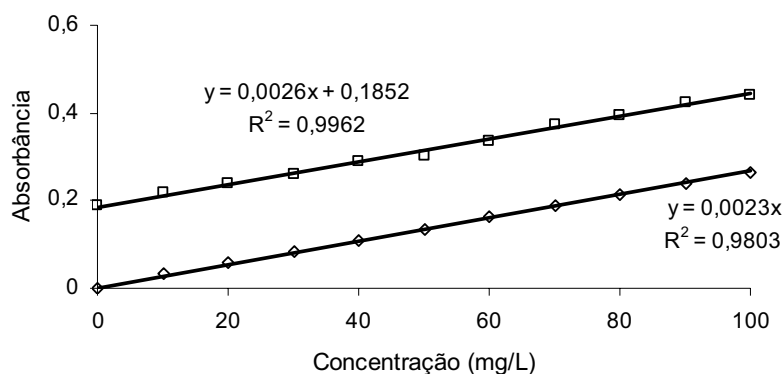


Figura 5 - Absorbância do padrão (◇) e adição de padrão à amostra (□)

DISCUSSÃO

Diversos fatores devem ser analisados antes da escolha da metodologia adequada para determinação de proteínas totais em qualquer tipo de amostra. Segundo Zaia et al (1998), o principal deles é o conhecimento mais preciso possível dos constituintes da amostra e de suas concentrações, o que facilita na identificação de possíveis interferentes e ajuda na escolha do método mais apropriado.

No caso de amostras de esgoto sanitário isto se torna praticamente impossível visto a quantidade e a diversidade dos compostos presentes, indicando que outros itens precisam ser testados, como por exemplo, uréia, detergentes, entre outros.

O método de Lowry foi o escolhido para este tipo de amostra, pois além de ter reagente específico, mede, de acordo com Lowry et al (1951), moléculas tão pequenas quanto os dipeptídeos, revelando ser um ensaio interessante, pois não superestima as concentrações de proteínas. Além disso, os coeficientes angulares para o padrão (0,0027) e para a adição de padrão à amostra (0,0026) não apresentaram diferenças significativas evidenciando a ausência de interferentes nesta amostra. Este resultado corrobora aquele obtido por Raunkjaer et al (1994). Os autores obtiveram coeficiente angular para o padrão de 0,00258 e para amostra com padrão de 0,00256 utilizando soro albumina bovina. As substâncias que poderiam interferir na quantificação de proteínas através deste método seriam compostos fenólicos, lipídeos, detergentes, carboidratos, cálcio, magnésio entre outras (Peterson, 1979; Zaia et al, 1998).

Tal método apresentou boa reprodutibilidade, ou seja, desvio-padrão e coeficiente de variação baixos, custo moderado e curva padrão linear. Neste estudo, obteve-se desvio padrão de 0,37% e coeficiente de variação de 0,0062. Raunkjaer et al. (1994) obtiveram desvio-padrão de 3,8%, enquanto Itzhaki e Gill (1964) obtiveram 2% em relação ao valor médio de cinco alíquotas de solução de proteínas, para o método de Lowry. Além disso, este método requer baixa quantidade de amostra, é de fácil execução e tem pouca suscetibilidade à interferentes visto que possui reagente específico. Esta escolha corroborou os resultados obtidos por Raunkjaer et al (1994). Os autores afirmaram que entre os possíveis métodos para determinação de proteínas, o de Lowry pareceu ser o mais acurado e preciso para quantificar proteínas em esgoto.

Mesmo com custo de reagentes sendo economicamente viável, não se optou por usar o método do Biureto devido ao fato de medir outros compostos além de proteínas, como aqueles que contêm grupos $-CSNH_2$, $-C(NH)NH_2$, $-CH_2NH_2$, $-CRNH_2$, $-CH(OH)CH_2NH_2$, $-CHNH_2CH_2OH$, $-CHNH_2CH(OH)$ além de $-OC(NH_2)NHCONH_2$ (Gaspar, 1984). Talvez esta característica tenha sido a responsável pela superestimação das concentrações obtidas com este método. Além disso, a reprodutibilidade deste método foi baixa, com os maiores desvios-padrão (1,84) e coeficientes de variação (0,0261). Apesar deste método ter bandas de absorção na região de 310 e 540nm, não foi obtido leitura a 540nm. As leituras foram feitas apenas a 310nm, região que apresenta maior absorção de compostos que podem causar interferência, superesti-

mando as concentrações de proteínas, como por exemplo, uréia, detergentes, lipídeos, entre outros.

O método de Bradford não foi escolhido apesar do baixo custo de reagentes e dos baixos desvios-padrão, porque detecta somente moléculas de proteínas com 8-9 ligações peptídicas (Bradford, 1976) e, portanto, subestima as concentrações de proteínas. Nesta pesquisa, a maior concentração obtida com o método de Bradford foi $16,18 \pm 0,09$ mg.L⁻¹, enquanto que no método de Lowry, a maior concentração foi $46,58 \pm 0,13$ mg.L⁻¹.

O método BCA mede peptídeos e proteínas em solução, os quais têm no mínimo três aminoácidos, isto é, duas ligações peptídicas (Fonkwe e Singh, 1996). Este método apresentou boa reprodutibilidade, reagente específico, porém alto custo. Como o mecanismo do método inclui a redução de Cu²⁺ a Cu⁺, algumas substâncias como ácido úrico e glicose interferem nas determinações (Smith et al, 1985). Estas substâncias estão presentes no esgoto sanitário e contribuem para interferência na determinação de proteína.

O método de determinação proteína bruta, calculada a partir das concentrações de NTK, não foi aplicado para as determinações de proteína em lagoas de estabilização, pois superestima as concentrações destas devido a medição de outros compostos como uréia, aminoácidos e ácidos húmicos, também presentes em amostras de esgoto sanitário. Como nem todo nitrogênio está na forma protéica, o método pode superestimar as concentrações de proteína, principalmente para amostras que contenham altos níveis de compostos não-protéicos (Salo-Väänänen e Koivistoinen, 1996; Raunkjaer et al, 1998), como as provenientes de lagoas de estabilização. Apesar de vários autores (Sridhar e Pillai, 1973; James, 1995; Casal et al, 2000;) terem utilizado este método para determinar proteína bruta em diferentes amostras (alimento, lodo, bactérias, águas residuárias e macrófitas), o pressuposto é que todo o nitrogênio presente está na forma de proteína, o que nem sempre é verdade.

Os métodos Biureto e proteína bruta requerem altas concentrações de proteína na amostra e são indicados para análises de soluções puras (Raunkjaer et al, 1994), que comparativamente com águas residuárias, são mais elevadas e sem interferentes.

O conhecimento detalhado da concentração de proteínas em amostras de efluentes sanitários auxilia na determinação de parâmetros para projeto e eficiência de tratamento de um sistema, já que estas macromoléculas são os principais constituintes da matéria orgânica. De acordo com os resultados obtidos, fica clara a necessidade de testes metodológicos entre diferentes tipos de amostras, principalmente ambientais. Quando possível, o ideal é que as concentrações de todas as substâncias presentes sejam determinadas. Com as diferentes vantagens e poucas substâncias interferentes nesta amostra, o método de Lowry foi escolhido para determinação de proteínas amostras provenientes de lagoas de estabilização construídas para o tratamento de efluentes sanitários.

CONCLUSÕES

Mesmo tendo apresentado curvas padrão lineares, alguns métodos não foram indicados para este tipo de amostra por apresentarem baixa reprodutibilidade e por superestimarem as concentrações de proteínas. Isto foi o que ocorreu com os métodos do Biureto e da proteína bruta.

Outros métodos, mesmo apresentando boa especificidade, têm alto custo de reagentes, como por exemplo, o método BCA, que apresentou vantagens tão boas quanto o método de Lowry, porém quando se analisa custos de reagentes ele fica em desvantagem.

O método de Bradford resultou em concentrações subestimadas, pois requer proteínas na forma de macromoléculas para que ocorra a determinação e águas residuárias contêm compostos de diferentes tamanhos. Portanto, não foi considerado ideal para amostras de lagoas de estabilização.

O método de Lowry revelou ser o mais adequado para determinação de proteínas em amostras de lagoas de estabilização contendo predominantemente esgoto sanitário. Este método apresentou boa reprodutibilidade e reagente específico.

A análise de adição padrão à amostra confirmou a escolha. Os resultados revelaram que há poucas substâncias interferentes na amostra para este método, visto que a adição de padrão à amostra não provocou alteração na curva, o que o torna apropriado para amostras provenientes de lagoas de estabilização que tratam esgoto sanitário.

As proteínas podem ser fatores limitantes ao tratamento de esgoto, visto que concentrações em torno de 300 mg.L⁻¹ podem causar problemas durante o tratamento anaeróbio. Elas podem ser responsáveis pela cinética de degradação da DQO remanescente em reatores (Gadelha, 2000; Tommaso et al, 2002). Daí a importância de sua determinação em estações de tratamento de esgoto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Pesquisa de Nível Superior – Ministério da Educação e Cultura) pela bolsa de estudo e à FAPESP (Processos 01/08469-0 e 02/00684-2) pelo suporte financeiro. Também à Sabesp pelo apoio nas pesquisas de campo.

REFERENCIAS

- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19th Edition, 1999.
- BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., v. 72, p. 248, 1976.
- CASAL, J. A.; VERMAAT, J. E.; WIEGMAN, F. *A test of two methods for plant protein determination using duckweed*. Aquatic Botany, v. 67, p. 61-67, 2000.
- FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. *Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis*. Process Biochem., v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.
- GADELHA, R. F. *Remoção de matéria orgânica específica de um sistema de flotozonização como pós tratamento de reatores anaeróbios*. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 136 p., 2000.
- GÁSPAR, L.; *General laboratory methods*. In: István, K. *Methods of Protein Analysis*, Trad. por Chalmers, R. A. John Wiley & Sons, Chap. 2, 1984.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*. J. Biol. Chem., v. 177, p. 751-766, 1949.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. *A Micro-Biuret method for estimating proteins*. Anal. Biochem, n. 9, p. 401-410, 1964.
- JAMES, C. S. *Analytical Chemistry of Foods*. Blackie Academic & Professional, 1995.
- LOWRY, O. H. et al. *Protein measurement with the Folin-Phenol reagent*. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265-276, 1951.
- PETERSON, G. L. *Review of the Folin-phenol protein quantitation method of Lowry, rosebrough, Farr and Randall*. Anal. Biochem., v. 100, p. 201-220, 1979.

RAUNKJAER, K.; HVIITVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P. H. *Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater*. Water Res., v. 28, n. 2, p. 251-262, 1994.

SALO-VÄÄNÄEN, P. P.; KOIVISTOINEN, P. E. *Determination of protein in foods: comparison of net protein and crude protein (Nx6.25) values*. Food Chem., v. 57, p. 27-31, 1996.

SMITH, P. K. et al. *Measurement of protein using Bicinchoninic Acid*. Anal. Biochem., v. 150, p. 76-86, 1975.

SRIDHAR, M. K. C.; PILLAI, S. C. *Proteins in wastewater and wastewater sludges*. JWPCF, v. 45, n. 7, p. 1595-1600, 1973.

STICKLAND, L. H. *The determination of small quantities of bacteria by means of biuret reaction*. J. Gen. Microbiol. v. 5, p. 698-703, 1951.

TOMMASO, G. et al. *Influence of multiple substrates on anaerobic protein degradation in a packed-bed bioreactor*. In: VII TALLER Y SIMPOSIO LATINO-AMERICANO SOBRE DIGESTIÓN ANAEROBIA. Mérida, Yucatán, México, p. 43-46, 2002.

TORRES, P. *Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários*. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 185 p. 1992.

VIDAL, G. et al. *Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters*. Bioresour. Technol., v. 74, p. 231-239, 2000.

WILSON, K.; WALKER, J. M. *Principles and techniques of practical biochemistry*. 4th New York, 586 p. 1995.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*. Quim. Nova, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

Endereço para correspondência:

Adriana Cristina Poli Miwa
Departamento de Hidráulica e Saneamento
Escola de Engenharia de São Carlos - USP
Av. Trabalhador São-carlense, 400 Centro
13566-590 São Carlos - SP - Brasil
Tel.: (16) 3373-9427
E-mail: adriana_miwa@yahoo.com.br