

I-368 - ANÁLISE DA ATIVIDADE FLOCULANTE DO BIOPOLÍMERO ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO EM SOLUÇÃO COLOIDAL

Ana Rosa Aon Cardoso Fernandes⁽¹⁾

Engenheira Ambiental pela Universidade do Estado de Minas Gerais. Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Estadual Paulista. Doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Nilton Pereira Alves Granado⁽²⁾

Químico pesquisador

Fábio Cavassam Grego⁽³⁾

Químico

Suzan da Silva Lessa⁽⁴⁾

Assistente de Suporte Acadêmico II

Endereço⁽¹⁾: Rua Hamilton Rego Mello, sn, It 11, casa 2, PaioI, Guapimirim-RJ e-mail: anarosa_acf@yahoo.com.br

RESUMO

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é uma homopoliamida composta por unidades de D- e L- de ácido glutâmico. Trata-se de biopolímero aniônico que possui propriedades como solubilidade em água, atoxicidade, além de ser comestível e biodegradável. Devido a estas propriedades, possui muitas aplicações ambientais, dentre elas, o uso como incremento ao processo de floculação, no tratamento de água. O ácido γ -poliglutâmico pode ser produzido, através da fermentação da soja utilizando-se da bactéria *Bacillus subtilis* encontrada em alimentos como o natto, consumido como iguaria no Japão. Grande parte das aplicações de biopolímeros está diretamente envolvida com seu potencial de resposta às alterações do meio em que se encontram dissolvidos. Uma abordagem voltada ao entendimento das alterações estruturais, conformações e associações de cadeias poliméricas apresenta alto interesse científico, assim como aplicações práticas. O objetivo deste trabalho desse estudo fundamentou-se em analisar as propriedades floculantes do ácido γ -poliglutâmico em água sintética submetida à variadas condições. A atividade floculante foi incrementada pela adição de íons de alumínio e ferro, apresentando maior eficiência ao acrescentar sulfato de alumínio, na concentração de 15 mM, em pH próximo à neutralidade, na concentração de γ -PGA igual a 10 mg L⁻¹. No caso do PG α 21Ca, a atividade floculante foi estimulada pela adição do ácido γ -poliglutâmico à solução coloidal, demonstrando maior estabilidade dos focos formados.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido γ -poliglutâmico, natto, biofloculante, Auxiliares de Floculação.

INTRODUÇÃO

Para abastecimento público se faz necessário que os constituintes das águas naturais que são prejudiciais à saúde sejam removidos ou tenham sua concentração reduzida (FERNANDES, 2017). Polímeros sintéticos são utilizados no tratamento de água para abastecimento público como auxiliares de floculação e são empregados, essencialmente, para aumentar a velocidade de sedimentação e reduzir a ação de forças cisalhantes nos focos, diminuir a dosagem de coagulante primário e como auxiliares de filtração (DANTAS; DI BERNARDO, 2005).

Ácido γ -poliglutâmico é um produto exclusivo do metabolismo microbiano, obtido por síntese enzimática principalmente pelo *Bacillus subtilis*, sendo que uma metodologia para síntese química do γ -PGA é inexistente até o momento (SHIH; VAN, 2001; NAGAI; TAMANG, 2010).

No tratamento de água, o γ -PGA pode ser usado como biofloculante ou como quelante de metais, removendo metais traços e radionucleotídeos (SHIH, VAN, 2001). Devido à sua solubilidade em água, o γ -PGA pode substituir floculantes comerciais, como poliacrilamida e ácidos poliacrílicos, que geram carga poluente (ARPAL, 2004). Devido a essa característica, o uso do γ -PGA tem sido descrito por diversos pesquisadores no

tratamento de água para abastecimento público. Nesses estudos, o incremento da atividade floculante ocorre quando cátions multivalentes são adicionados ao sistema (YOKOI et al., 1996).

O ácido γ -poliglutâmico ainda é pouco explorado no saneamento devido ao seu alto valor comercial e baixa escala de produção, já que é obtido apenas através de minuciosos processos biológicos, regidos por bactérias sensíveis a alterações do meio, o que pode encarecer a produção do biopolímero. Contudo, esse trabalho buscou apresentar a elevada eficiência do γ -PGA, mesmo em baixas concentrações.

Campos et al. (2016) analisaram a eficácia de três produtos comerciais aplicados em tratamento de água: o sulfato de alumínio, o policloreto de alumínio e um biofloculante comercial à base de ácido γ -poliglutâmico, que reporta em sua composição elementos inorgânicos, resultando, comparativamente, melhor eficiência na remoção dos parâmetros de cor e turbidez para o produto com γ -PGA em sua formulação.

O desenvolvimento desse trabalho contou com o apoio e a participação da Instituto Granado de Poliacrilonitrila (IGTPAN).

OBJETIVO

O trabalho estruturou-se como uma avaliação em escala laboratorial da capacidade de formação de flocos, aqui denominada como atividade floculante, do γ -PGA em solução coloidal artificial sob ação de coagulantes catiônicos, objetivando potencializar a remoção de coloides presentes na água. Sob apelo ambiental da redução no uso de coagulantes inorgânicos, como o sulfato de alumínio, e a de polímeros sintéticos no tratamento de água.

METODOLOGIA UTILIZADA

O cálculo da atividade floculante foi realizado com adaptações de Yokoi et al. (1996). A metodologia foi baseada na capacidade de floculação do caulim, que é um minério composto por silicatos hidratados de alumínio, responsável por causar a turvação da água artificial. O teste foi realizado avaliando a influência da variação da concentração de γ -PGA extraído do natto, um alimento de soja fermentada produzido e consumido principalmente no Japão, que apresenta em sua constituição soja e *Bacillus subtilis*.

A metodologia de extração foi adaptada de Kunioka (1997) e Brito (2014), utilizando três diferentes solventes no processo de precipitação do ácido: metanol, etanol e acetona, seguido da quantificação pela complexação por brometo de cetiltrimetilamônio pela construção de curva em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 400 nm (Hach, modelo DR3900), pela metodologia de Kanno; Takamatsu (1995). Sob os parâmetros de floculação também foi avaliada a interferência da variação de valores de pH, e o uso de diferentes coagulantes em variadas concentrações.

O cálculo responsável por fornecer o valor da atividade floculante em cada caso consiste na leitura em espectrofotômetro, na faixa de 550 nm, como indicado abaixo:

$$\text{Atividade Floculante} = \frac{1}{(DO_{550})_a} - \frac{1}{(DO_{550})_b}$$

equação 1

A taxa de floculação foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de floculação} = \left[\frac{(DO_{550})_b - (DO_{550})_a}{(DO_{550})_b} \right] \times 100$$

equação 2

Onde:

(DO₅₅₀)_a = Densidade óptica da amostra a 550 nm;

(DO₅₅₀)_b = Densidade óptica do branco a 550 nm.

ATIVIDADE FLOCULANTE γ -PGA COM VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO

Em solução de 4,5 mM de CaCl_2 e 5 g L^{-1} de caulim sob agitação magnética lenta, adicionou-se γ -PGA nas seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mg L^{-1} de γ -PGA, atingindo 9,3 mL de solução após adicionar o biopolímero. Aumentou-se a rotação do agitador magnético por três segundos, com intuito de permitir os choques entre as moléculas do biopolímero e os coloides. A solução foi então transferida para tubo de centrífuga, mantendo em repouso por cinco minutos para sedimentação dos flocos formados. Em seguida, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de 3 mL de sobrenadante retirado, cuidadosamente, com auxílio de pipeta de Pasteur. O procedimento foi realizado, individualmente, para cada concentração.

ATIVIDADE FLOCULANTE γ -PGA EM DIFERENTES FAIXAS DE PH

Adotando-se a concentração de 10 mg L^{-1} para γ -PGA, a metodologia para atividade floculante foi reproduzida ajustando-se, previamente, o pH da solução de 4,5 mM de CaCl_2 e 5 g L^{-1} de caulim, nas faixas de 3-9. O ajuste do pH foi realizado com soluções de HCl 1 M e NaOH 1 M.

ATIVIDADE FLOCULANTE γ -PGA UTILIZANDO SULFATO DE ALUMÍNIO E CLORETO DE FERRO COMO COAGULANTES

Como o processo de floculação é dependente da ação prévia de coagulante na neutralização das cargas coloidais, o cálculo da atividade floculante foi realizado sob ação de dois coagulantes, sulfato de alumínio e cloreto de ferro. Essa análise foi adaptada de Bhunia et al. (2012) e teve como intuito avaliar a resposta da atividade do γ -PGA sob ação conjunta de coagulantes, em diferentes faixas de concentração molar.

Preparou-se solução com água ultrapura de 5 g L^{-1} de caulim e, em seis béqueres diferentes, pesou-se sulfato de alumínio nos seguintes valores: 0,00342; 0,0079; 0,0159; 0,0318; 0,0477; e 0,064 g, resultando, respectivamente, nas concentrações: 1; 2,5; 5; 10; 15 e 20 mM, após adicionar a solução de caulim. Manteve-se a solução em agitação lenta para evitar a sedimentação do material, ajustouse o pH a 7 com NaOH 1 M, sendo então acrescentado o γ -PGA (10 mg L^{-1}) com volume final de 9,3 mL e o acréscimo do extrato de γ -PGA foi realizado através do uso de micropipeta, a partir de solução padrão do biopolímero, respeitando a concentração de 10 mg L^{-1} . A seguir, aumentou-se a rotação do agitador por três segundos transferindo-se, imediatamente, a solução para tubo de centrífuga, que foi deixado em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida efetuou-se leitura de 3 mL de sobrenadante, no espectrofotômetro na faixa de 550 nm.

O mesmo procedimento foi realizado para o cloreto de ferro, onde as pesagens nos béqueres foram de: 0,0025; 0,0063; 0,0125; 0,0251; 0,0377 e 0,0503 g resultando, para volume de 9,3 mL, respectivamente, concentrações: 1; 2,5; 5; 10; 15 e 20 mM.

RESULTADOS OBTIDOS E ANÁLISES

Primeiramente, buscou-se determinar a concentração de ácido γ -poliglutâmico que apresentasse maior eficiência no processo de floculação, através da melhor atividade floculante, para em seguida adequar os demais parâmetros potenciais de floculação.

O comportamento apresentado pelo γ -PGA extraído da acetona, etanol e metanol, foi similar, como representado pela Figura 1. O tempo de sedimentação adotado foi de cinco minutos para os três solventes. Nesse período, o γ -PGA extraído do metanol e da acetona foram os que apresentaram melhor atividade floculante.

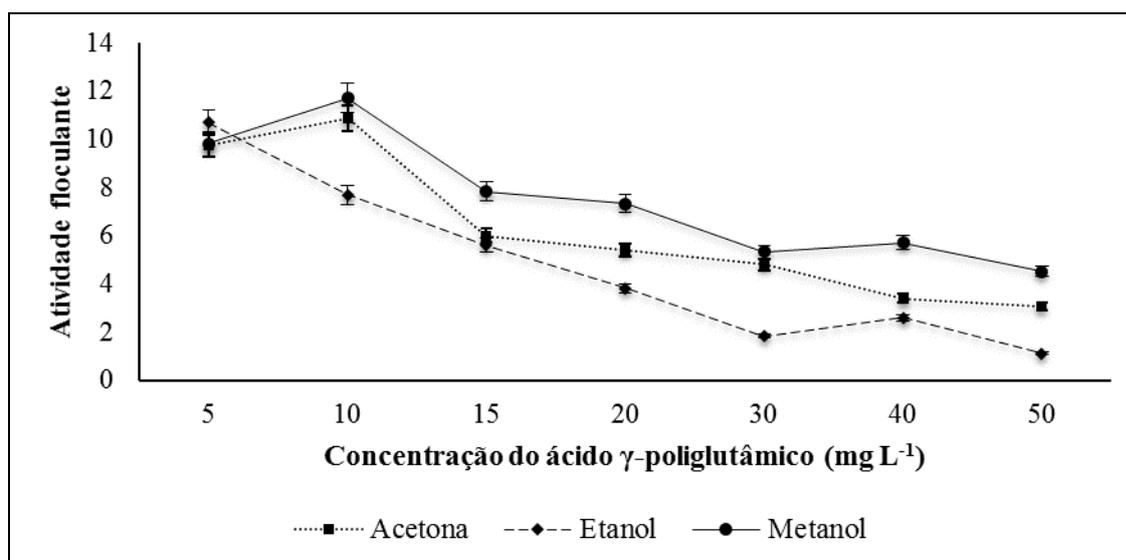


Figura 1: Comportamento apresentado pela variação da concentração de ácido γ -poliglutâmico destinado ao processo de floculação utilizando diferentes solventes no processo de extração do natto

O decréscimo nos valores de atividade floculante com o aumento da concentração do biopolímero ao sistema coloidal se deve ao fato de que a adsorção na superfície das partículas pelo polímero se dá através da estabilização estérica, que é dependente da distância entre as superfícies sólidas adsorvidas e espessura da camada de polímero adsorvido (NUNES, 2012). Se essa distância for menor que a espessura, ocorre um mecanismo de interpenetração e compressão das cadeias que podem ser repelidas, já que excesso de polímero adsorvido torna as partículas estericamente dispersas (HUNTER, 2001; OLIVEIRA, RUBIO; 2011).

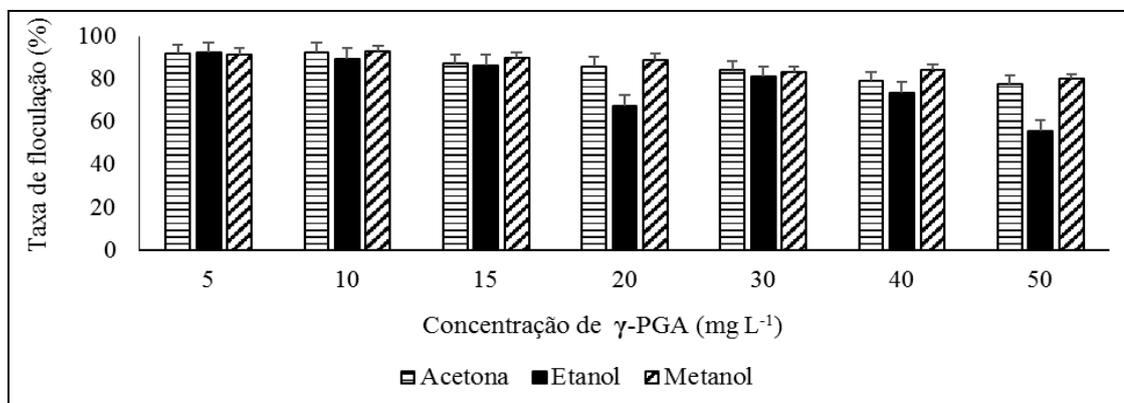


Figura 2: Taxa de floculação em porcentagem para diferentes concentrações de γ -PGA para diferentes solventes de extração

ATIVIDADE FLOCULANTE EM DIFERENTES FAIXAS DE PH

Para diferentes faixas de pH o ácido γ -poliglutâmico apresenta sua cadeia em conformação estrutural de formas distintas. Esse fator é decisivo na formação de flocos, já que interfere nas cargas livres na cadeia que são disponibilizadas para formação das pontes entre os coloides, que viabilizam o processo de floculação. Em pH ácido inferior a 3, o γ -PGA se encontra na forma ácida e apresenta caráter hidrofóbico devido às fortes ligações de hidrogênio, portanto, os testes em pH inferior a 3 não foram realizados.

Para temperatura ambiente de 25°C, em soluções que contenham o biopolímero e apresentem pH ácido (inferior a 4,5) o ácido γ -poliglutâmico encontra-se em conformação de α -hélice, estabilizada por ligações de hidrogênio intramoleculares (KREJTSCHI; HAUSER, 2011).



Em pH maior que 6,5 as moléculas de γ -PGA encontram-se apenas na conformação de cadeia randômica linear, o que confere ao ácido γ -poliglutâmico maior funcionalidade para ligar em sua superfície moléculas catiônicas, conferindo assim, como apresentado pela Figura 3, melhor atividade floculante próximo à neutralidade da solução (HO et al., 2006)

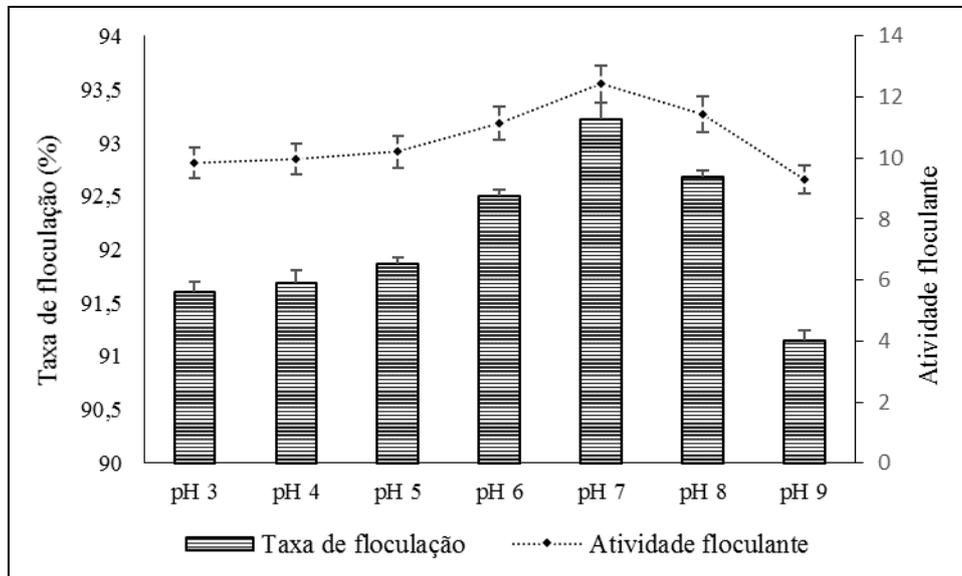


Figura 3: Influência de diferentes faixas de pH na atividade floculante do ácido γ -poliglutâmico

No trabalho de Wu, Ye (2007) foi constatado que os valores do potencial zeta apresentados pelo ácido γ -poliglutâmico são negativos, variando de -18mV a -40 mV do pH 3 ao 10, o que corresponde ao comportamento floculante apresentado pelo γ -PGA ao aumentar o pH do sistema. O aumento contínuo do pH, ultrapassando a faixa de neutralidade no sistema, gera um acréscimo de cargas (OH^-), que irão interferir na dupla camada elétrica dos colóides, e conseqüentemente no processo de floculação (PAVANELLI, 2001)

ATIVIDADE FLOCULANTE VARIANDO COAGULANTE

O processo de floculação é uma etapa conseguinte a coagulação. Primeiro ocorre a neutralização das cargas coloidais, que apresentam naturalmente repulsão entre si, para em seqüência, sejam gerados os flocos. Nas estações de tratamento de água, esse processo se dá com ou sem a ação de polímeros.

Os polímeros atuam no adensamento dos flocos, criando pontes entre os mesmos, ou seja, potencializam o processo de floculação. O acréscimo de íons responde pela neutralização e estabilização dos colóides, para em seguida se ligarem às cargas negativas de grupos carboxílicos residuais no γ -PGA, que são responsáveis pela formação de pontes entre partículas em suspensão. A atividade floculante do γ -PGA é potencializada pela adição de cátions bivalentes e trivalentes, que foi o que ocorreu ao adicionar os sais à solução de ácido γ -poliglutâmico, utilizados na neutralização das cargas do caulim, e floculação dos mesmos.

Previamente, estabeleceu-se o pH ótimo de floculação do ácido γ -poliglutâmico, determinado pela Figura 3, tendo o melhor valor próximo a faixa de neutralidade. Os sais utilizados nesse ensaio respondem por forte acidificação da água, atingindo valores de pH igual a 3 e nesta faixa, não ocorre a floculação. Após a correção do pH com NaOH 1 M, atingindo o valor 7, observou-se alta eficiência no processo de floculação, como representado pela Figura 4.

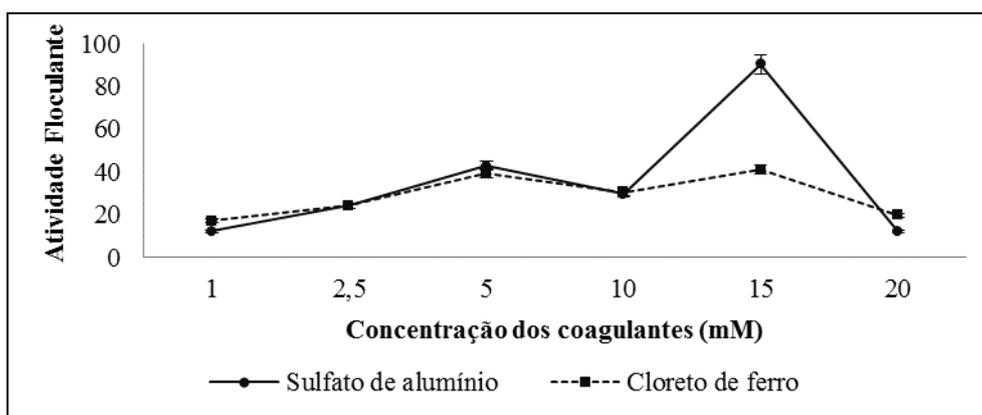


Figura 4 - Atividade floculante do ácido γ -poliglutâmico combinado com sulfato de alumínio e cloreto de ferro em pH 7,0

Na variação de concentração, tanto para o sulfato de alumínio, quanto para o sulfato de ferro, o valor mais representativo para a atividade floculante ocorreu na concentração molar foi 15 mM, sendo que a resposta à atividade floculante foi maior para o sulfato de alumínio. A atividade floculante tende a cair com aumento de coagulantes, já que o excesso na adição de coagulantes trivalentes, como sulfato de alumínio e cloreto férrico resulta na inativação do biofloculante, devido absorção excessiva de Al^{+3} e Fe^{+3} .

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

A atividade floculante utilizando o ácido γ -poliglutâmico foi incrementada pela adição de íons de alumínio e ferro, apresentando maior eficiência ao acrescentar sulfato de alumínio, na concentração de 15 mM, em pH próximo à neutralidade, na concentração de γ -PGA igual a 10 mg L⁻¹.

Constata-se que para atividade floculante, a ionização das cadeias laterais é determinante, e que essa aplicação está diretamente ligada à viscosidade e massa molecular, pH e conformação estrutural da molécula do biopolímero. Sendo que a ionização da cadeia polimérica acima do pH 8, não mais favorecem a floculação.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Granado de Tecnologia da Poliacrilonitrila (IGTPAN) pelo incentivo e financiamento e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de Auxílio à Pesquisa (processo 2015/02650-8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARPAL, J. A. A. Compuestos estequiométricos del ácido poli(γ -glutâmico) com tensoactivos catiónicos. 2004. 183f. Dissertação de Mestrado – Escola técnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona (UPC). Barcelona. 2004.
2. BHUNIA, B. et al. Improved production, characterization and flocculation properties of poly (γ)-glutamic acid produced from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemical Technology*, v.3, n.4, p.389-394, 2012.
3. BRITO, P. N. Produção de ácido gama-poliglutâmico: estudo e otimização do processo utilizando resíduos agroindustriais. 2014. 50 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pósgraduação em Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas. 2014.
4. CAMPOS, V. et al. Physicochemical characterization and evaluation of PGA biofloculant in coagulation-flocculation and sedimentation processes. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, [s.l.], v. 4, n. 4, p.3753-3760, dez. 2016. Elsevier BV.



5. DANTAS, A. B; DI BERNARDO, L. Métodos e técnicas de tratamento de água. v.2. 2. ed. São Carlos: RiMa. 792 p. 2005.
6. FERNANDES, A. R. A. C. MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO EM SUBSTRATO DE SOJA FERMENTADO (NATTO). 2017. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, 2017.
7. HO, G. H; et al. Gamma-Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v.53, n.6, p.1363-1384, 2006.
8. HOUGHTON, J; I; QUARMBY, J. Biopolymers in wastewater treatment. *Current Opinion In Biotechnology*, v.10, n.3, p.259-262, jun. 1999.
9. HUNTER, R J. Foundations of colloid science. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2001. 816 p.
10. KANNO, A.; TAKAMATSU, H. Determination of polyglutamic acid in "Natto" using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on "Natto" part V). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, v.42, p.878-886, 1995.
11. KUNIOKA, M. Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.47, n.5, p.469-475, may 1997.
12. KREJTSCHI, C; HAUSER, K. Stability and folding dynamics of polyglutamic acid. *Journal of European Biophysics*, v. 40, n.5, p. 673-685, 2011.
13. NAGAI, T.; TAMANG, J. Fermented Legumes: Soybean and Non-Soybean Products, In: *Fermented Foods and Beverages of the World*, J. Tamang & K. Kailasapathy, (Eds.), pp. 191224, CRC Press, ISBN 978-1-4200-9495-4, Boca Raton, FL, 2010.
14. NUNES, A. F. Utilização de polímeros à base de acrilamida na remoção de cobre do meio aquoso. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.
15. OLIVEIRA, C; RUBIO, J. Mecanismos, técnicas e aplicações da agregação no tratamento mineral e ambiental. Rio de Janeiro: Cetem/mct, 2011. 69 p.
16. PAVANELLI, G. Eficiência de diferentes tipos de coagulantes na coagulação, floculação e sedimentação de água com cor e turbidez elevada. 2001. 233 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
17. SALEHIZADEH H; VOSSOUGH, M; ALEMZADEH, I. Some investigations on biofloculant producing bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, v.5, n.1, p.39-44, abr. 2000.
18. SHIH, I.L; VAN Y.T. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*, v.79, n.3, p.207-225, 2001.
19. TAKEDA, M; KOIZUMI, J. I., MATSUOKA, H., HIKUMA, M. Factors affecting the activity of a protein biofloculant produced by *Nocardia amarae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.74, n.6, p.408-409, 1992.
20. YE, Y. et al. High impact strength epoxy nanocomposites with natural nanotubes. *Polymer*, v. 48, n. 21, p. 6426-6433, 2007.
21. YOKOI, H. et al. Flocculation properties of poly(γ glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. *Journal Fermentation of Bioengineering*, v.82, n.1, p. 84-87, 1996.
22. WU, J; YE, H. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate. *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 42, n. 7, p.1114-1123, jul. 2007.