

ANA ROSA AON CARDOSO FERNANDES

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO EM
SUBSTRATO DE SOJA FERMENTADO (NATTO)**

Sorocaba
2017

ANA ROSA AON CARDOSO FERNANDES

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO EM
SUBSTRATO DE SOJA FERMENTADO (NATTO)**

Dissertação apresentada como requisito, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Ciência e Tecnologia, na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental

Orientadora: Prof^a Dr^a Valquíria Campos

Sorocaba

2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia – Câmpus de Sorocaba

Fernandes, Ana Rosa Aon Cardoso.

Extração e caracterização de ácido γ -poliglutâmico em substrato de soja fermentado (natto) / Ana Rosa Aon Cardoso Fernandes, 2017.

96 f.: il.

Orientador: Valquíria de Campos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba), 2017.

1. Biopolímeros. 2. Extração por solventes. 3. Soja. 4. Bacillus subtilis. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba). II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **Extração e caracterização de ácido γ -poliglutâmico em substrato de soja fermentado (*natto*)**

AUTORA: ANA ROSA AON CARDOSO FERNANDES

ORIENTADORA: VALQUIRIA DE CAMPOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Profa. Dr. VALQUIRIA DE CAMPOS
Engenharia Ambiental / UNESP-Sorocaba

Prof. Dr. ISAAC JAMIL SAYEG
Geologia Sedimentar e Ambiental / USP

Prof. Dr. NATAN DE JESUS PIMENTEL FILHO
Centro de Ciências da Natureza / UFSCar, Campus Lagoa do Sino

Sorocaba, 09 de fevereiro de 2017

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais e ao meu irmão, dedico este trabalho.
Vocês são o incentivo, que me impulsiona a caminhar.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Ciência e Tecnologia, *campus* Sorocaba, através do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais.

À Prof^a Dr^a Valquíria Campos pela orientação e por todo meu crescimento acadêmico, me desafiando e ensinando a buscar o melhor em mim.

Ao Instituto Granado de Tecnologia da Poliacrilonitrila (IGTPAN) e a seu presidente, M^c Nilton Pereira Alves Granado, pela bolsa de estudo concedida e suporte, para execução da pesquisa.

À Quimlab Produtos Científicos Ltda. e a sua equipe de profissionais, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de Auxílio à Pesquisa (processo 2015/02650-8).

Aos meus pais, por serem os maiores incentivadores em todas as minhas decisões, mesmo abrindo mão da minha presença em vários momentos. Obrigada por serem quem são, por todo cuidado e credibilidades depositados. Vocês são minha base e exemplo!

Ao meu irmão, pelo imensurável amor e capacidade de acreditar no meu potencial, obrigada por ser tão maduro e me iluminar sempre que não consegui enxergar com clareza. Obrigada por despertar meu melhor.

Ao Luan, por todo companheirismo, por alimentar de confiança e sempre lembrar da minha capacidade, nos momentos que me faltaram forças. Você é fundamental!

Família grande impossibilita citar nomes. Mas agradeço aos meus familiares, cada um ao seu jeito, seja em torcida, apoio ou oração. Em especial, à minha madrinha por todo carinho.

Aos profissionais de laboratório, em especial à Suzan Lessa da UNESP e ao Fábio Souza, da Quimlab, pela paciência em me auxiliar e me introduzir ao mundo da Química, vocês foram essenciais ao desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho da UFSCar, ao Prof. Dr. Isaac Jamil Sayeg da USP e a Prof.^a Dra. Anne Cardoso Neves, pelas orientações e colaborações a esse estudo.

Aos meus amigos. Com carinho especial à Nathália, Patrícia e Tássia que mesmo longe, se fizeram presentes e tanto me aconselharam. À Nicolli, meu presente sorocabano. E à Vanessa, Will, Gabriela e Carliana, por me ampararem e motivarem por tantos anos.

EPÍGRAFE

“Você não pode esperar construir um mundo melhor, sem melhorar os indivíduos. Cada um de nós deve trabalhar no seu próprio aperfeiçoamento. E, ao mesmo tempo, partilhar a responsabilidade geral com toda a humanidade. O nosso dever particular está em ajudar aqueles a quem nós podemos ser mais uteis.”

Marie Curie

FERNANDES, A. R. A. C. Extração e caracterização de ácido γ -poliglutâmico em substrato de soja fermentado (natto). 2017 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, 2017.

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 volta-se pela extração e quantificação do ácido γ -poliglutâmico de produtos comerciais, natto e $\text{PG}\alpha\text{21Ca}$, para estudos como agente floculante. Observou-se diferença expressiva, na produção de ácido γ -poliglutâmico, em marcas distintas de natto. A metodologia de extração γ -PGA que representou maior eficiência foi através do uso de metanol refrigerado como agente de precipitação, onde em apenas uma extração obteve-se o biopolímero com atividade floculante, quando comparado à extração com o álcool etílico e acetona. Quanto ao método de extração de γ -PGA do $\text{PG}\alpha\text{21Ca}$, a extração por álcool etílico apresentou-se eficiente na separação do ácido γ -poliglutâmico, sendo observado apenas pequeno residual de cálcio.

Palavras-chave: ácido γ -poliglutâmico, natto, extração com solventes, biopolímero

FERNANDES, A. R. A. C. Extraction and characterization of γ -polyglutamic acid in fermented soybean substrate (natto). 2017. 96 f. Dissertation (Master's degree Environmental Sciences) – Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, 2017.

ABSTRACT

The γ -polyglutamic acid (γ -PGA) is a homopolyamide composed of D- and L- units of glutamic acid. It is anionic biopolymer that has properties such as water solubility, no toxicity, in addition to being edible and biodegradable. Due to these properties, it has many environmental applications, among them, the use as an increment to the flocculation process, in the treatment of water. γ -polyglutamic acid can be produced by fermenting soybeans using *Bacillus subtilis* bacteria found in foods such as natto, consumed as a delicacy in Japan. Most applications of biopolymers are directly involved with their potential to respond to changes from the environment in which they are dissolved. An approach aimed at understanding the structural changes, conformations and associations of polymer chains presents a high scientific interest, as well as practical applications. The objective of this work is the extraction and quantification of γ -polyglutamic acid from commercial products, natto and PG α 21Ca, for studies as a flocculating agent. There was an expressive difference in the production of γ -polyglutamic acid in different natto brands. The methodology of γ -PGA extraction that represented greater efficiency was through the use of cooled methanol as a precipitation agent, where in only one extraction was obtained the biopolymer with flocculating activity, when compared to the extraction with ethyl alcohol and acetone. As for the γ -PGA extraction method of PG α 21Ca, the ethyl alcohol extraction was efficient in the separation of the γ -polyglutamic acid, with only small residual of calcium being observed.

Keywords: γ -polyglutamic acid, natto, solvent extraction, biopolymer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química molecular do ácido γ -poliglutâmico	20
Figura 2 - Genes associados à síntese do γ -PGA em <i>B. subtilis</i>	23
Figura 3 - Floculação de coloides potencializada pela ação do ácido γ -poliglutâmico.....	32
Figura 4 - Estrutura de rede formada pela indução de ligação cruzada, na molécula de γ -PGA	36
Figura 5 - Representação esquemática da precipitação e extração de células bacterianas	40
Figura 6 - Curva de quantificação para o γ -PGA	54
Figura 7 - Produção de biomassa seca e γ -PGA por marca de natto comercial	55
Figura 8 - Soja <i>in natura</i> e natto.....	57
Figura 9 - Produção de ácido γ -poliglutâmico por kg de natto	58
Figura 10 - Formação de rede característica da presença do ácido γ -poliglutâmico em solução	59
Figura 11 - Comparativo da extração em miligramas do γ -PGA nos natts N ₁ , N ₂ e N ₃ por repouso em refrigeração por 40 min e por 12 h utilizando diferentes solventes orgânicos como agente de precipitação	61
Figura 12 - Precipitação após 12 horas em refrigeração à 5 °C	62
Figura 13 - Aumento percentual na extração de ácido γ -poliglutâmico utilizando refrigeração pelo período de 12 h comparada ao período de 40 min.....	63
Figura 14 - Comportamento apresentado pela variação da faixa de pH na viscosidade ácido γ -poliglutâmico extraído da amostra N ₁	66
Figura 15 – Espectro infravermelho do ácido γ -poliglutâmico extraído do natto N ₁ utilizando-se de metanol, como agente de precipitação.....	68
Figura 16 - Espectro infravermelho do natto N ₁ após secagem em estufa	70
Figura 17 - Espectro Infravermelho do PG α 21Ca <i>in natura</i> nas faixas de absorção de 400 a 4000 cm ⁻¹	75
Figura 18 - Variação do pH em função do tempo nas amostras de γ -PGA 91,61%, γ -PGA 30% e PG α 21Ca.....	78
Figura 19 - Comportamento apresentado pela variação de solventes no processo de extração de ácido γ -poliglutâmico destinado ao processo de floculação.....	80
Figura 20 – Taxa de floculação em porcentagem para diferentes concentrações de γ -PGA para diferentes solventes de extração	81

Figura 21 - Atividade floculante ácido γ -poliglutâmico na forma sódica Shandong Freda Biotechnology.....	82
Figura 22 - Influência de diferentes faixas de pH na atividade floculante do ácido γ -poliglutâmico.....	83
Figura 23 - Atividade floculante do ácido γ -poliglutâmico combinado com sulfato de alumínio e cloreto de ferro em pH 7,0.....	84
Figura 24 - Atividade floculante PG α 21Ca.....	85

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais aplicações de ácido γ -poliglutâmico	22
Tabela 2 - Propriedades dos solventes utilizados na extração de γ -PGA.....	24
Quadro 3 - Diferentes valores de viscosidade em fluidos	28
Quadro 4 - formulação aproximada do $\text{PG}\alpha 21\text{Ca}$ de acordo com o Material Safety Data Sheet (MSDS).....	36
Tabela 5 - Especificação do γ -PGA $\geq 92\%$ segundo o fabricante.....	44
Tabela 6 - Valores de correção de pureza do γ -PGA para construção de curva de calibração	54
Tabela 7 - Análise elementar de natto N_1 , N_2 e N_3	56
Tabela 8 - Valores do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$).....	60
Tabela 9 - Tabela ANOVA natto N_1 para extração de 12 h considerando a variação na quantidade de γ -PGA extraído pelos diferentes solventes adotados	63
Tabela 10 - Tabela ANOVA natto N_2 para extração de 12 h considerando a variação na quantidade de γ -PGA extraído pelos diferentes solventes adotados	64
Tabela 11 - Tabela ANOVA natto N_3 para extração de 12 h considerando a variação na quantidade de γ -PGA extraído pelos diferentes solventes adotados	64
Tabela 12 - Valores de viscosidade (mPa.s) em diferentes marcas de natto, para soluções de γ -PGA após extração, mantendo as mesmas condições	64
Tabela 13 - Viscosidade dos produtos Shandong Freda Biotechnology e γ -PGA extraído do natto	66
Tabela 14 - Bandas observadas em FTIR (cm^{-1}) para γ -PGA sódico da Shandong Freda Biotchenology, como material de referência e após extração de γ -PGA de natto N_1 , com metanol.	68
Tabela 15 - Conformação estrutural do γ -PGA antes e após extração do natto N_1 de acordo com os valores de absorção no espectro infravermelho	71
Tabela 16 - Análise elementar $\text{PG}\alpha 21\text{Ca}$ e γ -PGA sódico Shandong Freda Biotechnology ...	73
Tabela 17 - Valor de viscosidade para o ácido γ -poliglutâmico extraído do $\text{PG}\alpha 21\text{Ca}$	76

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Al	Alumínio
ANOVA	Analysis of Variance
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATP	Trifosfato de adenosina
BOVESPA	Bolsa de Valores de São Paulo
C	Carbono
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CES	Cultivo em Estado Sólido
CHN	Carbono Hidrogênio Nitrogênio
Cm	Centímetro
CMC	Concentração Micelar Crítica
co. Ltd.	Companhia Limitada
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
Cu	Cobre
Da	Dalton
DO550	Densidade óptica a 550 nanômetros
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
F	Estatística F
Fe	Ferro
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
g	Gramas
Gl	Grau de Liberdade
h	Hora
H	Hidrogênio
HCl	Cloreto de Hidrogênio
HPLC	High performance liquid chromatography
ICP	Inductively Coupled Plasma
IMEA	Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária
ICSC	International Chemical Safety Cards
K	Índice de Consistência
KBr	Brometo de Potássio
Kda	Quilo Dalton
Kg	Quilograma
KJ	Quilojoule
K _{ow}	Coefficiente de partição octanol-água
L	Litro
M	Molar
m/v	Massa por Volume

MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimol
Mn	Manganês
MSDS	Material Safety Data Sheet
MQ	Média dos Quadrados
M ω	Miliohm
N	Índice de comportamento do fluido
η	Viscosidade Intrínica
N ₁	Natto 1
N ₂	Natto 2
N ₃	Natto 3
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
Ni	Níquel
Nm	Nanômetro
P	Probabilidade de Significância
Pa	Pascal
PGA	Ácido γ -poliglutâmico
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PLA	Poliactida
Rpm	Rotações por Minuto
s	Segundos
SQ	Soma dos Quadrados
SAE	Society of Automotive Engineers
TCD	Detector de Condutividade Térmica
v/v	Volume por Volume
Vm	Massa Molar Viscosimétrica Média
γ -PGA	Ácido γ -poliglutâmico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Ácido γ -poliglutâmico	19
2.2	Precipitação pela ação de solventes	23
2.3	Viscosidade de biopolímero	27
2.4	Biofloculante	30
2.5	Natto	33
2.6	Produtos à base de ácido γ -poliglutâmico	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL - NATTO.....	40
4.1	Precipitação de células bacterianas.....	40
4.2	Extração de γ -PGA de natto com acetona, álcool etílico e metanol.....	41
4.3	Quantificação de biomassa seca	42
4.4	Quantificação de γ -PGA.....	43
4.5	Construção da curva de calibração por espectrofotometria.....	43
4.6	Análise elementar	44
4.7	Análise de viscosidade do γ -PGA para N ₁ , N ₂ e N ₃	44
4.8	Análise de viscosidade do γ -PGA variando pH.....	45
4.9	Análise de viscosidade do γ -PGA padrão.....	45
4.10	Análise por espectroscopia no infravermelho para γ -PGA extraído do natto N1 e para o natto N1 antes da extração.....	45
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL - PGA21CA.....	47
5.1	Análise por espectroscopia no infravermelho para o PG α 21Ca in natura.....	47
5.2	Análise elementar	47
5.3	Extração de ácido γ -poliglutâmico do PG α 21Ca.....	47
5.4	Análise de viscosidade após extração do ácido γ -poliglutâmico.....	48
5.5	Curva de pH.....	48
6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ATIVIDADE FLOCULANTE	49
6.1	Atividade floculante γ -PGA com variação de concentração	49

6.2	Atividade flocculante γ -PGA em diferentes faixas de pH	50
6.3	Atividade flocculante γ -PGA utilizando sulfato de alumínio e cloreto de ferro como coagulantes	50
6.4	Atividade flocculante PG α 21Ca.....	51
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
7.1	Natto	53
7.1.1	Curva para quantificação do ácido γ -poliglutâmico	53
7.1.2	Produção de biomassa seca	55
7.1.3	Concentração de γ -PGA em diferentes marcas de natto.....	56
7.1.1	Formação de rede de precipitação de biopolímero.....	58
7.1.2	Análise de viscosidade para diferentes marcas de natto.....	64
7.1.3	Análise de viscosidade em diferentes faixas de pH.....	65
7.1.4	Análise de viscosidade de produtos da Shandong Freda Biotechnology	66
7.1.5	Análise por espectroscopia no infravermelho para γ -PGA extraído do natto N1 e para o natto N1 antes da extração	67
7.2	PG α 21CA	72
7.2.1	Propriedade orgânica do PG α 21Ca	72
7.2.2	Análise por espectroscopia no infravermelho para o PG α 21Ca in natura.....	73
7.2.3	Extração do ácido γ -poliglutâmico do PG α 21Ca pela ação do álcool etílico.....	75
7.2.4	Viscosidade da solução do ácido γ -poliglutâmico extraído do PG α 21Ca.....	76
7.2.5	Curva de pH.....	77
7.3	Atividade flocculante	79
7.3.1	Atividade flocculante variando concentração de ácido γ -poliglutâmico.....	79
7.3.2	Atividade flocculante em diferentes faixas de pH.....	82
7.3.3	Atividade flocculante variando coagulante	83
7.3.4	Atividade flocculante do PG α 21Ca.....	84
8	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

A qualidade da água relaciona-se com a presença de substâncias e microrganismos responsáveis por alterar os parâmetros representados pelas características físicas, químicas e biológicas, em que esses padrões de qualidade são diretamente dependentes da finalidade a qual se destina a água (VON SPERLING, 2005). Para abastecimento público, se faz necessário que os constituintes das águas naturais que são prejudiciais à saúde, sejam removidos ou tenham sua concentração reduzida.

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 flocos, diminuir a dosagem de coagulante primário e como auxiliares de filtração (DANTAS; DI BERNARDO, 2005).

Polímeros são macromoléculas formadas por dezenas de milhares de unidades de repetição (monômeros), ligados por uma ligação covalente, resultando em material de alta massa molar (CANEVAROLO JÚNIOR, 2006). Em tratamento de água, polímeros orgânicos, sintéticos ou naturais, são responsáveis pela formação de pontes de ligação entre partículas coloidais neutralizadas, sendo utilizados como agentes estabilizantes (CAPELETTE, 2011).

Nesse contexto, surge a busca pelo desenvolvimento de novos materiais biodegradáveis, biocompatíveis e que se mostrem tão eficientes quanto os convencionais no tratamento de água, como biopolímeros, que aparecem como alternativa de substituição aos produtos tradicionalmente utilizados pelo mercado.

De acordo com a ABNT NBR 15448-1, biopolímeros são materiais que possuem sua origem em processos que utilizam como matéria-prima produtos oriundos de fontes renováveis, como milho, quitina, celulose, soja, entre outros. Pela norma ASTM D6400-04, esses produtos são considerados biodegradáveis quando sua decomposição ocorre por processo bacteriológico, por fungos ou pela ação de algas. A biodegradação é, portanto, o resultado da ação enzimática resultante de atividade biológica em material orgânico onde a decomposição do material resulta em dióxido de carbono, água, metano e compostos inorgânicos simples ou biomassa.

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um biopolímero aniônico, solúvel em água, biodegradável, biocompatível e atóxico, obtido a partir de bactérias do gênero *Bacillus*, através de processos fermentativos (BRITO, 2014). Outro fator importante, é a necessidade de ser obtido de fonte renovável, como a soja, o que o torna promissor para aplicação industrial.

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). A modificação na molécula de γ -PGA também pode aumentar a atividade do polímero como agente floculante (KUNIOKA, 2004; TANIGUCHI et al., 2005). A partir do uso de reagentes indutores de ligações cruzadas ou uso de radiação gama é possível sintetizar hidrogéis de γ -PGA com maior atividade floculante (OPPERMAN-SANIO; STEINBÜCHEL, 2002).

Algumas companhias produzem comercialmente o ácido γ -poliglutâmico como a Ajinomoto Co., a Nippon Poly-Glu Co., a Natto Biosciences e a Shandong Freda Biotechnology. A Nippon Poly-Glu Co. comercializa produtos, para tratamento de águas e suplementos funcionais à base de γ -PGA (NIPPON POLY-GLU, 2015; BRITO, 2014).

O objetivo deste trabalho volta-se para a extração de ácido γ -poliglutâmico utilizando-se de soja fermentada, o natto. Como objetivos específicos espera-se estabelecer parâmetros ideais para extração de γ -PGA através da determinação de solvente mais eficiente no processo de precipitação do biopolímero, assim como, entender sua propriedade floculante, bem como efetuar caracterização físico-química do produto PG α 21Ca, da Nippon Poly-Glu Co.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido γ -poliglutâmico

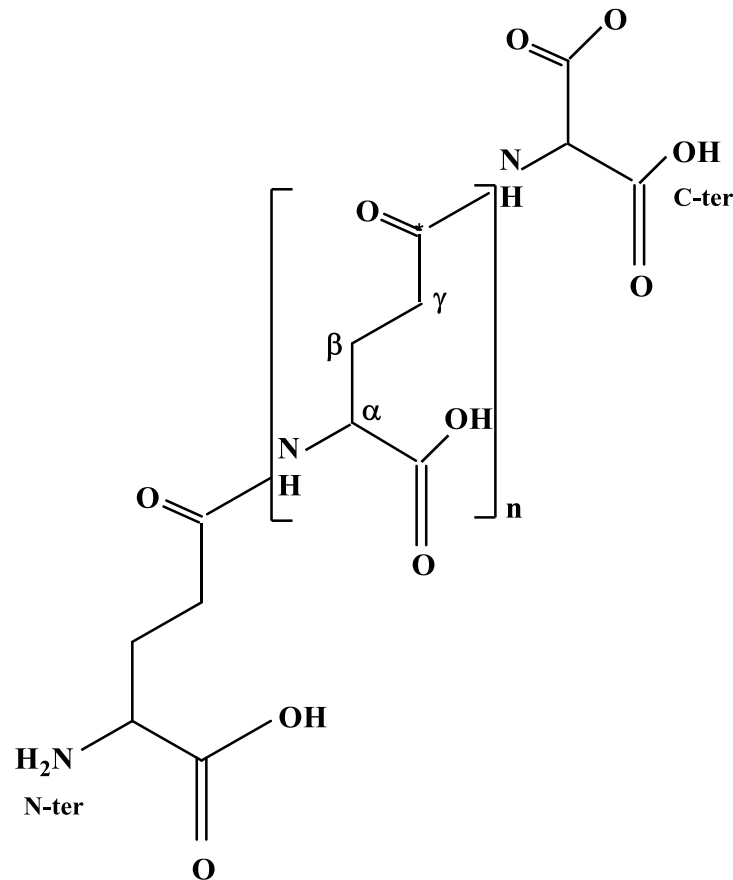
O ácido γ -poliglutâmico é um produto exclusivo do metabolismo microbiano, obtido por síntese enzimática principalmente pelo *Bacillus subtilis*, sendo que uma metodologia para síntese química do γ -PGA é inexistente até o momento (SHIH; VAN, 2001; NAGAI; TAMANG, 2010). Em 1905, o pesquisador Sawamura isolou a bactéria gram positiva *Bacillus natto* e, posteriormente, constatou a presença de ácido γ -poliglutâmico no natto (KUNIOKA, 1997). Em 1937, Ivánovics e Bruckner encontraram como componente da cápsula de *Bacillus anthracis* o γ -PGA. No ano de 1942, Bovarnick identificou que o γ -PGA poderia ser produzido em caldo de cultura por outro microrganismo, *Bacillus subtilis*, em fermentação submersa e em estado sólido.

Biopolímeros constituídos de aminoácidos são muito semelhantes às proteínas. Entretanto, nas moléculas de proteínas, a síntese é realizada a partir das informações contidas no DNA onde diferentes aminoácidos que as compõem são orientados em sequência específica, enquanto nos poliaminoácidos biossintetizados, a polimerização é efetuada a partir de um único aminoácido (KUNIOKA, 1997).

As proteínas são constituídas de vários tipos de aminoácidos e possuem ligação amida somente, entre os grupos α -amino e α -carboxílico, já as homopoliamidas são constituídas de apenas um tipo de aminoácido e a ligação amida, pode ocorrer entre os grupos β - e γ -carboxílicos e ε -amínicos (BAJAJ; SINGHAL, 2011; CANDELA; FOUET, 2006). Em biopolímeros, como o ácido γ -poliglutâmico, o glutamato é sintetizado, independentemente, dos ribossomos e polimerizado através de ligações amida, o que além de diferenciar estruturalmente o γ -PGA das proteínas, ainda o distingue quanto sua funcionalidade (SHI; VAN, 2001).

Como representado pela estrutura química molecular (Figura 1), o ácido γ -poliglutâmico ocorre, naturalmente, na forma de homopoliamida composta por unidades de D- e L- ácido glutâmico, as unidades monoméricas estão conectadas por ligações amidas entre o grupo α -amino e grupo γ -carboxílico (GOTO; KUNIOKA, 1992; DE CESARO, 2013). Por possuir essa ligação amida entre os grupos α e γ , o ácido γ -poliglutâmico apresenta resistência às proteases, que é o processo de quebra das ligações peptídicas, vistos que estas são capazes de agir apenas sobre ligações entre grupos α , como no caso das proteínas (CANDELA; FOUET, 2006).

Figura 1 - Estrutura química molecular do ácido γ -poliglutâmico



Fonte: Candela; Fouet (2006)

A conformação estrutural de um polímero define-se pelo arranjo geométrico de átomos que formam a molécula (CANEVAROLO, 2006). A variação da concentração do γ -PGA puro em solução, temperatura e pH são fatores responsáveis por sua variação da conformação estrutural, influenciada pela ionização de suas cadeias laterais. Em pH ácido e temperatura de 25 °C, o γ -PGA encontra-se em conformação de α -hélice, estabilizada por ligações de hidrogênio intramoleculares (KREJTSCHI; HAUSER, 2011). Essas ligações intramoleculares de hidrogênio correspondem às interações de um grupo doador e outro receptor de próton, na mesma molécula (KOLLMAN; ALLEN, 1972).

Em cadeias poliméricas, têm-se as ligações primárias ou intramoleculares, que correspondem às ligações dentro da mesma molécula, e caracterizadas como ligações fortes. As ligações intermoleculares, ou secundárias, que podem ser força de Van der Waals e pontes de hidrogênio são forças moleculares mais fracas, estabelecida entre diferentes cadeias poliméricas ou segmentos da mesma cadeia (CANEVAROLO, 2006). As ligações de hidrogênio são de

suma importância, para a estabilização e a conformação estrutural de macromoléculas (REICHARDT, 2004).

Em pH superior a 6,5, as moléculas de γ -PGA encontram-se na conformação randômica, sendo que a variação da temperatura não provoca mudanças significativas na conformação estrutural (KREJTSCHI; HAUSER, 2011).

Uma vez que o ácido γ -poliglutâmico apresenta diferentes propriedades bioquímicas, este polímero pode desempenhar diferentes funções, dependendo do organismo e do ambiente (BUESCHER; MARGARITIS, 2007; CANDELA; FOUET, 2006).

A limitação da produção do γ -PGA, em decorrência do aumento da viscosidade de meios de cultivo líquidos e, também, a busca de substratos de baixo custo, tem levado ao desenvolvimento de processos de cultivo em estado sólido (CES). No entanto, relatos sobre a produção de γ -PGA em CES são menos frequentes, citados nos trabalhos de Oh et al. (2007), Xu et al. (2005), Chen et al. (2005a, b).

O ácido γ -poliglutâmico é biomaterial de representativa aplicabilidade devido à sua elevada solubilidade e biodegradabilidade. A produção em escala comercial do γ -PGA já vem sendo realizada através da fermentação extracelular de bactérias, em fontes renováveis, como substrato de soja (SHIH; VAN, 2001). Assim, alguns estudos já direcionam sua aplicação como floculante (BHUNIA et al., 2012; YOKOI et al., 1996 SHIH et al., 2001). Um número expressivo sobre a produção e aplicação de γ -PGA tem sido realizado, como exemplificado pelo Quadro 1 (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

Quadro 1 - Principais aplicações de ácido γ -poliglutâmico

Aplicação	Vantagens
Biofloculante	Alta capacidade de flocular diversas partículas coloidais em água.
Veicular de fármaco	Em razão de grupos carboxílicos, o γ -PGA oferece pontos de fixação para fármaco. Seu produto de degradação é o ácido glutâmico, que faz parte do metabolismo das células e não precisa ser excretado pelos rins.
Adesivos biológicos	O γ -PGA apresenta grande adesão e pode substituir a cola de fibrina, na adesão de tecido em cirurgia.
Construção de tecido e proliferação de célula	Associado a quitosana, o γ -PGA aumenta eficiência na construção de base, para novos tecidos e células.
Cosmético	Pode aumentar a capacidade hidratante, esfoliante e de antienvelhecimento.
Indústria alimentícia	Aumenta a absorção de cálcio e minerais, como o fósforo, pelo intestino. Pode ser empregado em estabilizante de sorvete, além de melhorar a textura de macarrão e pão.
Adsorção de metal	O γ -PGA tem se mostrado altamente eficiente na adsorção e complexação de metais como Ni^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} e Al^{+3} em águas contaminadas.
Agricultura	Fertilizantes com γ -PGA em sua formulação resultam em liberação lenta de nitrogênio reativo para o substrato.
Plástico biodegradável	Através da modificação estrutural do γ -PGA, utilizando de radiações que induzem ligações cruzadas, é possível utilizar o biopolímero como principal componente na produção de plásticos biodegradáveis.
Crioprotetor	Devido à seu elevado teor de aminoácidos acidificados, o γ -PGA apresenta alto potencial anticongelamento.
Agente de contraste	Aumento na eficiência da identificação de carcinomas, através de ressonância magnética.

Fonte: Adaptado de Bajaj; Singhal (2011)

A produção do γ -PGA é realizada através de bioprocessos, extracelularmente, tendo como principais produtores bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente as espécies *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. mojavensis* e *B. amyloliquefaciens* (HEZAYEN et al., 2001). O γ -PGA é produzido por microrganismos para finalidades diversas. Em alguns casos, o biopolímero atua como reserva nutritiva, em razão da alta quantidade de carbono e nitrogênio presente na macromolécula. Nos meios onde ocorre baixa disponibilidade de nutriente, o microrganismo produz e excreta enzimas com a finalidade de clivar a molécula do biopolímero, disponibilizando-o como fonte energética (DE CESARO, 2013; KIMURA et al., 2004).

O biopolímero também é responsável por atuar como quelante de metais do meio, aumentando a resistência da bactéria excretora. Em algumas bactérias, o γ -PGA atua em suas superfícies, permitindo a elas escapar do processo de fagocitose, agindo assim, na proteção de

agentes patogênicos, como *B. anthracis*, contra o sistema imune do hospedeiro (BAJAJ; SINGHAL, 2011). Em meios com alta concentração salina, o γ -PGA atua na neutralização do pH do meio, evitando a desidratação de *Bacillus* (ASHIUCHI; MISONO, 2002).

A biossíntese do γ -PGA efetuada por bactéria é realizada em dois momentos distintos: no primeiro, o monômero L- e D- ácido glutâmico é sintetizado para, no segundo momento, ser unido formando o bipolímero (BAJAJ; SINGHAL, 2011). A nomenclatura para os genes envolvidos na síntese de γ -PGA volta-se para sua retenção ou a liberação para o meio extracelular. Se estiver associado com a superfície da bactéria e constituir-se na cápsula, os genes são nomeados “*cap*”, como ocorre em *B. anthracis*. Já para *B. subtilis* encontrado no natto, o γ -PGA é excretado para o meio extracelular e os genes correspondentes à produção e transporte do ácido γ -poliglutâmico são “*pgs*”, descritos de acordo com a Figura 2 (CANDELA; FOUET, 2006).

Figura 2 - Genes associados à síntese do γ -PGA em *B. subtilis*



Fonte: Adaptado de Candela; Fouet 2006

A produção celular do γ -PGA inicia-se pela geração de energia para o processo de polimerização, através da ação da molécula ATP, responsável pela ativação do glutamato que, em seguida, é transferido para proteína e, posteriormente, para o filamento de γ -PGA. No caso de *B. subtilis*, o biopolímero torna-se completamente liberado para o meio extracelular e a subunidade PgsS é a facilitadora do transporte (CANDELA; FOUET, 2006).

2.2 Precipitação pela ação de solventes

As forças intermoleculares permitem a interação de partículas entre diferentes substâncias. No caso de dissoluções, têm-se que caso as forças de atuação entre íons de um soluto e as moléculas de um solvente forem superiores à força responsável pela união dos íons

desse soluto, ocorre a solubilização da substância, e será tanto mais fácil a solubilização quanto maior for a diferença entre as duas forças (FELTRE, 2004).

A precipitação de determinadas substâncias em solução está diretamente ligada à interação entre o solvente e às interações intramoleculares (KARP, 2005).

A precipitação de substâncias como proteínas em solução se dá de diversas formas, como por exemplo, através do efeito da força iônica ou pela ação de solventes orgânicos (KARP, 2005).

Solventes miscíveis em água, como metanol, acetona e etanol, são bons agentes precipitantes (LIMA, 2008). O método de precipitação utilizando solventes orgânicos refrigerados foi fundamentado por Edwin Joseph Cohn, na década de 40. Essa metodologia baseou-se na precipitação proteica do plasma humano pelo etanol, induzida pela mudança da solubilidade das proteínas e é dependente das seguintes variáveis: força iônica, pH, temperatura e concentração em solvente (Tabela 2) (COHN et al., 1946).

Tabela 2 - Propriedades dos solventes utilizados na extração de γ -PGA

Solvente	Fórmula Química	Massa Molecular	Log-K_{ow}	ϵ
Acetona	C ₃ H ₆ O	58,08	-0,24	20,7
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07	-0,32	24,5
Metanol	CH ₄ O	32,04	-0,82	32,7

Legenda: coeficiente de partição octanol-água (log-K_{ow}), constante dielétrica (ϵ) (Reichardt, 2004; Lange, 1979, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), International Chemical Safety Cards (ICSC).

A constante dielétrica expressa a capacidade de um solvente em isolar cargas opostas umas das outras de um determinado soluto (LEFFLER; GRUNWALD, 1963). Num processo de solubilização, os valores elevados de constante dielétrica representam a existência de pouca força de atração entre determinada substância no seio do solvente, sendo a dissolução favorecida (REICHARDT, 2004). Para precipitação de biopolímeros, os solventes orgânicos geram redução da constante dielétrica do meio aumentando as interações eletrostáticas intramoleculares do soluto.

A força iônica é fundamentada na determinação da prevalência de interações em determinada solução. Ao adicionar sais, por exemplo, ocorre o processo de ionização na solução, que altera a força iônica. Para força iônica fraca, a interação entre uma macromolécula e o solvente prevalece, sendo a solubilização favorecida. Com o aumento da força iônica, a interação entre solvente e macromoléculas, como proteínas e biopolímeros, se torna fraca, acarretando na precipitação dessas substâncias (KARP, 2005).

O coeficiente de partição representa a diferença de solubilidade de determinada substância, ao ser submetida a um sistema bifásico imiscível (BEDIENT et al., 1994). O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) é definido como a razão da concentração de determinada substância em n-octanol e água, em equilíbrio e à temperatura específica (HOWARD, 1990). Assume-se que a especiação molecular do soluto é a mesma em ambos os solventes e que as soluções são suficientemente diluídas (SANGSTER, 1997). A abordagem mais prática para estimar a solubilidade para estruturas diversas e complexas envolve o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ($\log-K_{ow}$), que fornece o parâmetro de interpretação referente ao caráter hidrofílico de determinada substância. (MEYLAN, 1996).

Solventes que contêm átomos de hidrogênio ligados a elementos eletronegativos são doadores de prótons e designados como próticos. Nesse grupo se encontra, por exemplo, a água, etanol e o metanol. Solventes que são incapazes de doar prótons são denominados apróticos, onde se enquadra a acetona (PARKER, 1963). Alguns solventes, como água e etanol, podem se comportar tanto como doadores de prótons quanto como receptores de próton, sendo conhecidos como anfóteros, e suas ligações de hidrogênio são fortemente influenciadas pela temperatura da reação (REICHARDT, 2004).

Solventes apróticos dipolares, como a acetona, não são doadores de ligações de hidrogênio, mas possuem alta permissividade relativa, que é a capacidade de determinada substância de se polarizar em um dado campo elétrico, maiores momentos de dipolo e valores de escala empírica de polaridade de solventes intermediários de 0,3 a 0,5. Apesar de não serem doadores de ligação de hidrogênio, pois suas ligações C-H não são suficientemente polarizadas, eles são geralmente doadores de pares de elétrons e por isso eficientes no processo de solvatação, devido à presença de pares solitários de elétrons (REICHARDT, 2004).

Na precipitação de proteínas utiliza-se de solventes orgânicos que apresentam solubilidade em água, como acetona, etanol e o metanol, e que, por possuírem constantes dielétricas inferiores à da água, reduzem o poder de solvatação, induzindo o processo de precipitação.

As cargas das partículas dispersas em soluções originam-se através da formação de dupla camada de íons em sua superfície, devido à adsorção seletiva de um dos íons do eletrólito ou devido à ionização de suas moléculas superficiais (LIMA, 2008).

Para processos que envolvam mecanismos de solubilização, têm-se a o potencial de interação $w(r)$ entre duas moléculas dos soluto. À nível molecular, aqui retratado como interações presentes em solução, encontra-se a força entre duas moléculas ou partículas, representado pela Equação 1:

$$\mathbf{F} = \frac{-\partial w(\mathbf{r})}{\partial \mathbf{r}}$$

Equação 1

Onde:

F = Força entre duas moléculas

w = Potencial de interação (KJ/mol)

r = Distância entre as partículas (cm)

Como a derivada do potencial de interação sobre a derivada da distância é relacionado à força entre duas moléculas ou partículas, e como força pode realizar trabalho, w é designado como energia disponível. Em solução, considerando as forças entre duas moléculas, diversas interações que não existem em um sistema não solubilizado, passam a existir (REICHARDT, 2004).

Portanto, enquanto duas moléculas podem atrair-se, elas também podem repelir-se em determinado meio, caso o trabalho necessário ao deslocamento do solvente exceder o ganho pela aproximação das moléculas do soluto (REICHARDT, 2004).

A precipitação de polímeros é facilitada pela redução da temperatura da solução, ocasionada pela redução do raio de interação. Uma redução inicial para que o volume hidrodinâmico da solução polimérica atinja seu valor mínimo, seguida de nova redução da temperatura, ocasiona a precipitação de mais moléculas desse polímero presentes na solução (CANEVAROLO JÚNIOR, 2006).

Surfactantes são moléculas compostas por uma extremidade polar ou hidrofílica e outra apolar ou hidrofóbica (NITSCHKE; PASTORE, 2002). O brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) é um surfactante catiônico, que em soluções aquosas, ao se ligar ao ácido γ -poliglutâmico, forma complexo de micelas do tipo insolúvel em água, altamente disperso, resultando em aumento na turbidez (REICHARDT, 2004; ASHIUCHI, 2011). Micelas são compostos anfífilicos, ou seja, com uma extremidade polar e outra apolar, que se agregam em soluções aquosas (REICHARDT, 2004). O comportamento hidrofóbico de surfactantes, permite a formação espontânea de agregados, quando as concentrações do mesmo se encontram acima da concentração micelar crítica (CMC) (UEDA, 2006).

2.3 Viscosidade de biopolímero

A viscosidade do fluido é a medida resultante do atrito interno, causada pelas forças coesivas entre as moléculas em diferentes camadas desse fluido, quando forçadas a moverem-se uma em relação à outra (ÇENGEL; CIMBALA; 2015). Ao submeter um fluido em determinado escoamento, as moléculas presentes se expõem em diferentes velocidades, colidindo entre si e gerando fricção, que apresenta resistência ao escoamento. A viscosidade, portanto, está relacionada com a resistência interna oferecida ao movimento relativo das diferentes partes desse fluido (RAO, 1999; LUCAS et al., 2001).

A água apresenta baixos valores de viscosidade quando comparada, por exemplo, ao óleo utilizado em motores automotivos, ou seja, caso seja submetida a mesma força de escoamento, as forças de coesão presentes na água apresentam menor resistência à força cisalhante e tensão gerada pelo escoamento do que no óleo de motor (BAUER, 2010). No Quadro 3 tem-se valores de viscosidade para diferentes substâncias.

Quadro 3 - Diferentes valores de viscosidade em fluidos

Material	Viscosidade	Fontes
Água	1,0 mPa.s	Bauer et al. (2013)
Acetona	0,316 mPa.s	GEPEQ/USP (2007)
Etanol	1,2 mPa.s	
Metanol	0,55 mPa.s	
Mercúrio	1,5 mPa.s	Bauer et al. (2013)
Ar	0,018 mPa.s	
Glicerol	939,0 mPa.s	Brito júnior et al. (2013)
Fluido de perfuração “ <i>drill-in</i> ”	33,0 mPa.s	Neto et al. (2007)
Óleo de soja	59,0 mPa.s	Brock et al. (2008)
Óleo de canola	73,1 mPa.s	
Óleo de oliva	79,7 mPa.s	
Gasolina	0,29 mPa.s	Çengel; Cimbala (2015)
Óleo de motor SAE 50	860,0 mPa.s	
γ -PGA (20 g L ⁻¹) 48h de cultivo em CES	35,8 mPa.s	De Cesaro (2013)

Polímeros são macromoléculas de alta massa molecular, constituídos pela repetição de unidades estruturais simples (AKCELRUD, 2007). Devido ao tamanho de cadeias e enovelamento entre elas, a dificuldade de escoamento apresentada torna-se maior, resultando em maior viscosidade. Algumas características poliméricas são responsáveis por alterar os valores de viscosidade em soluções, como a natureza do solvente o tipo de estrutura molecular do polímero, concentração, tensão e velocidade de cisalhamento e temperatura (LUCAS et al., 2001).

A viscosidade de determinada solução aquosa contendo polímeros de origem bacteriana, relaciona-se intrinsecamente com a rigidez das moléculas que compõe a solução, que são diretamente ligadas à estrutura do polímero, que depende da bactéria responsável pela síntese e as condições de cultivo que são adotadas (BRADSHAW et al., 1983).

Em contato com solventes poliméricos, a solubilização é reversível, acontecendo em dois estágios. Inicialmente forma-se um gel, devido à difusão das moléculas do solvente para dentro da massa polimérica e, em seguida, com a adição de mais solvente, ocorre à desintegração do gel formado e, conseqüente, geração da solução verdadeira (CANEVAROLO

JÚNIOR, 2006). A resistência a determinado escoamento em solução é muito maior devido ao tamanho das cadeias poliméricas. Quando a tensão é aplicada em fluido constituído por macromoléculas, as cadeias esticam-se de forma a orientar no sentido do fluxo (LUCAS et al., 2001).

Soluções de biopolímeros bacterianos, geralmente, exibem propriedades pseudoplásticas, viscoelásticas e com tensão residual elevada (SUTHERLAND, 2001). No início do cultivo, quando a concentração do γ -PGA é baixa, o meio de cultivo comporta-se como fluido newtoniano, onde a deformação é diretamente proporcional à tensão aplicada, e cresce de forma linear. Avançando o tempo e, conseqüentemente, a concentração do biopolímero, o meio de cultivo assume características de fluido pseudoplástico, onde a viscosidade varia de acordo com o grau de deformação aplicado (BAJAJ; SINGHAL, 2011). O acréscimo de polímero em determinada solução, responde por aumento direto nas condições de viscosidade, de forma que quanto maior a concentração polimérica, maior será a viscosidade da solução. Uma presença mais representativa de polímero realça a interação intermolecular e entrelaçamentos moleculares (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

De Cesaro (2013) constatou que a elevação da concentração de γ -PGA em solução aquosa resulta no aumento linear da viscosidade e observou que em cultivos de 48 h e 96 h, o maior tempo de cultivo resulta em maior viscosidade. Esse resultado foi atribuído ao fato de que há maior distribuição da massa molar, em torno da massa molar média encontrada no espalhamento de luz para o γ -PGA obtido em cultivos de 96 h. Provavelmente, frações de massa molares mais elevadas causem esse efeito na viscosidade.

O ácido γ -poliglutâmico liberado ao meio durante o processo fermentativo apresenta elevada massa molar e sua presença extracelular torna o meio viscoso. O aumento da viscosidade dificulta a transferência de oxigênio, limitando a utilização do gás pelo microrganismo. Sendo as bactérias do gênero *Bacillus* aeróbias, essa viscosidade irá interferir na produção do biopolímero (YOON et al., 2000).

O caldo de fermentação durante a produção de ácido γ -poliglutâmico exibe comportamento pseudoplástico. A viscosidade inicial do caldo é newtoniana, mas o caldo rapidamente torna-se não newtoniano, com fortes propriedades ao cisalhamento, conforme a produção bacteriana do γ -PGA aumenta. Este comportamento pseudoplástico, durante a fase de acumulação do exopolissacarídeo é comum na produção de outros polímeros microbianos. A massa molecular é um parâmetro que se liga diretamente à viscosidade apresentada por determinado polímero em solução. A correlação entre a massa molar viscosimétrica média (vM) e a viscosidade intrínseca de soluções poliméricas é descrito pela equação de Mark-Houwink:

$$[\eta] = k \cdot vM^\alpha$$

Equação 2

Onde:

k e α são constantes, para determinado sistema de polímero/solvente/temperatura;

η é a viscosidade intrínica e

vM massa molar viscosimétrica média.

Em estudo desenvolvido por IRURZUN et al. (2001) por espalhamento de luz combinado com cromatografia de permeação em gel foi estabelecida a relação Mark-Houwink para o γ -PGA, resultando nos valores de $\alpha = 1,84 \cdot 10^6 \text{ dl/g}$ e $K = 1,16$. Através da equação de Mark-Houwink, é possível determinar que os parâmetros de viscosidade intrínica e massa molar estão inteiramente correlacionados e apresentando interação diretamente proporcional.

O peso molecular do biopolímero fica em torno de $10^5 - 10^6$ Da e é dependente da espécie de *Bacillus* produtora (SHIH; VAN, 2001), meio fermentativo (WU et al., 2008; KUNIOKA; GOTO, 1992) e condições de cultivo (CROMWICK et al., 1996). Neste caso, por tratar-se de bioprocesso torna-se complexo a obtenção de biomoléculas homogêneas e com peso molecular constante.

2.4 Biofloculante

A maioria das impurezas presentes na água apresenta carga negativa, que resulta em processo de repulsão entre as mesmas. Devido ao tamanho reduzido dessas partículas torna-se necessário longo período de tempo para que ocorra sedimentação natural e, conseqüente, separação das partículas da água (PAVANELLI, 2001).

A água captada em corpos hídricos para abastecimento humano, deve ser submetida a processos que permitam sua potabilidade, visando atender os padrões estabelecidos pela legislação. Com o propósito de permitir esse enquadramento, a água passa por processos físico-químicos. Nesse campo, tem-se o processo de clarificação, para remoção de parâmetros que interferem na qualidade da água, como cor e turbidez, composto por fases de mistura, coagulação, floculação e decantação (SOUSA, 2007).

A coagulação é responsável pela desestabilização de coloides ou partículas presentes na água, que são responsáveis por alterar sua qualidade. A floculação, por sua vez é o processo consequente à neutralização, onde ocorre a agregação dessas partículas já neutralizadas (FERREIRA, 2003).

Os coagulantes comumente utilizados desempenham papel importante, nas áreas de tratamento. No entanto, alguns tipos de coagulantes inorgânicos, que são amplamente utilizados, apresentam desvantagens como uso de dosagem elevada e efeito nocivo para o corpo humano (LU, 2002).

Floculação é um processo químico onde os coloides presentes em suspensão são separados através da formação de flocos. Esse processo é incrementado, em tratamentos de água pela ação de floculante que pode ser orgânico sintético, inorgânico ou biofloculante (BHUNIA et al., 2012). No entanto, floculante de origem sintética apresenta como desvantagem a baixa biodegradabilidade, além de gerar como monômeros, resultantes de degradação, substâncias químicas neurotóxicas e agentes cancerígenos, citando como exemplo a acrilamida, (SALEHIZADEH et al., 2000).

Na floculação, através de agitação lenta e do contato entre as partículas coloidais, verifica-se o aumento do tamanho físico das partículas, resultando em flocos mais densos, que tornam-se mais eficientes na remoção por sedimentação e filtração (FURLAN, 2008).

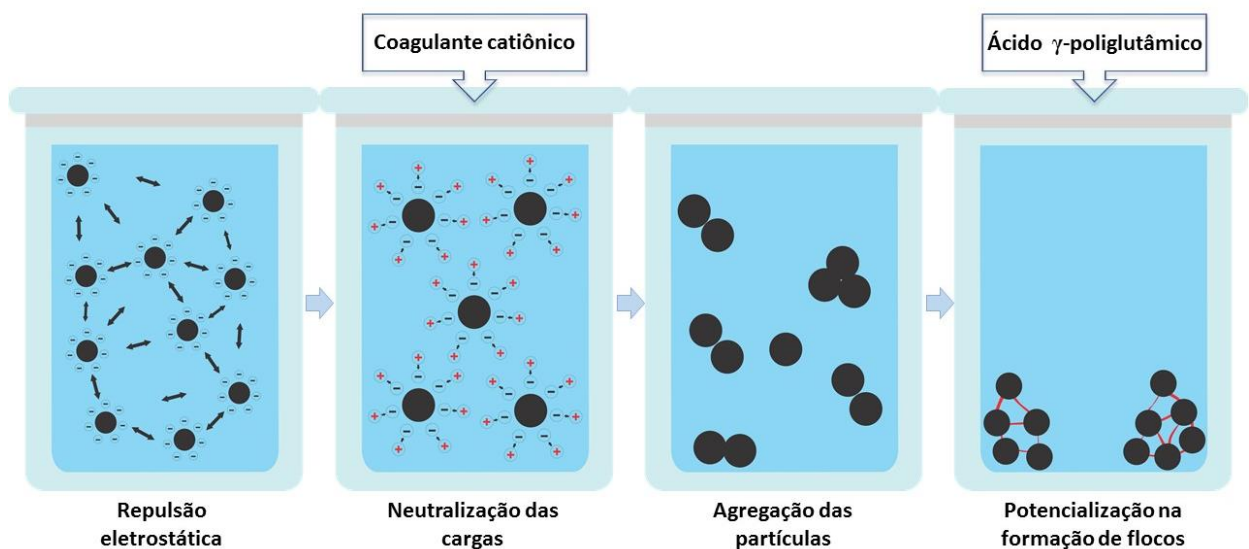
A aglutinação de partículas presentes na água pode ocorrer através do uso de polímeros de elevado peso molecular e cadeia longa. A adsorção de partículas suspensas na água torna-se diretamente dependente da carga e do grupo funcional presente nos monômeros que constituem o polímero (FILHO, 1973).

Considerando que floculantes sintéticos, como a poliacrilamida e ácidos poliacrílicos, embora eficazes e de baixo custo, podem gerar carga poluente sendo prejudiciais para os organismos e ambiente, a aplicação dos mesmos pode ser reavaliada no tratamento de água se for considerado o aspecto ambiental. Uma alternativa é a adoção de biopolímeros com propriedades floculantes que são, em geral, atóxicos e biodegradáveis (ARPAL, 2004; YE et al., 2007).

Biofloculantes são biopolímeros de alto peso molecular, biodegradáveis, que em tratamentos de água ou efluentes, apresentam a geração de lodo de fácil tratamento (TAKEDA et al., 1992; HOUGHTON; QUARMBY, 1999). Devido à alta capacidade de flocular ampla variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, o γ -PGA é considerado biofloculante superior (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

Segundo Bhunia et al. (2012) a atividade flocculante do γ -PGA é potencializada pela adição de cátions bivalentes e trivalentes, sendo considerado potencial e efetivo substituto para os flocculantes sintéticos em tratamento de água e efluentes. O processo de flocculação é dependente da valência e concentração desses cátions, assim como do pH da solução no momento de reação (SUZUKI et al., 1999). O acréscimo de íons responde pela neutralização e estabilização das cargas negativas dos coloides, e os grupos carboxílicos residuais no γ -PGA são responsáveis pela formação de pontes entre partículas em suspensão (Figura 3) (YOKOI et al., 1996).

Figura 3 - Flocculação de coloides potencializada pela ação do ácido γ -poliglutâmico



Fonte: Adaptado de Wu; We (2007)

Existe a condição denominada “pH ótimo” de flocculação que corresponde à situação em que as partículas coloidais apresentam menor quantidade de carga eletrostática superficial (KATO, 1983)

Cátions monovalentes representam baixo poder flocculante quando associado à bioflocculantes, os flocos formados apresentam baixa densidade e estrutura solta com alta taxa de cisalhamento. A transição de cargas dos flocos formados por cátions bi e trivalentes e o bioflocculante é maior, resultando em flocos de maior densidade e menor taxa de cisalhamento, representando efeito sinérgico maior para flocculação (WU, WE; 2007).

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} (KOIZUMI et al.,1992).

De acordo com a lei de Hardy Schulze, a floculação é resultado de mudanças na densidade de carga relacionadas ao potencial zeta (NEIS, 1976). O papel dos cátions é aumentar a adsorção de biofloculantes na superfície de partículas suspensas através da diminuição da carga negativa em ambos, ou seja, o papel desempenhado pelos cátions resulta na neutralização do potencial zeta das partículas coloidais (FRIESEN, 1987).

2.5 Natto

De acordo com os dados disponibilizados no site do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a soja é responsável por 49% de toda a área cultivável voltada para a agricultura no Brasil, tendo como previsão da taxa de crescimento anual de produção de 2,43% até 2019, próxima da taxa mundial, estimada em 2,56%. Atualmente, sua principal destinação é a fabricação de rações animais e com uso crescente na alimentação humana. Sendo alvo de crescente avanço tecnológico e pesquisas efetuadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o cultivo de soja no Brasil é baseado no sistema integração-lavoura-pecuária e plantio direto. Essas técnicas permitem uso intensivo da terra, com menor impacto ambiental, reduzindo a pressão pela abertura de novas áreas e contribuindo para a preservação ambiental. Com isso, seu cultivo foi ampliado na região do cerrado brasileiro (MAPA, 2016)

Os números do 4º levantamento da safra 2015/2016 de grãos realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) apontam para produção de 210,5 milhões de toneladas de soja, com maior crescimento do cultivo da soja de 6,1%, passando de 96,2 para 102,1 milhões de toneladas. O aumento foi impulsionado pelos preços no mercado mundial. No Brasil, o maior produtor da oleaginosa é o estado do Mato Grosso, com 28,3 milhões de toneladas e representa cerca de 30% da safra nacional, seguido do Paraná, com 18,5 milhões de toneladas.

Commodities são produtos de escala primária ainda não manufaturadas, ou parcialmente manufaturadas, normalmente agrícolas ou minerais, que apresentam ampla relevância econômica internacional, negociado entre importadores e exportadores (MACHADO, 2010). Segundo o Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária (IMEA), a soja é relatada como

commodity agrícola pela sua relevância no mercado internacional e faz parte do conjunto de atividades agrícolas, com maior destaque no mercado mundial.

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) pode ser extraído a partir do natto, que é um alimento de soja fermentada, produzido e consumido principalmente no Japão (NAGAI; TAMANG, 2010). O natto tem como característica odor de ácidos graxos de cadeia curta amoniaca além de ser constituído de polímero altamente viscoso, o ácido γ -poliglutâmico. (IKEDA et al., 1984; KANNO; TAKAMATSU, 1987a, b).

Bacillus natto foi isolado pela primeira vez em 1906 a partir da fermentação do natto (SAWAMURA, 1906). Esta espécie foi reportada como "sinônimo provável" de *B. subtilis* no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (GIBSON; GORDON, 1974). A análise filogenética efetuada para *B. natto* e *B. subtilis*, por sequenciamento do gene 16S rRNA, mostrou que *B. subtilis* (*natto*) e *B. subtilis* são da mesma espécie (NAGAI; TAMANG, 2010).

O uso da soja na extração do ácido γ -poliglutâmico, torna-se promissor e pode agregar valor econômico e tecnológico à um *soft commodity*, uma vez que no mercado internacional, o volume negociado de derivados agropecuários representa cerca de 5% do volume total, de derivados financeiros. No Brasil, os derivados agropecuários têm importância bem mais reduzida representando apenas 0,5% do volume de derivados negociados na Bolsa de Valores de São Paulo (BOVESPA) (LUCAS, 2009).

2.6 Produtos à base de ácido γ -poliglutâmico

Devido ao grande número de grupos carboxílicos ao longo da cadeia da molécula do ácido γ -poliglutâmico, a formação de ligações de hidrogênio na própria molécula ou entre moléculas diferentes é facilitada. Dessa forma, ele tem alta capacidade de absorção de água e retenção de umidade. Por conseguinte, a possibilidade de aplicação do ácido γ -poliglutâmico é promissora.

A Shandong Freda Biotechnology Co. Ltd. é uma empresa voltada para biotecnologia, fundada mediante junção das empresas Shandong Freda Pharmaceutical Group Corporation, Shandong Business Group e Shandong High-tech Investment Co. Ltd.. Tem suas atividades direcionadas para a fermentação biológica, extração bioquímica, purificação, refino, engenharia genética e venda de produtos como polissacarídeos biológicos, conservantes e biopolímeros, aplicados em diversos fins comerciais. Possui como principais produtos a natamicina, nisina, ácido γ -poliglutâmico e goma xantana.

Apresenta a comercialização de produtos compostos de γ -PGA voltados para a indústria de alimentos, cosméticos, cuidados de saúde, tratamento de água, produtos de higiene, fins médicos entre outros.

A formulação é desenvolvida de acordo com a aplicação final. Produtos para fins agrícolas, por exemplo, contém porcentagem $\geq 30\%$ de γ -PGA e quantidade de matéria orgânica $\geq 65\%$, enquanto os produtos voltados para cosméticos apresentam presença de γ -PGA $\geq 90\%$, com pureza comprovada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

Ainda segundo a Shandong Freda Biotechnology Co. Ltd., a comercialização do γ -PGA para cosméticos, na sua forma sódica, se dá devido à capacidade da macromolécula de absorver e reter umidade de forma eficiente, formando película sobre a superfície da pele. À medida que a rede formada pelas moléculas de alto peso molecular se torna maior, uma película elástica de ácido γ -poliglutâmico se forma na superfície da pele. O γ -PGA é hidratante ideal, com elevada compatibilidade com outros materiais presentes em cosmético, com capacidade de aumentar o conteúdo de ácido hialurônico $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ na pele, impedido sua hidrólise. A alta eficiência do γ -PGA na indústria cosmética, segundo a empresa, se deve à presença de grupos ionizados α -COOR, -CO e -NH em cada monômero do ácido γ -poliglutâmico. Essas estruturas permitem a absorção de nutrientes eletropositivos, enquanto a estrutura de rede da macromolécula responde pela retenção e incorporação desses nutrientes.

Essa estrutura molecular do ácido γ -poliglutâmico, que garante sua potencial aplicação na indústria cosmética e de saúde, também resulta na versatilidade do produto que o permite ser comercializado em outros setores, como em tratamento de água.

A Nippon Poly-Glu Co, Ltd. é uma empresa voltada para tratamento e melhoria da qualidade de água, fundada no ano de 2002 em Osaka, Japão. Atua na produção de produtos voltados para a remoção de impurezas presentes na água. O *magnetized flocculant PG-M* reporta em sua constituição ácido γ -poliglutâmico e substâncias magnéticas, os flocos formados pela ação do floculante podem ser coletados e removidos da água através da gravitação do pó magnético que constitui o produto.

O outro produto voltado para tratamento de água da Nippon Poly-Glu Co. Ltd. é o $PG\alpha 21Ca$, floculante que reporta compostos orgânicos e inorgânicos em sua composição (Quadro 4). Este pode ser utilizado em qualquer água contaminada, atuando na implementação de parâmetros como cor e turbidez. Quando pela ação do produto, partículas contaminantes formam flocos, que sedimentam, separando-as da água, resultando em sua purificação. Os flocos são formados pela ação de duas diferentes vertentes, implementadas pela ação de composto inorgânico e orgânicos.

Os compostos inorgânicos presentes no produto são responsáveis pela neutralização das cargas negativas das partículas e, conseqüentemente, inativam a repulsão dessas cargas, condensando-as. Em seguida, com a função ativa dos grupos carboxílicos, o ácido γ -poliglutâmico age na formação de pontes entre as partículas condensadas, gerando rápida sedimentação. Ainda segundo a empresa, o produto funciona em ampla faixa de pH sem gerar alteração no pH da água ao final do processo.

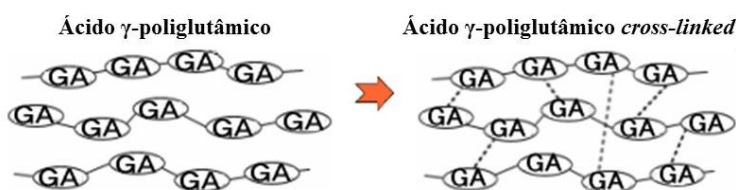
Quadro 4 - formulação aproximada do PGa21Ca de acordo com o *Material Safety Data Sheet* (MSDS)

Composto	Concentração (%)
CaSO ₄	70 a 80
Ca ₂ CO ₃	10 a 20
Ca ₂ Na ₃	<10
Al ₂ SO ₃	<10
Ácido γ -poliglutâmico	<10
Outros Componentes	<10

A Nippon Poly-Glu co, Ltd. apresenta em sua produção de ácido γ -poliglutâmico três formas distintas do produto, sendo: de baixo peso molecular, alto peso molecular e γ -PGA em ligação cruzada (*cross-linked*). As capacidades desta substância são quase ilimitadas, e por isso atrai grande interesse em diversos setores.

O ácido γ -poliglutâmico, tanto de baixo quanto de alto peso molecular, é formado pela ligação de grupos carboxílicos por ligações amida. O ácido γ -poliglutâmico *cross-linked* trata-se de uma estrutura em malha que apresenta peso molecular na ordem de dezenas de milhões Daltons (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura de rede formada pela indução de ligação cruzada, na molécula de γ -PGA



A estrutura de ligação cruzada permite absorver e reter água, aumentando aproximadamente 5000 vezes seu próprio peso. O maior peso molecular responde pela capacidade de retenção de água mais expressiva, sendo que quanto maior esse peso molecular das estruturas de ácido γ -poliglutâmico *cross-linked*, maior será viscosidade, já que essa conformação resulta em maior resistência na taxa de cisalhamento e escoamento da macromolécula em solução.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A extração de ácido γ -poliglutâmico foi efetuada a partir de três produtos comerciais, sendo dois de nacionalidade brasileira, aqui denominados como o N₁ e N₂, e um de nacionalidade japonesa, denominado N₃. O natto japonês com 40 g apresenta em sua constituição, soja e *Bacillus subtilis*. Para os produtos nacionais tem-se embalagem com 100 g e descrição como soja não transgênica, soja fermentada.

O floculante comercial PG α 21Ca da Nippon Poly-Glu Co. Ltd. foi utilizado, também, para extração e quantificação do ácido γ -poliglutâmico.

Como padrão, foi utilizado γ -PGA na sua forma sódica, produto da Shandong Freda Biotechnology, com pureza de 91,61% de γ -PGA.

Em todos os experimentos, reagentes de grau analítico e água ultrapura foram empregados para preparo de soluções. A água ultrapura (resistividade de 18,2 M Ω cm⁻¹ a 25 °C) foi obtida a partir do sistema de purificação de água Gehaka, modelo Master System MS2000.

O banho termostático com agitação e movimento recíproco Dubnoff, modelo 304 (Ethiktechnology) foi utilizado no processo de extração do γ -PGA.

No processo de extração de ácido γ -poliglutâmico fez-se uso de centrífuga de bancada Digital Excelsa® II modelo 206-BL FANEN, com velocidade máxima de 3600 rpm e a quantificação do γ -PGA foi realizada em espectrofotômetro da marca Hach, modelo DR3900. A viscosidade foi medida utilizando-se de viscosímetro Brookfield, modelo DV-II. Enquanto a viscosidade para os produtos Shandong Freda Biotechnology, γ -PGA para fins agrícolas e para cosméticos, foram realizados em Vibro-viscosímetro SV-10 A&D Company. A determinação de pureza do ácido γ -poliglutâmico no produto adquirido da Shandong Freda Biotechnology foi realizada em ICP Optima 7300 DV Perkin Elmer.

A caracterização do PG α 21Ca foi efetuada para verificar a presença de γ -PGA no produto comercial da Nippon Poly-Glu Co. Para isso, foram utilizados métodos como análise elementar e espectroscopia de infravermelho. A análise elementar foi utilizada para identificação de elementos comumente encontrados em compostos orgânicos como carbono, hidrogênio e nitrogênio. A análise elementar foi realizada em analisador elementar Perkin Elmer - modelo 2400. A fluorescência de raios X por dispersão em energia (ED-XRF) do PG α 21Ca foi efetuada utilizando-se de equipamento Panalytical, modelo Epsilon 3.

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada para investigar a presença de grupos funcionais do ácido γ -poliglutâmico, extraído do natto N₁, e do natto N₁, previamente à extração

do γ -PGA. Os espectros de infravermelho foram obtidos dos compostos pastilhados em brometo de potássio – grau espectroscópico, na faixa de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ em espectrofotômetro FT Perkin Elmer, modelo 16 PC.

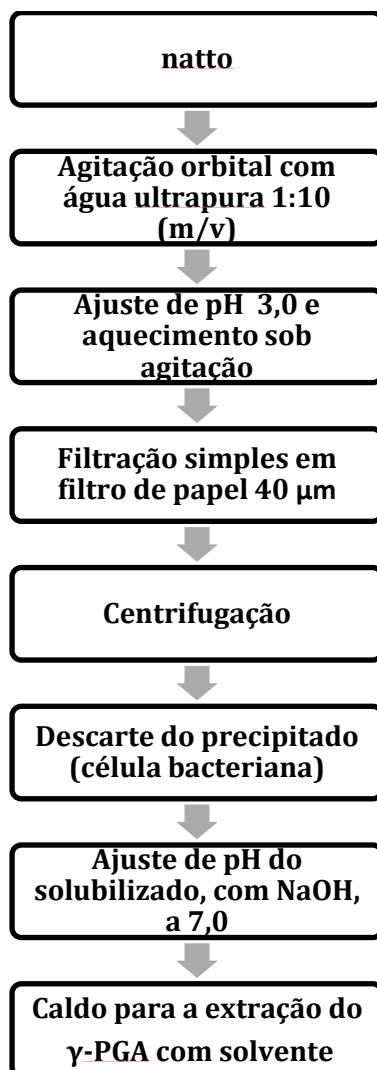
Os experimentos de viscosidade variando pH, espectroscopia de infravermelho para o γ -PGA antes e após a extração e de atividade flocculante foram realizados para o ácido γ -poliglutâmico presente no natto N1 utilizando metanol como agente de precipitação, devido à resultados preliminares no processo de extração.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL - NATTO

4.1 Precipitação de células bacterianas

A metodologia adaptada de Goto; Kunioka (1992) para extração do ácido γ -poliglutâmico a partir dos natts N₁, N₂ e N₃ foi conduzida conforme fluxograma apresentado na Figura 5. Verifica-se, inicialmente, a precipitação de células bacterianas em escala laboratorial, finalizando o processo com o caldo para extração do ácido γ -poliglutâmico em ação de solventes.

Figura 5 - Representação esquemática da precipitação e extração de células bacterianas



Fonte: Modificado de Goto; Kunioka (1992)

Inicialmente foi realizada a extração do γ -PGA com água ultrapura, na proporção de 1:10 de massa por volume (m/v) em agitador orbital a 150 rpm pelo período de uma hora. Em seguida, para realizar a precipitação das células bacterianas e isolar o biopolímero, ajustou-se o pH para 3,0, com ácido tricloroacético 6,25%. Levou-se o caldo por 20 minutos em banho-maria, com agitação e aquecimento a 50°C, para reduzir a viscosidade. Utilizou-se de filtração simples, para remover partículas grosseiras e a soja ainda presentes, levando-se, em seguida, à centrífuga, por 30 minutos a 3600 rpm. Descartou-se o precipitado, que corresponde as células bacterianas. O material solubilizado teve seu pH ajustado à 7,0 com solução de NaOH 39,997 g L⁻¹ (1 M) e 0,39 g L⁻¹ (0,1 M), resultando ao final dessa metodologia, no caldo para a precipitação do ácido γ -poliglutâmico através da ação de solventes orgânicos.

Em seguida, buscou-se quantificar as amostras finais, determinando a marca de natto que apresentasse melhor quantidade de γ -PGA por grama de natto, o solvente mais eficiente na extração e o período ideal em refrigeração para precipitação do γ -PGA sob ação do solvente.

4.2 Extração de γ -PGA de natto com acetona, álcool etílico e metanol

Nessa série experimental, a extração do ácido γ -poliglutâmico foi realizada utilizando os três natts, mediante o uso dos três solventes: acetona, etanol e metanol. A metodologia de extração foi adaptada de Kunioka (1997) e Brito (2014).

Na realização da extração com acetona, observou-se através de ensaios laboratoriais, que a melhor proporção seria de 1:4 de volume por volume (v/v) de caldo, para o solvente. Utilizou-se tubo de centrífuga modelo Falcon, com capacidade para 15 mL sendo, então, pipetado 3 mL de caldo extraído e, posteriormente, adicionado 12 mL de acetona refrigerada. observado, com a adição do solvente, a formação momentânea da rede característica da presença do γ -PGA. Em seguida, para fins comparativos deixou-se em repouso duas amostras, uma por 40 minutos e outra por 12 h, ambas sob refrigeração aproximada de 5 °C. Ao final de cada período, as amostras foram levadas em centrífuga por 30 minutos à 3600 rpm, descartando o sobrenadante. O precipitado foi redissolvido com 3 mL de água ultrapura, para então ser realizada novamente a fase de extração com a acetona, descarte do sobrenadante e ressolubilização com água ultrapura, obtendo-se ao final desse processo o ácido γ -poliglutâmico em solução.

Na extração de γ -PGA do natto com etanol utilizou-se 1:4 (v/v). O procedimento volta-se pela metodologia de acetona, a partir da adição de 3 mL de caldo no tubo Falcon,

adicionando-se 12 mL de etanol, em repouso por 40 minutos e outra por 12 h, ambas sob refrigeração de 5 °C. Após o período, procedeu-se a centrifugação por 30 minutos em 3600 rpm, descartando o sobrenadante e passando por ressolubilização do precipitado, com água ultrapura para nova adição de 12 mL de etanol, centrifugação e descarte do sobrenadante até obtenção de γ -PGA. Também foi observada a formação da rede característica da presença do ácido γ -poliglutâmico.

O mesmo andamento experimental foi adotado na a precipitação do γ -PGA utilizando metanol. No momento da adição do metanol, observou-se a formação da rede, indicando a capacidade de precipitação do biopolímero pela ação desse solvente. A metodologia seguiu-se dos mesmos procedimentos adotados na utilização da acetona e etanol, que consiste na proporção de 1:4 (v/v), do caldo e solvente, seguido de repouso por 40 minutos e por 12 h, em refrigeração. Após o período procedeu-se a centrifugação por 30 minutos em 3600 rpm, descartando o sobrenadante e passando por ressolubilização do precipitado, com água ultrapura, para em seguida repetir a fase de precipitação.

A extração para os três solventes foi seguida obedecendo com rigor o mesmo andamento experimental de precipitação do ácido.

4.3 Quantificação de biomassa seca

Na análise quantitativa de biomassa seca, para cada marca de natto estudada, os grãos foram submetidos à extração com água ultrapura, na proporção de meio natto/água ultrapura de 1:10 (m/v), em agitador orbital a 150 rpm, por uma hora. Em seguida, foi efetuada a filtração simples, para retirada de partículas sólidas e dos grãos de soja. O produto filtrado foi então submetido ao aquecimento de 50 °C em banho termostático, e correção para pH 3, para redução da viscosidade. A fase aquosa contendo massa celular foi centrifugada a 3600 rpm por 20 minutos, obtendo-se como precipitado a massa celular decantada e a fase aquosa livre de células. A fase solubilizada foi descartada e as células precipitadas foram lavadas, com água ultrapura e, novamente, centrifugadas. Em seguida foram submetidas à secagem em estufa a 65 °C até peso constante e a biomassa determinada por gravimetria.

4.4 Quantificação de γ -PGA

A quantificação do γ -PGA extraído do natto foi realizada mediante complexação com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A solução de CTAB foi efetuada pesando-se 5,844 g de cloreto de sódio em béquer de 25 mL adicionando-se água ultrapura para solubilização. Em outro béquer de 25 mL foi adicionado 3,645 g de CTAB, realizando a completa solubilização em água ultrapura. O conteúdo dos dois béqueres foi, então, transferido em balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água, resultando na solução 0,1 M de CTAB por 1 M de NaCl. A seguir, foi adicionado 2 mL de solução de extrato de γ -PGA, 8 mL de tampão fosfato pH 7 e 2 mL de CTAB, levando-se em agitação por 200 rpm a 30°C, por 20 minutos banho termostático. Na determinação da concentração de γ -PGA, uma alíquota de solução foi lida a 400 nm e a quantidade de γ -PGA calculada mediante construção da curva de calibração por espectrofotometria.

4.5 Construção da curva de calibração por espectrofotometria

A metodologia foi adaptada de Kanno; Takamatsu (1995). A curva de calibração foi construída a partir da complexação com brometo de cetiltrimetilamônio e consistiu na preparação de solução estoque de 200 mg L⁻¹ de γ -PGA (Shandong Freda Biotechnology - 700 kDa). A partir da solução estoque foi preparada uma série de padrões da substância nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, e 50 mg L⁻¹. Em tubo de centrífuga adicionou-se 8 mL de tampão fosfato pH 7, 2 mL de solução padrão e a solução CTAB na quantidade de 2 mL. As soluções foram mantidas em banho-maria a 30°C por 20 minutos. A curva de calibração para o γ -PGA foi obtida em espectrofotômetro a 400 nm.

O γ -PGA padrão (Tabela 5) foi utilizado na preparação da série de padrões. Para este produto tem-se a forma sódica do ácido γ -poliglutâmico. Neste caso, foi analisado o teor de sódio do sal, para correção das concentrações, através de calcinação.

Tabela 5 - Especificação do γ -PGA $\geq 92\%$ segundo o fabricante

γ -PGA	Especificação
Cor	Branco
Pureza	$\geq 92\%$
pH (solução de 1%)	5 – 7
Massa molecular	700 KDa
<i>Escherichia coli</i>	Negativo
<i>Salmonella</i>	Negativo
Metais	20 mg kg ⁻¹

Fonte: Shandong Freda Biotechnology

4.6 Análise elementar

A Análise elementar foi realizada para determinar as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio, onde a combustão de determinada amostra em atmosfera de oxigênio puro resulta na quantificação dos gases resultantes através de detector TCD (detector de condutividade térmica). Essa análise foi realizada para os três natts apresentados nesse estudo – N₁, N₂ e N₃, a fim de determinar a influência da disponibilidade de nutrientes básicos na produção de ácido γ -poliglutâmico.

4.7 Análise de viscosidade do γ -PGA para N₁, N₂ e N₃

Considerando que a viscosidade está relacionada diretamente com a presença do γ -PGA, conformação estrutural e massa molar, essa análise foi efetuada para interpretar a diferença nos valores de viscosidade do γ -PGA extraído das três diferentes marcas de natto adotadas nesse projeto: N₁, N₂ e N₃. A análise foi realizada em solução de 100 mg L⁻¹ de γ -PGA extraído para os três natts utilizados nesse estudo. O procedimento de extração do γ -PGA foi o descrito anteriormente, sendo que as análises procederam para o γ -PGA extraído com acetona, álcool etílico e metanol. A viscosidade foi medida em cinco repetições, a temperatura ambiente e nas mesmas condições para as nove soluções, com intervalos de 10 s, velocidade de 25 rpm e sensor de cisalhamento *spindle* SC4-18.

4.8 Análise de viscosidade do γ -PGA variando pH

O pH é fator decisivo na conformação estrutural do γ -PGA e está diretamente relacionado a viscosidade desse ácido em solução. Para verificar a influência do mesmo, foi realizada a leitura de viscosidade da solução de γ -PGA na concentração de 1 g L^{-1} . A análise foi efetuada em cinco repetições, com intervalos de 10 s, velocidade de 25 rpm e sensor de cisalhamento *spindle* SC4-18. Sendo que a correção de pH foi feita utilizando HCl 0,1M e NaOH 0,1M. Iniciando-se do pH 3 e ajustando os valores nas seguintes faixas de pH 4 a 10. A análise foi efetuada apenas para o γ -PGA extraído do natto N₁, devido à ensaios preliminares.

4.9 Análise de viscosidade do γ -PGA padrão

Objetivando compreender o comportamento viscosimétrico do ácido γ -poliglutâmico na sua forma sódica em solução, assim como a influência da concentração do biopolímero no produto nas alterações da viscosidade, foi também realizada a análise de viscosidade do ácido γ -poliglutâmico para fins agrícolas e para cosméticos da Shandong Freda Biotechnology. A concentração em solução utilizada foi a mesma das análises de viscosidade variando o pH do γ -PGA extraído do natto N₁, 1 g L^{-1} , devido à resultados preliminares no processo de extração e quantificação do produto.

4.10 Análise por espectroscopia no infravermelho para γ -PGA extraído do natto N1 e para o natto N1 antes da extração

Com o intuito de investigar os grupos funcionais e as ligações químicas na molécula de γ -PGA foi realizada análise de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), posteriormente a extração do γ -PGA, utilizando-se de metanol como solvente do natto N₁. A secagem em estufa com temperatura de 50° C em filme de teflon facilita a remoção do ácido γ -poliglutâmico, já que o mesmo, em secagem, adere à vidraria convencional.

Foi também realizado o FTIR para o natto N₁. O mesmo foi seco em estufa até apresentar peso constante. Em seguida foi realizada a cominuição, com pistilo e almofariz, e peneiramento em malha de 200.

As análises foram efetuadas apenas no natto N₁ e no γ -PGA extraído desse produto comercial devido à resultados preliminares que constataram maior eficiência nessa amostra.

A análise em infravermelho foi realizada em grau espectroscópico, na faixa de 4000 – 400 cm⁻¹.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL - P α 21Ca

5.1 Análise por espectroscopia no infravermelho para o P α 21Ca *in natura*

Seguido à extração do ácido γ -poliglutâmico a partir do natto, é possível realizar a quantificação e identificação do biopolímero através da curva no espectrofotômetro. O equipamento, em comprimento de onda de 400 nm identifica a turvação da solução devido à complexação pelo brometo de trimetilcetilamônio, que é proporcional à concentração de γ -PGA. Essa quantificação e identificação da presença do biopolímero no produto P α 21CA por espectrofotômetro, se torna inviável. A presença de outros elementos no produto resulta em turvação da solução que interfere na leitura realizada pelo equipamento.

Considerando a interferência de substâncias inorgânicas na identificação do γ -PGA presente no P α 21CA através da espectrofotometria, buscou-se identificar os grupamentos moleculares característicos das ligações de moléculas orgânicas do biopolímero, mediante a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

5.2 Análise elementar

Realizou-se a análise elementar com a finalidade de identificar a presença e teor dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes no produto comercial em estudo, que são elementos constituintes de moléculas orgânicas, como o ácido γ -poliglutâmico. A análise elementar permitiu compreender a presença do biopolímero através do teor dos elementos em questão. Foi também realizada a análise elementar do ácido γ -poliglutâmico na sua forma sódica do produto para cosméticos da Shandong Freda Biotechnology.

5.3 Extração de ácido γ -poliglutâmico do P α 21Ca

Na extração do γ -PGA do P α 21Ca, buscou-se realizar a separação da parte orgânica, constituída pelo biopolímero, da parte inorgânica do produto. Pela ação do álcool etílico, o P α 21Ca foi submetido a solubilização pelo solvente sob leve aquecimento de 35°C. A proporção utilizada foi de 10 g do produto, para 100 mL do solvente. Respeitou-se o tempo de repouso de 3 minutos para precipitação dos sais. O solubilizado foi levado à centrifuga por oito

minutos, a 3600 rpm. Em seguida, retirou-se o solubilizado, que foi filtrado à vácuo e deixado em capela de fluxo laminar até completa volatilização do solvente.

5.4 Análise de viscosidade após extração do ácido γ -poliglutâmico

Na realização da análise de viscosidade do γ -PGA extraído do PG α 21Ca pela metodologia utilizando álcool etílico, levou-se o γ -PGA separado dos sais para estufa à temperatura constante de 50°C até a completa volatilização do solvente, em seguida, adicionou-se 100 mL de água ultrapura ao ácido γ -poliglutâmico, quantificou-se a solução por espectrofotometria e submeteu-se a análise de viscosidade com cinco repetições, a temperatura ambiente, com intervalos de 10 s, velocidade de 25 rpm e sensor de cisalhamento *spindle* SC4-18.

5.5 Curva de pH

A curva de pH teve por finalidade avaliar as dissociações químicas e consequentes alterações no pH do γ -PGA na forma sódica, adquirido da Shandong Freda Biotchenology, e do PG α 21Ca que pela descrição do produto contém o ácido γ -poliglutâmico, também, na forma sódica.

A análise iniciou-se com o preparo das soluções de γ -PGA 91,61% e PG α 21Ca, na concentração de 10 g L⁻¹ para cada amostra. Em seguida, as soluções foram transferidas para béqueres de 250 mL, onde as leituras de pH foram realizadas com cinco repetições, a cada doze minutos, atingindo o período de uma hora. O mesmo experimento foi realizado em branco, em água ultrapura. Todos os experimentos foram desenvolvidos em triplicata.

6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ATIVIDADE FLOCULANTE

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, variação de valores de pH, diferença na atividade floculante em soluções com diferentes coagulantes, atividade floculante do $\text{PG}\alpha 21\text{Ca}$ e do γ -PGA na forma sódica adquirido da Freda Biotechnology. 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:

$$\text{Atividade Floculante} = \frac{1}{(\text{DO}_{550})\text{a}} - \frac{1}{(\text{DO}_{550})\text{b}}$$

Equação 3

A taxa de floculação foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de floculação} = \left[\frac{(\text{DO}_{550})\text{b} - (\text{DO}_{550})\text{a}}{(\text{DO}_{550})\text{b}} \right] \times 100$$

Equação 4

Onde:

$(\text{DO}_{550})\text{a}$ = Densidade óptica da amostra a 550 nm;

$(\text{DO}_{550})\text{b}$ = Densidade óptica do branco a 550 nm.

6.1 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 extraído do natto N₁, pela ação do metanol, realizando também o procedimento para o γ -PGA Shandong Freda Biotechnology para cosméticos (γ -PGA \geq 92%), 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 colóides. 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.

O uso do γ -PGA extraído do natto N₁ como floculante nas análises e cálculos de atividade floculante, justifica-se pelos resultados encontrados nos processos de extração e quantificação.

6.2 Atividade floculante γ -PGA em diferentes faixas de pH

Adotando-se a concentração de 10 mg L⁻¹ para γ -PGA extraído com metanol do natto N₁, a metodologia para atividade floculante foi reproduzida ajustando-se, previamente, o pH da solução de 4,5 mM de CaCl₂ 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.

6.3 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, ajustou-se 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.

6.4 Atividade floculante PG α 21Ca

Para avaliar a potencialidade do PG α 21Ca como quadro comparativo com o γ -PGA extraído do natto foi realizado o cálculo da atividade floculante, mantendo as concentrações indicadas pelo fabricante: 0,05; 0,06; 0,07; 0,09 e 0,1 g L⁻¹. A análise foi realizada em solução de 5 g L⁻¹ de caulim, nas mesmas condições da metodologia adotada. Repetiu-se análise nestas concentrações, com o acréscimo de γ -PGA extraído do natto, em concentração de 10 mg L⁻¹.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades do γ -PGA extraído do PG α 21Ca foram efetuadas com o intuito de realizar a verificação de parâmetros como análise elementar, onde buscou-se determinar os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes no produto, correspondentes ao material de origem orgânica, que no caso se relaciona à presença do ácido γ -poliglutâmico. Essa razão elementar pode indicar a presença do biopolímero. O infravermelho foi realizado buscando determinar as bandas características das ligações moleculares do ácido γ -poliglutâmico e das funções orgânicas presentes na estrutura característica do γ -PGA.

O peso molecular do γ -PGA está diretamente relacionado às condições de fermentação em que é gerado. Sendo que o mesmo pode diminuir durante o processo fermentativo na presença de determinadas enzimas, e essas mudanças se relacionam intrinsicamente com a viscosidade do meio (GOTO; KUNIOKA, 1992).

A viscosidade é diretamente afetada por alterações de pH e temperatura. A presença do γ -PGA tende a diminuir em baixos valores de pH, o que resulta em menor interação com a água (DO et al., 2001).

No princípio do processo fermentativo, quando a quantidade de γ -PGA presente no meio de cultivo é ainda baixa, o meio se comporta como fluido newtoniano, tendo a taxa de cisalhamento diretamente proporcional à tensão de cisalhamento aplicada, sendo a constante de proporcionalidade representada pela viscosidade absoluta (BAJAJ; SINGHAL, 2011; DE CESARO, 2013). Quando a concentração do γ -PGA vai aumentando com o crescimento da produção extracelular bacteriana, o meio passa a apresentar comportamento pseudoplástico onde a viscosidade não é absoluta e sim aparente, pois varia com a taxa de cisalhamento (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

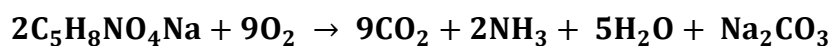
A atividade floculante do γ -PGA se apresenta como estudo preliminar do seu apelo ambiental. Através da prévia caracterização, se tornou possível a compreensão das características estruturais e ambientais desse produto que são capazes de influir na melhor geração de flocos e, conseqüente sedimentação de materiais que alterem a qualidade da água.

7.1 Natto

7.1.1 Curva para quantificação do ácido γ -poliglutâmico

O padrão utilizado se encontrava em sua forma sódica, onde o teor analisado de sódio por ICP na substância foi de 12,45% em peso. O teor teórico de sódio no ácido γ -PGA $C_5H_8NO_4Na$ é 13,59%, portanto, o teor teórico de γ -PGA no sal sódio foi de 86,41%, determinado por intermédio de cálculos estequiométricos.

Foi pesado 1,2316 g de amostras do ácido γ -poliglutâmico padrão em cadinho de platina com resolução de 0,1 mg e calcinado a 700 °C por 4 h, representada pela Equação 5. Após resfriamento em dessecador o resíduo branco constituído de carbonato de sódio foi pesado, resultando em 0,3534 g.



Equação 5

Considerando que o teor de sódio no Na_2CO_3 é 43,38%, e a massa do resíduo após calcinação foi 0,3534 g, têm-se como massa de sódio na amostra, de acordo com a equação 5:

$$0,3534 \text{ g} \times 0,4338 = 0,1533 \text{ g}$$

Equação 6

Portanto, o teor de sódio na amostra de ácido γ -poliglutâmico é igual a:

$$(0,1533 \text{ g} \div 1,2316 \text{ g}) \times 100 = 12,45 \%$$

Equação 7

Como o teor de sódio analisado foi de 12,45% e o teor teórico de sódio no sal de ácido γ -poliglutâmico ($2C_5H_8NO_4Na$) é 13,59%, logo o teor de pureza do sal Na^+ γ -PGA é de 91,61% ($C_5H_8NO_4Na$) (Equação 8).

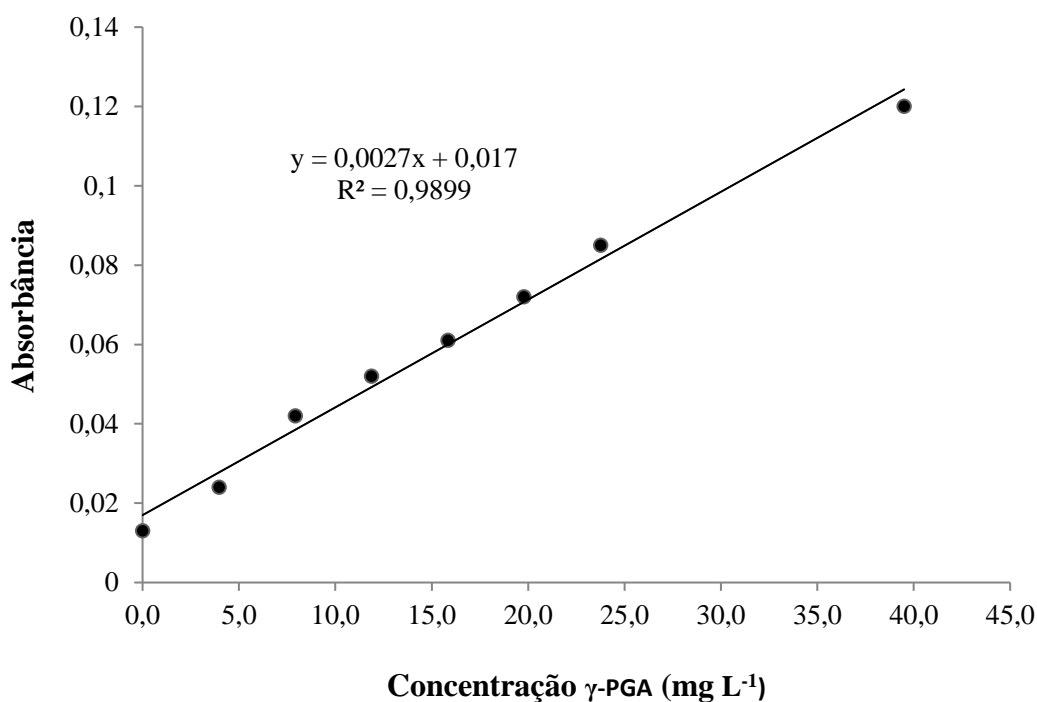
$$(12,45 \div 13,59) \times 100 = 91,61 \%$$

Equação 8

Sendo os valores de correção representados pela Tabela 6, e a curva utilizada na quantificação das amostras apresentou valor de R^2 igual a 0,989 demonstrado pela Figura 6.

Tabela 6 - Valores de correção de pureza do γ -PGA para construção de curva de calibração

Concentração do padrão (mg L ⁻¹)	Teor de pureza do (Na ⁺) γ -PGA (%)	Concentração corrigida (mg L ⁻¹)	Teor de γ -PGA no sal sódico	Teor como γ -PGA (mg L ⁻¹)	Absorbância 400 nm
0	91,61	0	86,41	0,0	0,013
5	91,61	4,5805	86,41	3,96	0,024
10	91,61	9,161	86,41	7,92	0,042
15	91,61	13,7415	86,41	11,87	0,052
20	91,61	18,322	86,41	15,83	0,061
25	91,61	22,9025	86,41	19,78	0,072
30	91,61	27,483	86,41	23,75	0,085
50	91,61	45,805	86,41	39,5	0,12

Figura 6 - Curva de quantificação para o γ -PGA

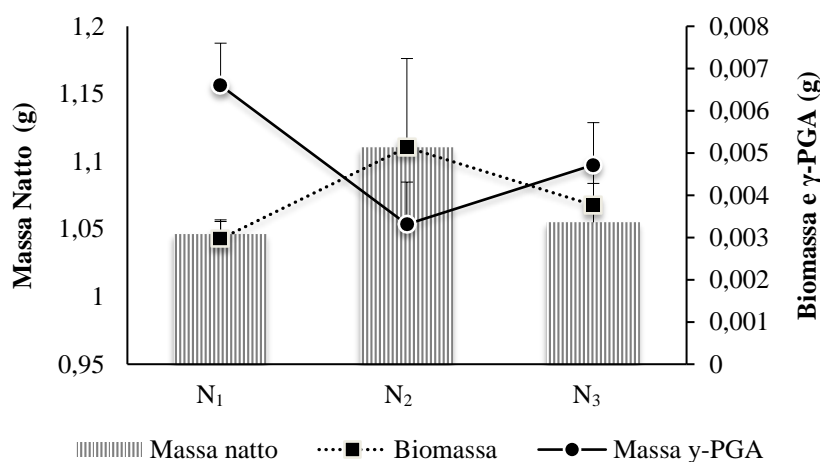
O CTAB ao se ligar ao ácido γ -poliglutâmico, forma um complexo de micelas do tipo insolúvel em água, altamente disperso, o que resulta em aumento na turbidez (ASHIUCHI, 2011). Esse aumento de turbidez, representado pelos valores de absorbância lidos no comprimento de 400 nm, é diretamente proporcional à concentração do biopolímero em solução. Como representado pela Figura 6, onde a equação $y = 0,0027x + 0,017$ apresentou boa linearidade com $R^2 = 0,9899$.

7.1.2 Produção de biomassa seca

Dentre as várias funções do γ -PGA produzido pelo microrganismo, uma delas é a de reserva nutritiva, onde o microrganismo produtor excreta enzimas com a finalidade de clivar a molécula do biopolímero, disponibilizando-o como fonte energética (KIMURA et al., 2004).

A produção da biomassa seca, correspondente as células bacterianas presentes no natto, responsáveis pela fermentação e produção do biopolímero, foi inversamente proporcional a quantidade em massa do γ -PGA extraído do meio fermentativo do natto N₁, que também apresentou maior índice de γ -PGA por grama de natto. Podendo ser um indicativo da maior eficiência no processo fermentativo das cepas presentes nesse produto, já que em menor quantidade, foram capazes de produzir alta concentração de γ -PGA. Já o natto N₂, apresentou maior presença de células bacterianas e menor produção de γ -PGA (Figura 7).

Figura 7 - Produção de biomassa seca e γ -PGA por marca de natto comercial



Constatada a diferença na quantidade de ácido γ -poliglutâmico excretado para o meio extracelular nos três nattos, considera-se que a disponibilidade de nutrientes foi diferente nas três cepas bacterianas responsáveis pela produção do γ -PGA em cada natto, ocasionando clivagem das moléculas do biopolímero presente no meio extracelular, disponibilizando carbono e nitrogênio como formas de nutrientes às bactérias.

Pela análise elementar dos nattos N₁, N₂ e N₃ (Tabela 7), os resultados indicam índices de carbono/nitrogênio muito próxima para os três substratos, confirmando que a quantidade de nutriente, nos três casos, não foi fator decisivo na produção do biopolímero pelos *Bacillus*.

Tabela 7 - Análise elementar de natto N₁, N₂ e N₃

Natto	C/%	H/%	N/%	C/N
N ₁	50,70	8,02	6,10	8,31
N ₂	50,12	7,76	6,25	8,02
N ₃	48,77	7,51	6,27	7,78

O processo de fermentação pode ter se estendido por diferentes períodos de tempo em cada natto. No início do processo fermentativo, observa-se maior crescimento bacteriano, em seguida, é observado um pico na produção de γ -PGA.

O teor de umidade é determinante em fermentação em estado sólido, como acontece com o natto. A transferência de oxigênio e nutrientes é dependente do filme superficial de água presente no substrato (BRITO, 2014). Assim como o controle térmico, já que processos de crescimento microbiano são exotérmicos e o calor gerado em excesso deve ser controlado, já que é desfavorável ao crescimento bacteriano (HAMBLI, 2002).

A quantidade inicial do inóculo bacteriano é determinante na produção de biomassa durante o processo fermentativo (CHEN et al., 2005). Assegurar adequação na concentração de inoculo ao substrato se faz necessário (BAYSAL et al, 2003).

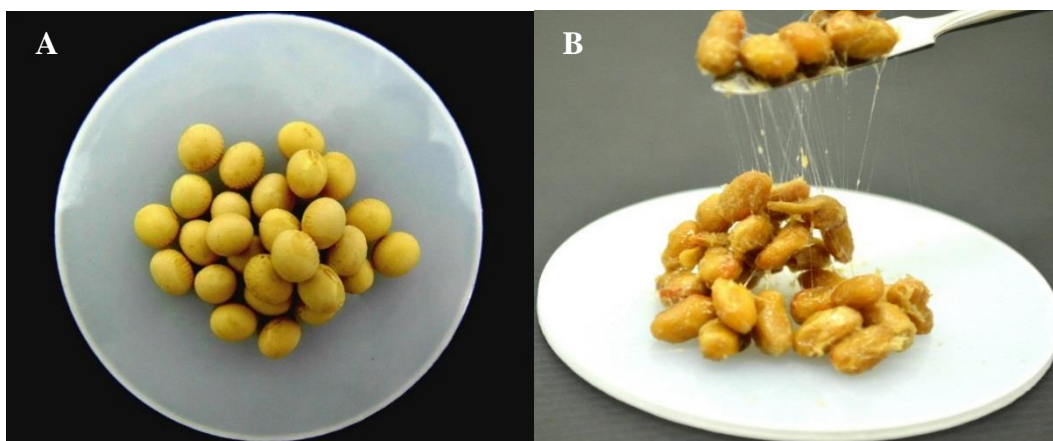
De forma generalizada, fatores como controle térmico, agitação, umidificação, tempo de fermentação, quantidade de inóculo por quantidade de substrato, entre outros, são determinantes na produção de ácido γ -poliglutâmico. Sendo que a quantidade de nutrientes, representados pela proporção C/N, no caso desse estudo não foi o fator decisivo na quantidade de biopolímero produzido, contudo, pode ter ocorrido diferença na disponibilização desses nutrientes, devido à possíveis formas distintas de fermentação nos três natts. Indicando que para o mesmo substrato, no caso a soja, com a mesma quantidade de carbono, hidrogênio e nitrogênio representados pela análise elementar, não se alcança a mesma produção de ácido γ -poliglutâmico.

7.1.3 Concentração de γ -PGA em diferentes marcas de natto

O natto é oriundo de processo fermentativo de grãos de soja, ou seja, a fermentação se dá em estado sólido (Figura 8). Esse processo é dependente de diversos fatores como umidade, cepa, temperatura, agitação, aeração, pH. Por tratar-se de alimento comercial, estes parâmetros

não são controlados de forma a favorecer maior produção de γ -PGA, já que não é a finalidade para a qual se destina o produto em estudo.

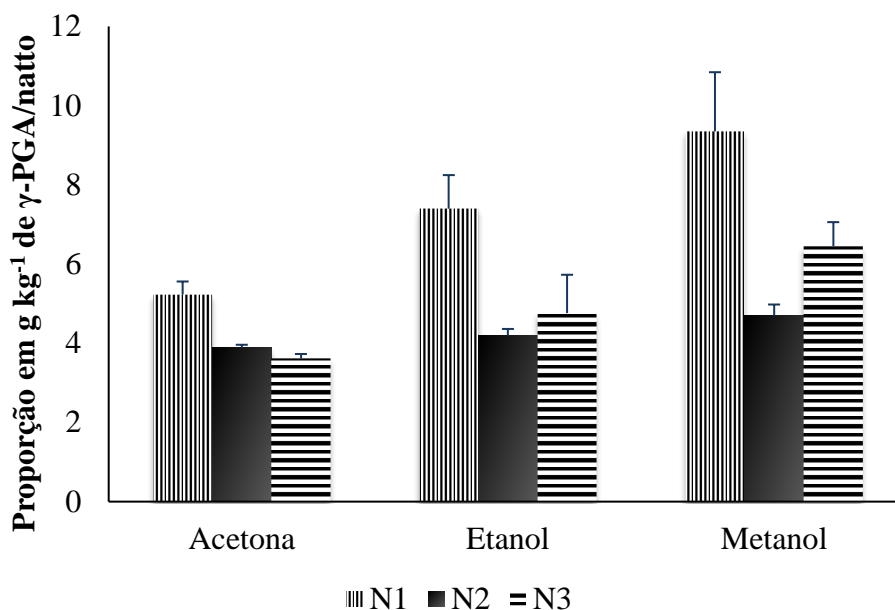
Figura 8 - Soja *in natura* e natto



Legenda: A: grãos de soja *in natura*; B: grãos de soja após fermentação pelo *Bacillus subtilis* (natto) apresentando a viscosidade característica da presença do ácido γ -poliglutâmico.

Os mecanismos utilizados nos processos fermentativos desses produtos são desconhecidos, mas foi possível observar diferenças significativas na produção de γ -PGA nos três produtos analisados. Em estudos conduzidos por Xu et al. (2005), a produção de γ -PGA em estado sólido resultou num valor de $83,61 \text{ g kg}^{-1}$ na proporção substrato sólido e γ -PGA. Brito (2014) atingiu em seu estudo produção de $46,191 \text{ g kg}^{-1}$ de γ -PGA utilizando subproduto fibroso de soja como substrato e casca de arroz como agente aerador. Os nattsos N_1 , N_2 e N_3 , apresentaram baixa quantidade em gramas de γ -PGA por quilograma de natto, como ilustrado pela Figura 9.

Metodologias com estudos voltados à produção de γ -PGA apresentam controle de parâmetros decisivos em processos fermentativos e a adição de nutrientes como sais minerais e fontes de nitrogênio, responsáveis por aperfeiçoar a ação bacteriana na produção do biopolímero. No caso do natto, por ser um alimento sem finalidade de produção de γ -PGA, esses parâmetros de produção não são controlados, acarretando em uma produção inferior de γ -PGA, quando comparado aos estudos citados.

Figura 9 - Produção de ácido γ -poliglutâmico por kg de natto

A amostra N₂ apresentou valores próximos na quantidade de γ -PGA presente nos três solventes adotados, enquanto N₁ e N₃ obtiveram diferença significativa entre acetona, etanol e metanol, sendo que o metanol foi o solvente de maior potencial de precipitação do γ -PGA dos natts. O N₁ foi o natto que apresentou, em todos os solventes utilizados, a melhor concentração do biopolímero.

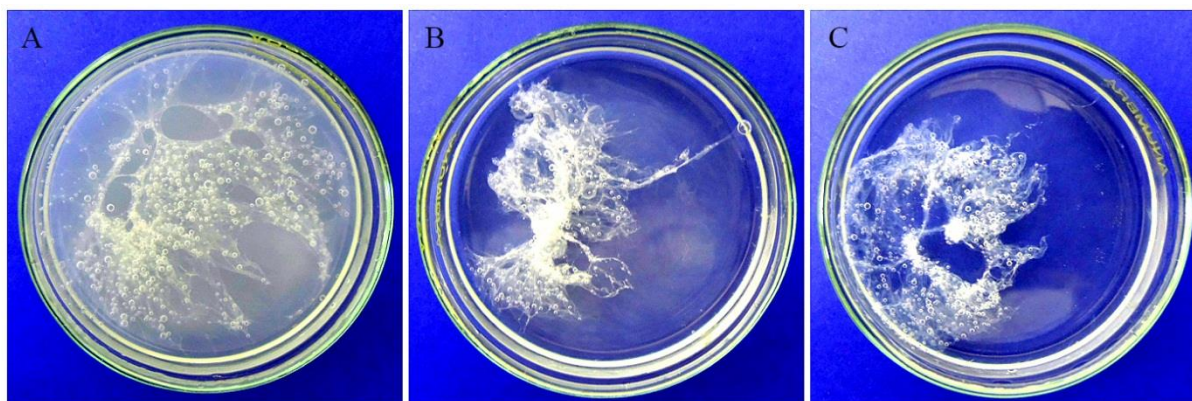
7.1.1 Formação de rede de precipitação de biopolímero

Algumas substâncias orgânicas, em solução, apresentam como característica a formação de “rede” indicativa da presença polimérica, após a adição de solventes orgânicos (PEREIRA, 2004; BRITO, 2014).

A alteração de variáveis em solução, como utilização de solventes orgânicos, permite a agregação de grupos poliméricos em soluções aquosas, acarretando a formação da rede polimérica, que pode ser desfeita de forma reversível (MAIA et al, 2003). As zonas de compressão polimérica e a rede formam-se, por intermédio de repulsões eletrostáticas intermoleculares (VILLETTI, 2001). No momento em que o solvente orgânico é adicionado à solução que contenha ácido γ -poliglutâmico forma-se, instantaneamente, a “rede” como característica da precipitação do biopolímero (BRITO, 2014). A capacidade de precipitação de

ácido γ -poliglutâmico por solventes orgânicos pode ser observada, pela formação instantânea da rede, manifestação característica para biopolímero (Figura 10).

Figura 10 - Formação de rede característica da presença do ácido γ -poliglutâmico em solução



Legenda: Reação de formação instantânea de rede utilizando a proporção de 1:4, sendo 3 mL de extrato de ácido γ -poliglutâmico e 12 mL de solvente: a) acetona; b) etanol e c) metanol.

Em solução aquosa, o ácido γ -poliglutâmico sofre solvatação. Ao entrar em contato com a água inicia-se força de atração intermolecular, entre o biopolímero aniônico e a extremidade positiva das moléculas polarizadas de água. No processo de solubilização, valores elevados de constante dielétrica representam baixa força de atração entre os íons de determinada substância no seio do solvente e a dissolução é favorecida (FELTRE, 2004).

Os solventes orgânicos, por terem constante dielétrica inferior à da água, ao serem adicionados à solução, reduzem o poder de solvatação da água, resultando em compressão da cadeia do γ -PGA, que responde pelo processo de precipitação. A agregação dos monômeros em macromoléculas é consequente à exclusão do solvente (TASHIMA, 2007).

Enquanto duas moléculas podem atrair-se no espaço livre, elas podem repelir-se no meio, caso a energia em forma de trabalho, necessária ao deslocamento de solvente, exceda o ganho, pela aproximação das moléculas do soluto (REICHARDT, 2004).

Com adição de solvente orgânico à solução aquosa de γ -PGA, a energia necessária ao deslocamento do solvente foi superior à energia necessária à aproximação das moléculas do soluto, gerando assim a precipitação do biopolímero, ou seja, a força intramolecular do biopolímero prevalece.

Como consequência da redução do contato de polieletrólitos com as moléculas de água, as interações intramoleculares poliméricas são predominantes, levando a formação da rede polimérica (DUARTE, 2011).

Por outro lado, os solventes utilizados (acetona, etanol e metanol), compostos polares, são solúveis em água, uma vez que as interações dipolo-dipolo que se estabelecem entre as moléculas de água são da mesma ordem de grandeza das atrações do mesmo tipo existentes entre as suas moléculas, bem como entre as moléculas de água.

Substâncias com baixa densidade de carga apresentam interação mais fraca com a água do que a interação de dipolo entre as moléculas de água. Enquanto substâncias com alta densidade de carga exibem maior interação com a água (DUARTE, 2011).

Dentre os álcoois comuns utilizados, a composição química pode incrementar a reação em razão de baixo peso molecular ou constituído por cadeias alquílicas menores, tais como metanol e etanol. Contudo, em andamento experimental o metanol quando comparado ao etanol apresenta como desvantagem sua maior periculosidade durante o manuseio. Outro fator deve-se pelo etanol (álcool etílico) ser muitas vezes considerado bipolar, por dissolver com facilidade substâncias orgânicas apolares.

O coeficiente de partição água-octanol é uma variável físico-química amplamente utilizada que representa a razão entre as concentrações dos solutos nas fases, no caso água e octanol. O $\log K_{ow}$ fornece o parâmetro de interpretação, referente ao caráter hidrofílico de determinada substância, onde quanto menor o valor de $\log K_{ow}$, maior a hidrofílicidade da substância (MEYLAN, 1996). Nesse caso, o metanol (Tabela 8) é a substância que apresenta maior afinidade com a água, quando comparado aos outros dois solventes utilizados neste trabalho, o que justifica os valores apresentados na precipitação do ácido γ -poliglutâmico, utilizando álcoois como agentes de precipitação, onde o metanol foi para os três natts utilizados o que apresentou maior capacidade de extração do γ -PGA (Figura 11).

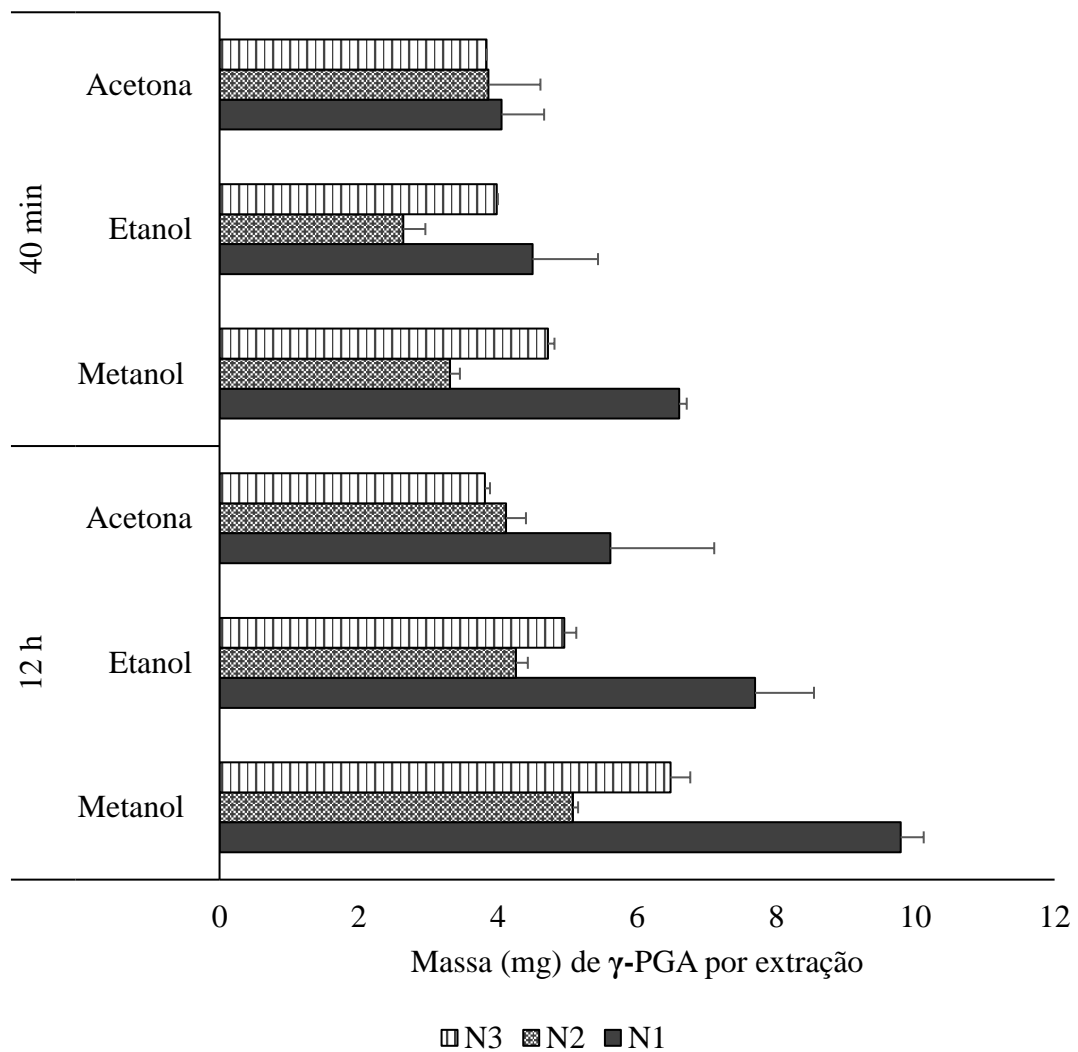
Tabela 8 - Valores do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$)

Solvente	Log K_{ow}
Acetona	-0,24
Etanol	-0,32
Metanol	-0,82

Fonte: National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) - International Chemical Safety Cards (ICSC)
 Legenda: Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$)

Através do log Kow característico de cada solvente, tem-se possível entendimento pela maior eficiência do metanol na extração γ -PGA, na ordem metanol > etanol > acetona (Figura 11).

Figura 11 - Comparativo da extração em miligramas do γ -PGA nos natts N₁, N₂ e N₃ por repouso em refrigeração por 40 min e por 12 h utilizando diferentes solventes orgânicos como agente de precipitação



Na presença de não solvente e em baixas temperaturas, o volume das cadeias poliméricas em solução tende a diminuir, sendo perceptível sua presença em solução ao adicionar a acetona, etanol e metanol pela formação da rede (CANEVAROLO JÚNIOR, 2006). A compressão das cadeias se mantém constante após a formação inicial da rede, resultando ao

final em massa compacta precipitada no solvente, podendo inclusive, ser separada manualmente com o auxílio de espátula (Figura 12).

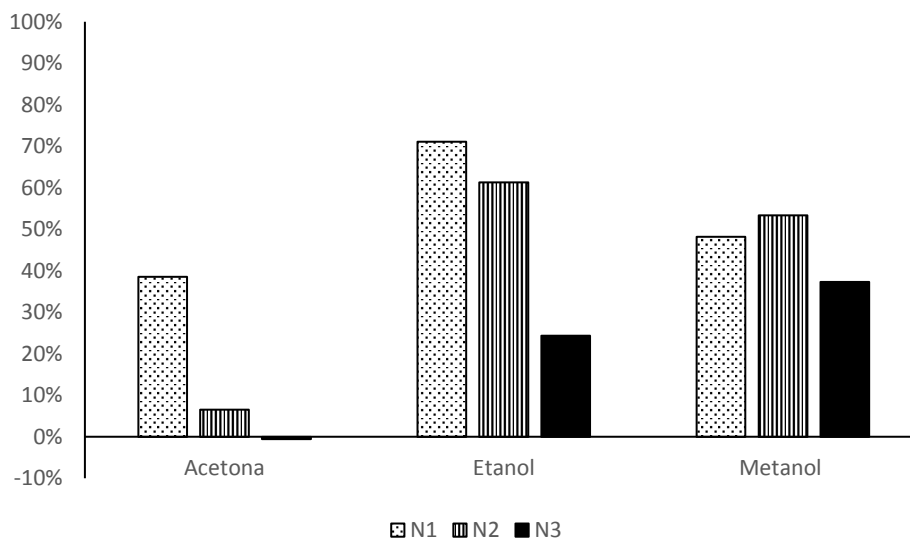
Figura 12 - Precipitação após 12 horas em refrigeração à 5 °C



A temperatura também foi um parâmetro decisivo na precipitação do γ -PGA, assim como o tempo de repouso em refrigeração. Na presença de não solvente e em baixas temperaturas, o volume ocupado pela cadeia polimérica tende a diminuir, facilitando o processo de precipitação. E, se a temperatura se mantiver baixa por maior período tem-se a precipitação de moléculas de γ -PGA presentes na solução.

Segundo os resultados apresentados pela Figura 13, constatou-se a diferença no comparativo das extrações efetuadas em resfriamento de 40 minutos e em resfriamento, por tempo estendido de 12 h. Os valores de aumento percentual na quantidade de γ -PGA extraído em 12 h de repouso no comparativo à 40 min foi positivo nos três natts utilizando os três solventes, tendo como exceção apenas o natto N₃, que apresentou valor percentual negativo na extração utilizando acetona, indicando que a extração de 40 min não foi superior à de 12 h para esse caso.

Figura 13 - Aumento percentual na extração de ácido γ -poliglutâmico utilizando refrigeração pelo período de 12 h comparada ao período de 40 min



Na avaliação da significância estatística dos tratamentos adotados na precipitação de γ -PGA utilizando diferentes solventes após extração de 12 h em refrigeração, adotou-se o uso da tabela ANOVA, que é teste estatístico que mostra se existe diferença significativa entre grupos distintos. A análise foi realizada para cada natto (N_1 , N_2 e N_3), após extração de 12 h com os três diferentes solventes (Tabelas 9, 10 e 11). Foi considerada a variação na quantidade de ácido γ -poliglutâmico, adotando-se uso dos diferentes solventes.

Constatou-se que a análise de variância entre os grupos (etanol, metanol e acetona) sobre variância resultou, para os três natts, um valor de F (Estatística F) maior que o valor de F crítico. O valor de P (Probabilidade de Significância) representou probabilidade significativa de que a diferença entre os grupos de solventes é uma diferença real e não ao acaso, já que nas três análises de variância para os natts o valor de P foi $<$ que 0,05, representando boa confiabilidade nos resultados apresentados nesse teste.

Tabela 9 - Tabela ANOVA natto N_1 para extração de 12 h considerando a variação na quantidade de γ -PGA extraído pelos diferentes solventes adotados

Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F	Valor P	F crítico
Entre grupos	47,34443	2	23,67222	23,92364	0,001383	5,143253
Dentro dos grupos	5,936944	6	0,989491			
Total	53,28138	8				

Legenda: Soma dos quadrados (SQ), grau de liberdade (GI), média dos quadrados (MQ), estatística F (F), Probabilidade de significância (Valor-P)

Tabela 10 - Tabela ANOVA natto N₂ para extração de 12 h considerando a variação na quantidade de γ -PGA extraído pelos diferentes solventes adotados

Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,615491	2	0,807746	20,88137	0,001982	5,143253
Dentro dos grupos	0,232096	6	0,038683			
Total	1,847587	8				

Legenda: Soma dos quadrados (SQ), grau de liberdade (GI), média dos quadrados (MQ), estatística F (F), Probabilidade de significância (Valor-P)

Tabela 11 - Tabela ANOVA natto N₃ para extração de 12 h considerando a variação na quantidade de γ -PGA extraído pelos diferentes solventes adotados

Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	26,11681	2	13,0584	12,79425	0,006853	5,143253
Dentro dos grupos	6,12388	6	1,020647			
Total	32,24069	8				

Legenda: Soma dos quadrados (SQ), grau de liberdade (GI), média dos quadrados (MQ), estatística F (F), Probabilidade de significância (Valor-P)

7.1.2 Análise de viscosidade para diferentes marcas de natto

A viscosidade se dá em função de diversos fatores. Mantendo-se as mesmas condições de temperatura, pH e concentração nas três amostras analisadas, observou-se diferença significativa entre as marcas de natto investigadas, assim como no γ -PGA extraído por diferentes solventes.

O maior valor de viscosidade foi observado no natto N₁, utilizando o metanol como solvente (Tabela 12). O metanol apresentou maior eficiência no processo de extração, assim como também demonstrou maior seletividade na extração do ácido γ -poliglutâmico, pela ausência perceptível de outras substâncias precipitadas, como pode ser visualizado pela Figura 10. A utilização do metanol como agente de precipitação pode ter influenciado na taxa de cisalhamento da solução.

Tabela 12 - Valores de viscosidade (mPa.s) em diferentes marcas de natto, para soluções de γ -PGA após extração, mantendo as mesmas condições

	N ₁	N ₂	N ₃
Acetona	13,1	10,37	7,5
Etanol	12,2	10,4	7,5
Metanol	15	14,1	10,3

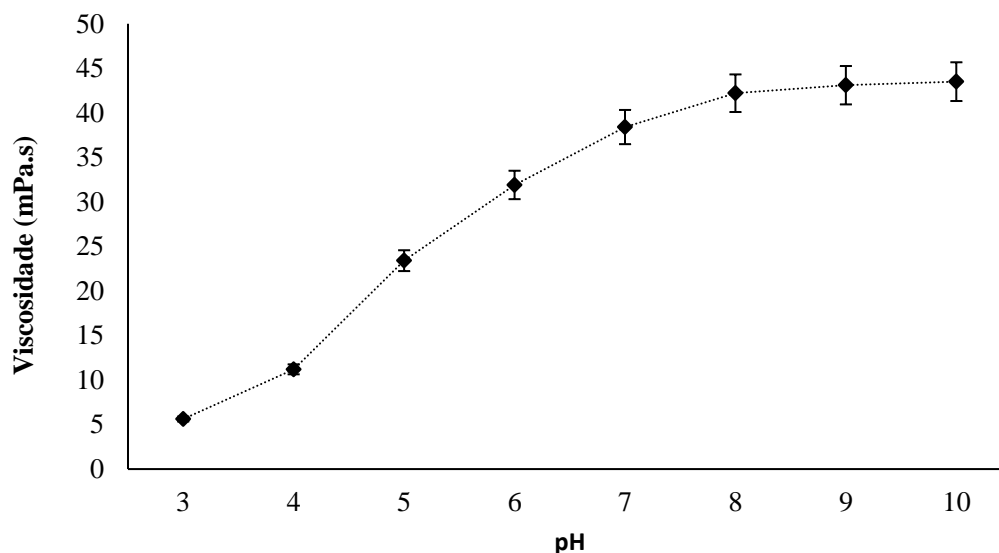
Como a viscosidade está intrinsecamente ligada à massa molecular do soluto presente em solução, já que uma maior massa molecular implica em maior resistência na medida da viscosidade. O resultado dessa análise permite interpretar que no caso do natto N₁, a massa molecular do ácido γ -poliglutâmico, produzido no processo de fermentação, apresentou valor superior aos outros dois natts estudados.

7.1.3 Análise de viscosidade em diferentes faixas de pH

Na análise de viscosidade da extração γ -PGA em faixas de pH distintas, observou-se maiores valores de viscosidade com o aumento do pH. Na sua forma ácida, em baixos valores de pH, o γ -PGA está em sua forma de ácido livre não ionizado, devido à fortes ligações intramoleculares de hidrogênio. A medida que se aumenta o pH, interrompe-se essas ligações de hidrogênio e os grupos carboxílicos da moléculas transformam-se em grupos aniônicos. Antigindo o pH 6, ou acima desse valor, os grupos carboxílicos da molécula tornam-se ionizados, ou seja, o aumento do pH resulta em maior solubilidade na presença de γ -PGA, assim como a viscosidade acompanha esse aumento, até atingir o valor de pH 8 (HO et al., 2006).

Como apresentado na Figura 14, o ácido γ -poliglutâmico extraído do natto representou o comportamento descrito por Ho et al. (2006) onde a viscosidade acompanha o aumento nos valores de pH, mostrando-se com maior estabilidade no pH a partir do pH 8, onde os grupos carboxílicos estão ionizados.

Figura 14 - Comportamento apresentado pela variação da faixa de pH na viscosidade ácido γ -poliglutâmico extraído da amostra N₁



7.1.4 Análise de viscosidade de produtos da Shandong Freda Biotechnology

Foi também realizada a análise de viscosidade utilizando os produtos adquiridos da Shandong Freda Biotechnology (Tabela 13). Segundo a descrição dos produtos fornecida pelo fabricante, a concentração de ácido γ -poliglutâmico em um produto é $\geq 30\%$, e o mesmo é destinado para uso agrícola, enquanto no outro a concentração é $\geq 90\%$ e é comercializado para confecção em cosméticos. Nos dois produtos foi realizado o teste de viscosidade, mantendo a concentração de 1 g L^{-1} .

Tabela 13 - Viscosidade dos produtos Shandong Freda Biotechnology e γ -PGA extraído do natto

Viscosidade (mPa.s) para solução de 1 g L^{-1}	
Ácido γ -poliglutâmico para uso agrícola	7,4
Ácido γ -poliglutâmico para cosméticos	24,6
Ácido γ -poliglutâmico natto N ₁ pH 7	38,4

Tanto no produto para uso agrícola, quanto para cosméticos, a viscosidade foi inferior quando comparada à do ácido γ -poliglutâmico extraído do natto, para pH 7. Foi realizada a análise de correlação entre a concentração de γ -PGA no natto e nos produtos da Shandong Freda

Biotechnology, correlacionando essas concentrações aos valores de viscosidade. O valor do coeficiente de correlação entre essas variáveis foi de 0,987, ou seja, o valor próximo a 1 do resultado da análise indica forte correlação entre os dois parâmetros, concentração de γ -PGA e viscosidade em solução.

A concentração de ácido γ -poliglutâmico no produto destinado à agricultura é baixa, consequentemente, sua viscosidade foi menor. Na análise em ICP, o γ -PGA destinado a cosméticos, teve concentração de ácido γ -poliglutâmico no valor de 91,61%, apesar de não se encontrarem na conformação de cadeia aberta randômica, os sais ionizados de γ -PGA se comportam como tal, conferindo ao sal boa solubilidade em água (HO et al., 2006). O sal de γ -PGA em solução responde por uma leve acidificação do meio, como apresentado na curva de pH desenvolvida nesse estudo (Figura 20).

A acidificação do meio, responde pela redução na viscosidade, assim como a diferença de 8,39%, referente ao menor teor de γ -PGA no sal de sódio também justifica o menor valor de viscosidade encontrado entre as soluções de γ -PGA extraído do natto e o γ -PGA sódico adquirido da Shandong Freda Biotechnology, realçando que a concentração do ácido γ -poliglutâmico na solução, assim como o pH, são fatores que influem diretamente nos valores de viscosidade.

7.1.5 Análise por espectroscopia no infravermelho para γ -PGA extraído do natto N1 e para o natto N1 antes da extração

O γ -PGA é um biopolímero composto unicamente por uma das formas ou pelas duas formas enantioméricas (D- e L-) do ácido glutâmico. O γ -PGA é altamente solúvel e sequestrante de moléculas de água. Ao contrário das proteínas, onde os aminoácidos são ligados por ligações α -amino, no γ -PGA as ligações são do tipo γ -amino. Deste modo este polímero torna-se resistente à ação de proteases, capazes de clivar apenas as ligações α -amino. (CANDELA; FOUET, 2006).

A análise FTIR em pastilha de KBr foi realizada, posteriormente, à extração de γ -PGA do natto N₁ utilizando-se de metanol como agente precipitante (Figura 15). Os espectros foram obtidos no intervalo de frequência de 4000-600 cm⁻¹. Como padrão tem-se o γ -PGA na forma sódica (91,61%), da Shandong Freda Biotchenology. Na Tabela 14 tem-se as bandas observadas em FTIR para γ -PGA sódico da Shandong e material obtido após extração de γ -PGA de natto N₁, com metanol.

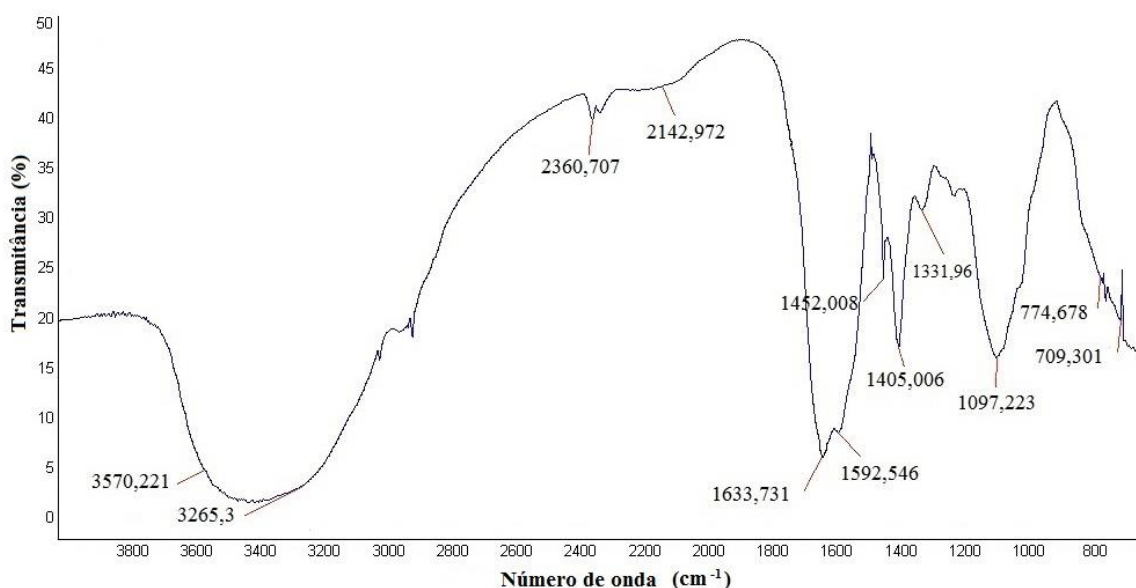
Tabela 14 - Bandas observadas em FTIR (cm^{-1}) para γ -PGA sódico da Shandong Freda Biotchenology, como material de referência e após extração de γ -PGA de natto N₁, com metanol.

Substância	C-O	Amida I	C-N	N-H	O-H
γ -PGA – Shandong	1404,41	1638,58	1128,92	697,20	3433,00
γ -PGA – N ₁ metanol	1452,00	1633,73	1097,22	709,30	3265,29

Segundo a Tabela 14 de valores de absorção no infravermelho, para o composto extraído do natto N₁ verifica-se bandas de absorção: amida I com N-H banda de flexão a 1633 cm^{-1} ; vibrações de estiramento de grupos carbonila C=O a 1452 cm^{-1} . Há também contribuições em menor escala das vibrações de estiramento de C-N a 1097 cm^{-1} e de dobramento N-H a 709 cm^{-1} , além da banda de estiramento O-H a 3265 cm^{-1} . O pico de absorção a $3400\text{-}3450 \text{ cm}^{-1}$ é característico do estiramento OH de moléculas de água adsorvidas. Os espectros da extração do ácido γ -poliglutâmico com metanol estão em conformidade, com presença de grupos carboxílico, hidroxila, carbonila e amida (Ho et al. 2006).

A banda amida I presente no espectro de FTIR (Figura 15) é características do γ -PGA, onde os aminoácidos são ligados pelo γ -amino e estão diretamente relacionados à conformação randômica em cadeia aberta, característica do pH próximo a neutralidade, onde foi realizada a secagem e preparação da amostra para a análise de espectroscopia.

Figura 15 – Espectro infravermelho do ácido γ -poliglutâmico extraído do natto N₁ utilizando-se de metanol, como agente de precipitação



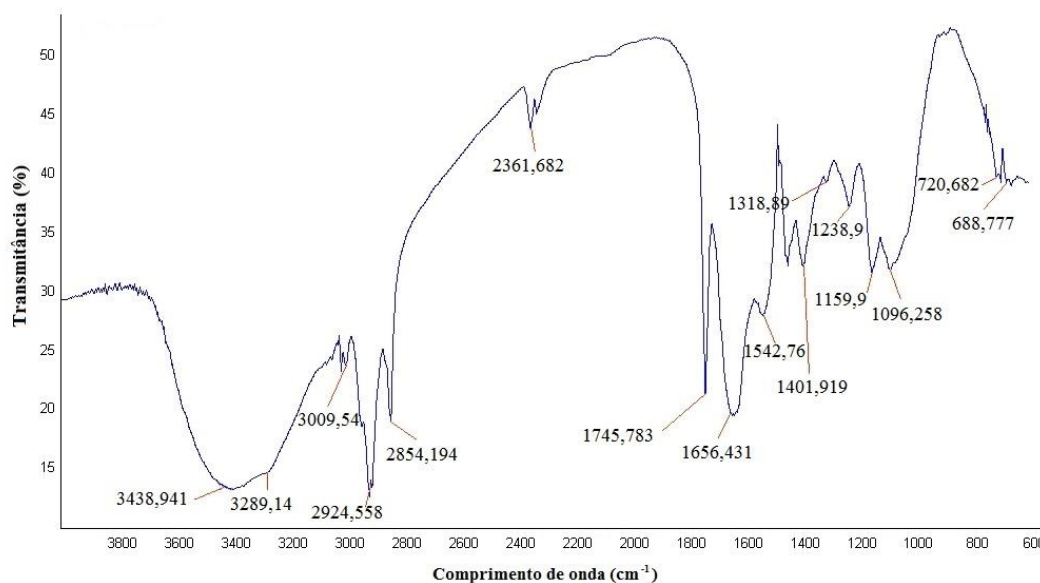
O espectro representado na figura 15 permite, portanto, identificar a presença dos picos característicos da amida, e grupos carbonila e carboxila, que são grupos funcionais e preferenciais ao processo de floculação em polieletrólitos (WU; YE, 2007).

Biopolímeros constituídos de aminoácidos são muito semelhantes às proteínas (KUNIOKA, 1997). O natto é um alimento japonês oriundo de processo fermentativo de grãos de soja, que tem como característica odor de ácidos graxos de cadeia curta amoniacal, além de ser constituído do polímero altamente viscoso, o ácido γ -poliglutâmico (IKEDA et al., 1984).

Pietrzak e Miller (2005), utilizando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, analisaram grãos de soja e com base nos picos característicos de cada componente, determinaram a presença dos grupamentos: amida I a 1650 cm^{-1} associada à proteína, éster lipídico a 1545 cm^{-1} e a região de $1200\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$ para carboidratos, sendo que a quantidade e configuração das proteínas apresenta variação ao longo do cotilédone, assim como a quantidade de lipídio e carboidrato.

Para o espectro referente ao natto N₁ (Figura 16), a indicação de picos na faixa de $1238,9\text{ cm}^{-1}$ a $729,682\text{ cm}^{-1}$ é atribuída à presença de carboidratos componentes dos grãos de soja, enquanto o grupamento lipídico é identificado na faixa de $1542,76\text{ cm}^{-1}$. A presença do ácido γ -poliglutâmico é indicada pela absorção na banda $1656,43\text{ cm}^{-1}$, referente a amida I, banda de estiramento C=O no comprimento de $1745,783\text{ cm}^{-1}$, banda de estiramento referente a C-N em $1159,9\text{ cm}^{-1}$ e banda de estiramento em $3438,14\text{ cm}^{-1}$, referente a hidroxila.

Figura 16 - Espectro infravermelho do natto N₁ após secagem em estufa



Grupamentos peptídicos podem ser identificados através da análise de espectroscopia de infravermelho. A fração de ligações peptídicas pode ter sua conformação estrutural estimada através da análise da banda amida I (1.600-1.700 cm⁻¹) (CARBONARO; NUCARA, 2010).

As absorções no comprimento médio do infravermelho para a amida permitem identificar estruturas secundárias (CARBONARO; NUCARA, 2010). O ácido γ -poliglutâmico pode aparecer em cinco diferentes conformações, que dependem de condições ambientais em que o biopolímero se encontra (HO et al., 2006).

De acordo com a identificação de estruturas secundárias em amidas, absorções na faixa de 1648–1660 cm⁻¹ são características da conformação estrutural no formato de α -helicoidal (KREJTSCHI; HAUSER, 2011). Previamente ao processo de extração, o γ -PGA presente no natto N₁ apresentou em seu espectro estiramento na banda 1656,431 cm⁻¹, indicando, portanto, que sua conformação estrutural é α -helicoidal.

Essa conformação ocorre em pH ácido, para moléculas de γ -PGA pouco ou não ionizadas. A ionização dos grupos laterais do ácido γ -poliglutâmico é passível de identificação através da análise de infravermelho (KREJTSCHI; HAUSER, 2011).

Para o ácido γ -poliglutâmico, após a metodologia de extração utilizando metanol, foi possível identificar a banda característica da ionização lateral dos grupos carboxílicos COO⁻, através do espectro na banda 1592,546 cm⁻¹, enquanto para o natto N₁, o γ -PGA antes da

extração não apresenta o pico característico da ionização do grupo carboxílico, e sim na sua forma deuturada, identificada no pico 1745,783 cm^{-1} .

A ionização dos grupos laterais é responsável por influenciar a conformação estrutural do ácido γ -poliglutâmico, e está diretamente ligada aos valores de pH do meio e temperatura (KREJTSCHI; HAUSER, 2011).

O aquecimento de amostras de ácido γ -poliglutâmico induz a diminuição da intensidade da banda de absorção de 1638 cm^{-1} para 1650 cm^{-1} , referente ao grupamento amida I. O aumento nos valores de absorção nessa faixa é indicativo do momento de alteração da conformação estrutural da molécula de γ -PGA, de α -helicoidal para estrutura de cadeia randômica (KREJTSCHI; HAUSER, 2011).

No FTIR do natto N_1 (Figura 16), observou-se o pico característico das ligações amida I no comprimento de 1656,431 cm^{-1} , enquanto no γ -PGA após extração do N_1 utilizando metanol, o grupamento amida I foi identificado na banda de 1633,731 cm^{-1} (Figura 15). Esses valores de absorção referente à amida I, juntamente aos valores indicativos da ionização dos grupos laterais carboxílicos, permitem inferir que a conformação estrutural do γ -PGA sofre alteração após o processo de extração do natto N_1 utilizando metanol (Tabela 15).

Tabela 15 - Conformação estrutural do γ -PGA antes e após extração do natto N_1 de acordo com os valores de absorção no espectro infravermelho

Ácido γ-poliglutâmico	Amida I	Grupamento carboxílico	Conformação estrutural
Antes da extração N_1	1656,431 cm^{-1}	1745,783 cm^{-1} (COOH)	α -helicoidal
Após extração N_1	1633,731 cm^{-1}	1592,546 cm^{-1} (COO ⁻)	cadeia randômica

7.2 PG α 21Ca

7.2.1 Propriedade orgânica do PG α 21Ca

No MSDS do PG α 21Ca, a formulação contém sulfato de cálcio de 70 a 80% e carbonato de cálcio de 10 a 20%, com ácido γ -poliglutâmico <10%, carbonato de sódio <10%, sulfato de alumínio <10% e outros componentes <10%. Entretanto, mediante a caracterização físico-química do PG α 21Ca tem-se que o produto comercial apresenta formulação original de 87% de sulfato de cálcio e 5% de ácido γ -poliglutâmico, entre outros.

Segundo o fabricante, na formulação do PG α 21Ca encontram-se constituintes inorgânicos, com a função de neutralizar cargas negativas e desestabilizar forças de repulsão entre as partículas, atuando como coagulante. Já o constituinte orgânico, como o ácido γ -poliglutâmico, forma ponte entre os coloides, viabilizando a formação de flocos (Nippon PG α 21Ca Co, 2015).

De acordo com Campos et al (2016), a análise de fluorescência de raios X em percentual de massa, a composição dos óxidos identificados no PG α 21Ca é igual à: 6,63% SiO₂, 2,97% Al₂O₃, 47,33% SO₃, 0,49% MgO, 40,41% CaO, 0,09% Na₂O, 0,13% K₂O, 0,99% Cl₂O, 0,71 Fe₂O₃, 0,05% TiO₂.

Os resultados da análise elementar do PG α 21Ca, realizados por Campos et al (2016), apontam teores de CHN na composição do produto japonês e para efeito comparativo, tem-se o apontamento do teor CHN para o γ -PGA sódico, adquirido da Shandong Freda Biotechnology (Tabela 16).

De acordo com Ho et al. (2006), tem-se como análise elementar típica do ácido γ -poliglutâmico 44,86% (C), 5,91% (H) e 10,49% (N), que mostraram conformidade com a composição formular calculada em 46,51% (C), 5,43% (H) e 10,85% (N). Com estes resultados pôde-se estimar o teor de ácido γ -poliglutâmico no PG α 21Ca, considerando que o ácido γ -poliglutâmico apresenta formula (C₅H₇NO₃)_n e somente com base no monômero tem-se 46,51% (C), 5,46% (H) e 10,84% (N) 37,17% (O). Os teores dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio no PG α 21Ca não apresenta conformidade com os teores para os mesmos elementos apresentado pela molécula de γ -PGA do padrão utilizado nesse estudo e do γ -PGA nos estudos conduzidos por Ho et al. (2006).

Consideração os teores de C, H e N esperados para a molécula de γ -PGA, partindo do pressuposto que o carbono se encontra somente no γ -PGA, que o hidrogênio pode estar presente

em outros sais ou como água de hidratação, verificou-se que para o nitrogênio, seu teor foi inexpressivo. Neste caso, considerando o teor de carbono no γ -PGA tem-se 5,26% no produto comercial. No estudo de Deng et al. (2007) foi realizada a caracterização de copolímero composto de três blocos biodegradáveis (PGL-PLA-PGL) com polilactida (PLA) como bloco central hidrofóbico e ácido γ -poliglutâmico (PGL) como blocos laterais da molécula, que resultou em proporção de N/C igual a 0,0192, valor próximo ao encontrado no PG α 21Ca. O ácido γ -poliglutâmico na forma de copolímero poderia ser uma possível justificativa para o comportamento anômalo da proporção N/C encontrada no PG α 21Ca.

Porém, na análise elementar é possível detectar a presença tanto do carbono orgânico, quanto o inorgânico (SATO, 2013). De acordo com a composição divulgada pela MSDS, o PG α 21Ca, além de fração orgânica, possui carbono na forma inorgânica nas seguintes substâncias: carbonato de cálcio de 10 a 20% e carbonato de sódio <10%, ou seja, considerando que a fração inorgânica de carbono é também detectada, a análise elementar e a proporção de C/N não faz referência apenas a presença do ácido γ -poliglutâmico, mas também ao carbono inorgânico presente no PG α 21Ca, considera-se que a análise elementar se torna inconclusiva quanto ao teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio referente à molécula de γ -PGA presente no produto japonês.

Tabela 16 - Análise elementar PG α 21Ca e γ -PGA sódico Shandong Freda
Biotechnology

Produto	C/%	H/%	N/%	CHN Total	C/N
PG α 21Ca	2,45	2,53	0,04	5,02	61,25
γ -PGA Na ⁺ Shandong	30,52	5,94	7,02	43,48	4,35

7.2.2 Análise por espectroscopia no infravermelho para o PG α 21Ca *in natura*

A técnica FT-IR foi utilizada para identificar, por meio das bandas características, os grupamentos químicos típicos do γ -PGA no PG α 21Ca. Os espectros de infravermelho foram obtidos de compostos pastilhados, em brometo de potássio com grau espectroscópico, na faixa de 4000 – 400 cm⁻¹ para observação dos grupos funcionais (Figura 17).

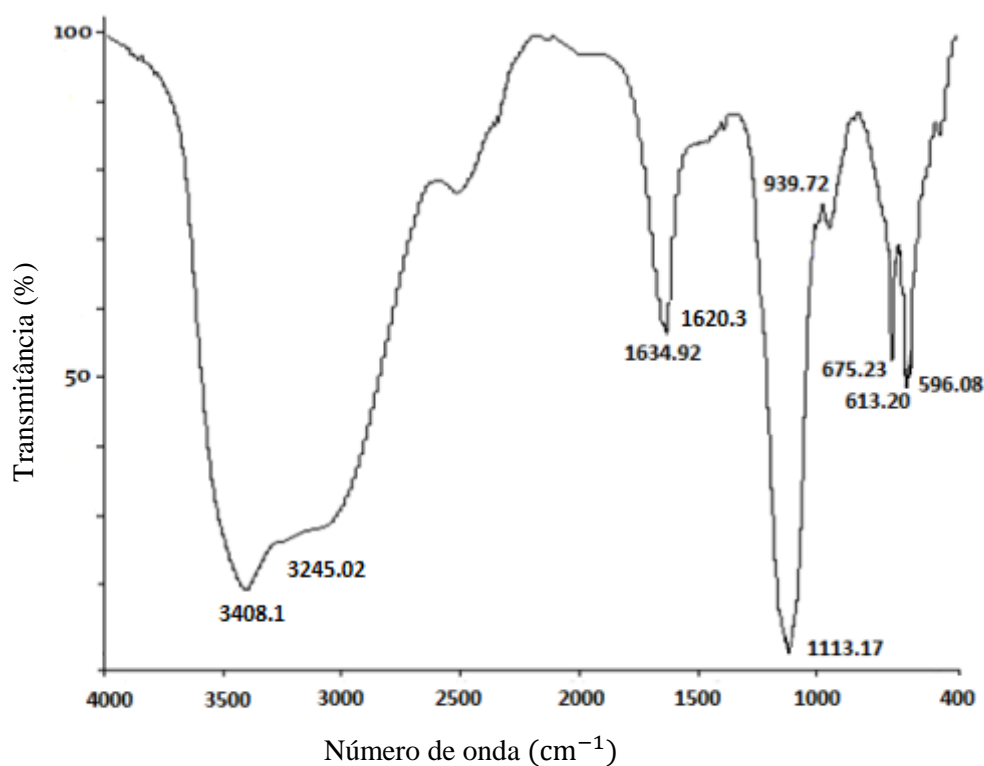
De acordo com a análise do PG α 21Ca por espectroscopia no infravermelho mostrado na Figura 17, observa-se vibrações características dos grupos hidroxila com comprimento de onda de em 3400 cm⁻¹, também são apresentadas vibrações na faixa dos 900 cm⁻¹ correspondentes ao grupo Al-OH₂. Entre as bandas características de sulfato de alumínio,

destacam-se a ν_1 em torno de 990 cm^{-1} , ν_3 em torno de 1113 e 1089 cm^{-1} e ν_4 em torno de 620 e 553 cm^{-1} (KLOPROGGE et al., 2001).

Para alguns espectros de infravermelho da gipsita, o posicionamento das bandas 3392 e 3495 cm^{-1} podem ocorrer próximo a 3400 e 3540 cm^{-1} (SOARES, 2005). Um dos quatro modos vibracionais do SO_4^{2-} foi observado no espectro da amostra de $\text{PG}\alpha 21\text{Ca}$, na banda de estiramento do $\nu_3\text{SO}_4$, que ocorre por volta de 1120 cm^{-1} para a gipsita (MANDAL, 2002). Na gipsita aparecem duas bandas a 1685 e 1620 cm^{-1} , que são devidos à presença de dois tipos de moléculas de água. A banda a 1685 cm^{-1} é característica de moléculas com ligações fracas, já a banda de 1620 cm^{-1} é característica das moléculas com ligações fortes (MANDAL, 2002). No espectro do $\text{PG}\alpha 21\text{Ca}$ observou-se bandas características da gipsita em 3400 cm^{-1} . A gipsita também apresenta três bandas de absorção na região de estiramento do grupo OH (ν_{OH}), estando posicionadas a 3245 , 3392 e 3495 cm^{-1} (SORARES, 2005).

Na análise por espectroscopia no infravermelho também observou-se vibrações características para γ -PGA com comprimento de onda de em 1620 , 1113 e 675 cm^{-1} . Para Ho et al. (2006) os resultados de absorção por infravermelho do ácido γ -poliglutâmico cálcico em pastilhas de KBr são: Amida I, com dobramento N-H na banda 1622 cm^{-1} ; para as ligações Amida II, as bandas não foram observadas, possivelmente devido às fortes ligações de complexação iônicas presentes; estiramento simétrico na banda 1412 cm^{-1} característico da dupla ligação C=O, estiramento C-N na banda 1116 cm^{-1} ; dobramento N-H na banda 669 cm^{-1} , e estiramento O-H na banda 3415 cm^{-1} .

Figura 17 - Espectro Infravermelho do P α 21Ca *in natura* nas faixas de absorção de 400 a 4000 cm^{-1}



Fonte: Campos et al (2016)

7.2.3 Extração do ácido γ -poliglutâmico do P α 21Ca pela ação do álcool etílico

Ao adicionar o álcool etílico aquecido não foi observada a formação da rede, característica do processo de precipitação do γ -PGA. Nesse caso, ocorreu a solubilização do ácido γ -poliglutâmico e precipitação dos sais. A presença do ácido foi confirmada através da análise em espectrofotômetro, pela curva de calibração. Após a secagem e ressolubilização do biopolímero, a solução foi analisada e constatada a presença do γ -PGA na concentração de 5 mg L^{-1} .

A análise por fluorescência de raios X indicou baixa concentração em porcentagem de cálcio (3,92%) e ausência de outros materiais inorgânicos na solução do γ -PGA extraído do P α 21Ca, conferindo bons resultados referentes à separação da parte orgânica, constituída pelo ácido γ -poliglutâmico, da parte inorgânica do produto.

Alguns solventes, como água e etanol, podem se comportar tanto como doadores de prótons, quanto como receptores de próton, sendo conhecidos como anfóteros, e suas ligações de hidrogênio são fortemente influenciadas pela temperatura da reação (REICHARDT, 2004).

A molécula de etanol apresenta uma parte polar, formada pela hidroxila, que é capaz de realizar a solubilização de compostos orgânicos, como o γ -PGA. Em baixas temperaturas solventes orgânicos são muito úteis na precipitação de biomoléculas, elevando-se a temperatura, ocorre rompimento das pontes de hidrogênio, conseqüente solubilização do ácido.

7.2.4 Viscosidade da solução do ácido γ -poliglutâmico extraído do PG α 21Ca

A concentração da solução em que foi utilizado o γ -PGA extraído do PG α 21Ca foi quantificada por espectrofotometria e o valor encontrado para solução de 100 mL foi de 5 mg L⁻¹. Sem qualquer alteração, realizou-se a leitura de viscosidade, exatamente nas mesmas condições da leitura realizada no ácido γ -poliglutâmico extraído do natto. O valor apresentado pela Tabela 17 foi consideravelmente maior do que o γ -PGA do natto, principalmente por considerar que a concentração no PG α 21Ca foi menor no γ -PGA extraído do natto nesse estudo, onde a maior viscosidade em solução encontrada para o γ -PGA foi a pH básico, na concentração de 1 g L⁻¹, no valor de 43,5 mPa.s (Figura 14).

Tabela 17 - Valor de viscosidade para o ácido γ -poliglutâmico extraído do PG α 21Ca

Concentração (mg L ⁻¹)	Viscosidade (mPa.s)
5	382,4

A alta viscosidade pode ser explicada por possível mudança da estrutura molecular do ácido γ -poliglutâmico, provavelmente uma conformação de folha pregueada, devido a possível agregação de cadeias, que mesmo em baixas concentrações, confere maior viscosidade (KREJTSCHI; HAUSER, 2011).

De acordo com a análise de espectroscopia de infravermelho para o PG α 21Ca (Figura 17), a banda característica da amida I foi detectada no comprimento de onda igual a 1620,3 cm⁻¹. Na análise de grupamentos secundários de amida, nesse comprimento de onda, os valores de amida I são associados à conformação estrutural β -sheet (folha pregueada) (CARBONARO; NUCARA, 2010)

Considerando que o comportamento viscosimétrico não condiz com o esperado pelo γ -PGA, e o teor de N/C relaciona-se com produtos copolimerizados, não se descarta a hipótese de que a viscosidade apresentada para o γ -PGA em solução ser o resultado da presença de outros polímeros, ou mesmo que o γ -PGA tenha sido submetido à processo de copolimerização e exista a presença de outros polímeros compondo a macromolécula responsável pela alta eficiência no tratamento de água apresentada pelo PG α 21Ca.

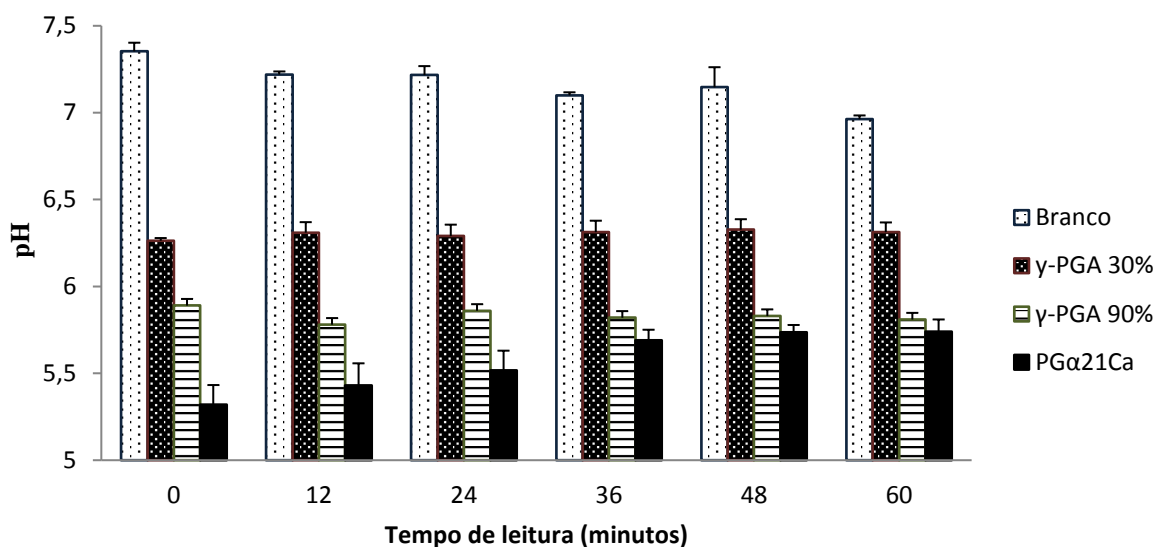
Contudo, constatada a possibilidade de que através do uso de reagentes indutores de ligações cruzadas ou uso de radiação gama é possível sintetizar hidrogéis de γ -PGA, e que essa conformação da macromolécula confere maior atividade floculante. Considera-se que o alto valor de viscosidade encontrado no ácido γ -poliglutâmico extraído do PG α 21Ca seja em decorrência do γ -PGA comercializado pela Nippon Poly-Glu se encontrar na forma de hidrogel desidratado.

Na forma de hidrogel, devido ao aprisionamento de moléculas de água no seio da estrutura molecular do biopolímero, soluções que contenham o hidrogel de γ -PGA irão oferecer maior resistência ao escoamento e, conseqüentemente, maiores valores de viscosidade serão encontrados.

7.2.5 Curva de pH

Durante o ensaio, observou-se que, inicialmente, o produto da Nippon Poly-GLu o PG α 21Ca e os produtos da Shandong Freda Biotechnology com teor de γ -PGA $\geq 30\%$ e teor γ -PGA $\geq 90\%$, consumiram alcalinidade do meio (Figura 18). O PG α 21Ca, comparado a leitura inicial, apresentou leve alta nos valores de pH. Tal fato pode se justificar pela presença dos íons carbonato liberados no meio pelas moléculas de CaCO_3 presentes no produto como fator responsável por manter a baixa variação de pH durante o tratamento ao qual se destina o produto em estudo. De acordo com VON SPERLING (2005), as faixas de alcalinidade próximas a neutralidade devem-se a concentração de bicarbonatos, que após a reação de coagulação e floculação inicial, que consomem pH do meio devido a presença de AlSO_3 , libera os íons carbonato, que são os responsáveis pela alta no valor de pH.

Figura 18 - Variação do pH em função do tempo nas amostras de γ -PGA 91,61%, γ -PGA 30% e PG α 21Ca



O γ -PGA é altamente solúvel e sequestrante de moléculas de água (CANDELA; FOUET, 2006). O polímero ionizado, como é o caso do γ -PGA Shandong Freda Biotechnology que se encontra na forma sódica (Na^+), apresenta-se na forma desordenada de novelo randômico (SHIH; VAN, 2001). O grupo carboxílico aniônico em cada uma das porções de ácido γ -poliglutâmico é reativo e disponível para as ligações catiônicas, sendo responsável pela leve acidificação do meio (HO et al., 2006).

A queda no valor do pH gerada pelo produto adquirido pela Shandong Freda Biotechnology, representou acidificação da amostra que se manteve durante o tempo do ensaio, sendo constante nas amostras do produto com pureza de 91,61%. Diferindo nos resultados do PG α 21Ca, que mesmo consumindo mais a alcalinidade do meio no início da análise, apresentou tendência ao aumento de pH, devido a presença do carbonato de cálcio.

Os valores referentes ao desvio padrão demonstram a variação em relação à média dos ensaios que foram realizados em triplicata. Nessa dispersão apresentada na Figura 18, a baixa variação do desvio padrão, indicou a tendência dos dados de estarem próximos a média, validando os resultados.

7.3 Atividade flocculante

7.3.1 Atividade flocculante variando concentração de ácido γ -poliglutâmico

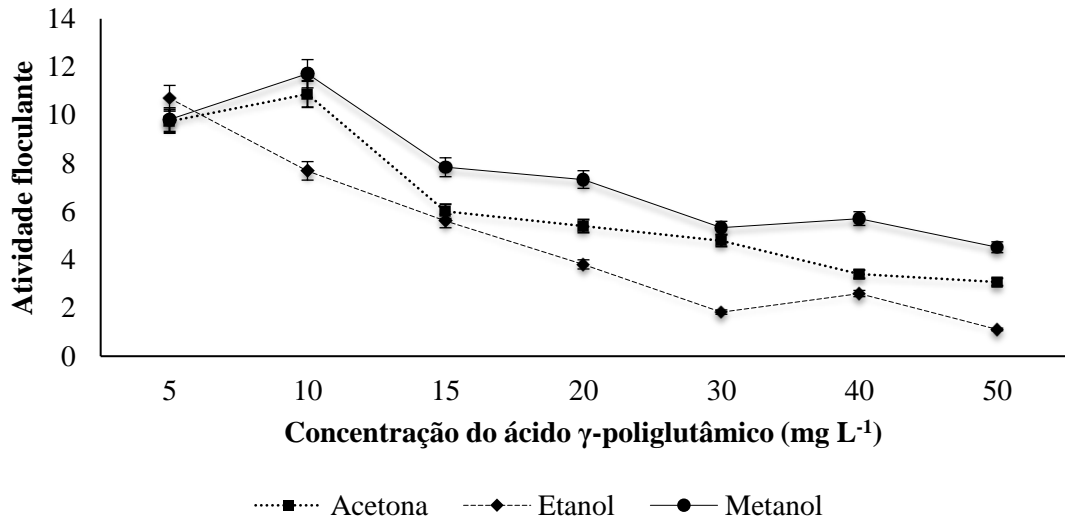
Primeiramente, buscou-se determinar a concentração de ácido γ -poliglutâmico que apresentasse maior eficiência no processo de floculação, através da melhor atividade flocculante, para em seguida adequar os demais parâmetros potenciais de floculação. Realizou-se extração simples com os três solventes utilizados nesse estudo para verificar a potencialidade de única extração na atividade flocculante e comparando-se dois resultados.

O comportamento apresentado pelo γ -PGA extraído da acetona, etanol e metanol, foi similar, como representado pela Figura 19. 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 flocculante. Seguindo a linha que o ácido γ -poliglutâmico extraído com metanol, como agente de precipitação, apresentou maior viscosidade, e que esse parâmetro está diretamente ligado a massa molecular do biopolímero, entende-se que esse fator influi diretamente no processo de floculação.

Maior massa molecular do γ -PGA, no processo floculação, responde por efetividade de maior significância no processo de sedimentação dos flocos formados que pela ação da gravidade, maiores massas de flocos irão sedimentar com maior velocidade. Flocculantes que apresentem grande peso molecular, de forma generalizada, possuem cadeia de comprimento longo com maior número de grupos funcionais livres, que podem realizar maior quantidade de formação de pontes com as partículas suspensas, gerando flocos maiores no processo de floculação (SHIH et al., 2001).

A solução de ácido γ -poliglutâmico com uma única extração pelo álcool etílico e acetona apresentou coloração amarronzada, diferindo da solução de ácido γ -poliglutâmico extraído com metanol, que não apresentava coloração, indicando maior pureza e, conseqüente, eficiência pelo metanol.

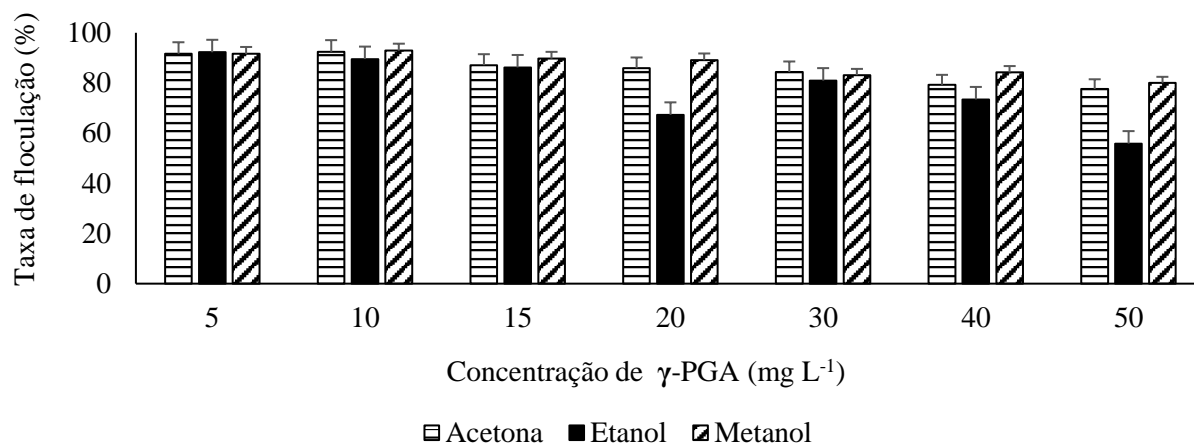
Figura 19 - Comportamento apresentado pela variação de solventes no processo de extração de ácido γ -poliglutâmico destinado ao processo de floculação



Como representado pelas Figuras 19 e 20, a concentração ótima na atividade flocculante foi de 10 mg L⁻¹, apresentando queda nos valores seguintes. Esse comportamento, representado pela taxa de floculação, foi similar para os três solventes utilizados. Os resultados encontrados com relação a concentração ótima de floculação do ácido γ -poliglutâmico foram semelhantes aos do trabalho de Bhunia et al. (2012), onde a concentração que apresentou maior eficiência foi a de 10 mg L⁻¹ para os três solventes. No trabalho de Wu; Ye (2007) teve resultado semelhante, apresentando queda na atividade flocculante a partir da concentração de 40 mg L⁻¹.

O decréscimo nos valores de atividade flocculante 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 da camada do polímero, 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)

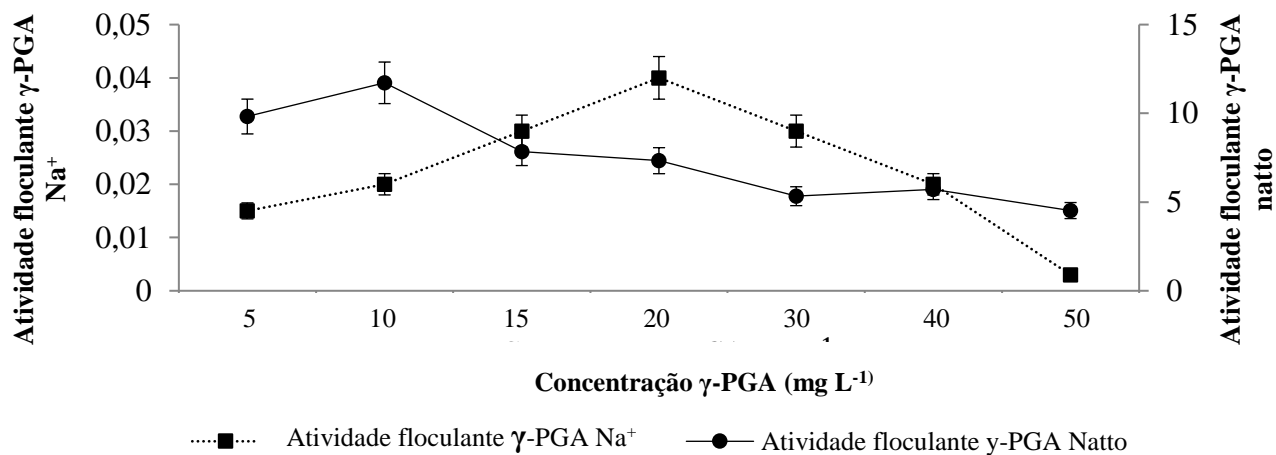
Figura 20 – Taxa de floculação em porcentagem para diferentes concentrações de γ -PGA para diferentes solventes de extração



No comparativo do ácido γ -poliglutâmico extraído do natto N₁ e o ácido γ -poliglutâmico na forma sódica adquirido da Shandong Freda Biotechnology, não foi observada atividade floculante pelo produto comercial. Os valores encontrados foram todos abaixo de zero, e atribuídos apenas a sedimentação natural do caulim. O procedimento executado foi o mesmo para o ácido γ -poliglutâmico do natto, que apresentou boa atividade floculante (Figura 21).

O γ -PGA é um biopolímero aniônico, ou seja, é uma molécula que disponibiliza cargas negativas, capazes de se ligar à íons e metais carregados positivamente. No caso do produto adquirido da Shandong Freda Biotechnology, o ácido γ -poliglutâmico é um sal de sódio comercializado para confecção de cosméticos, ou seja, as ligações aniônicas capazes de formar pontes responsáveis pela floculação estão ligadas às moléculas de Na⁺. Na metodologia de atividade floculante, foi utilizada a solução com CaCl₂, 4,5 mM, sendo que a liberação de íons Ca²⁺ responde pela neutralização dos coloides presentes na solução de caulim 5 g L⁻¹ para em sequência à macromolécula de γ -PGA realizar o processo de floculação. O sal de sódio do ácido γ -poliglutâmico encontra-se numa conformação de cadeia que permite ampla solubilidade em água (HO et al., 2006). Mesmo apresentando boa solubilização em solução, não ocorreu a formação de flocos.

Figura 21 - Atividade flocculante ácido γ -poliglutâmico na forma sódica Shandong Freda Biotechnology



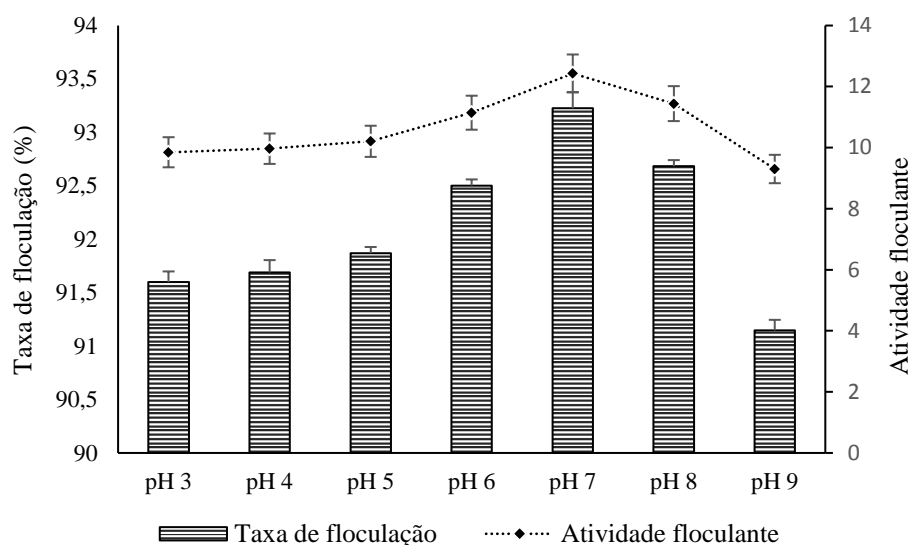
7.3.2 Atividade flocculante em diferentes faixas de pH

Para diferentes faixas de pH o ácido γ -poliglutâmico apresentou 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 22, melhor atividade flocculante próximo à neutralidade da solução (HO et al., 2006)

Figura 22 - Influência de diferentes faixas de pH na atividade flocculante 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 flocculante 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 coloides, e consequentemente no processo de floculação (PAVANELLI, 2001)

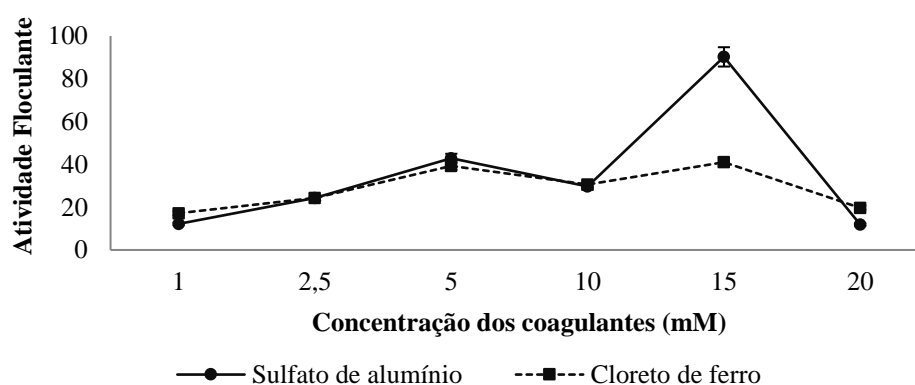
7.3.3 Atividade flocculante variando coagulante

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 sequência, 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 coloides, 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 flocculante 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 22, 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 23.

Figura 23 - 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} .

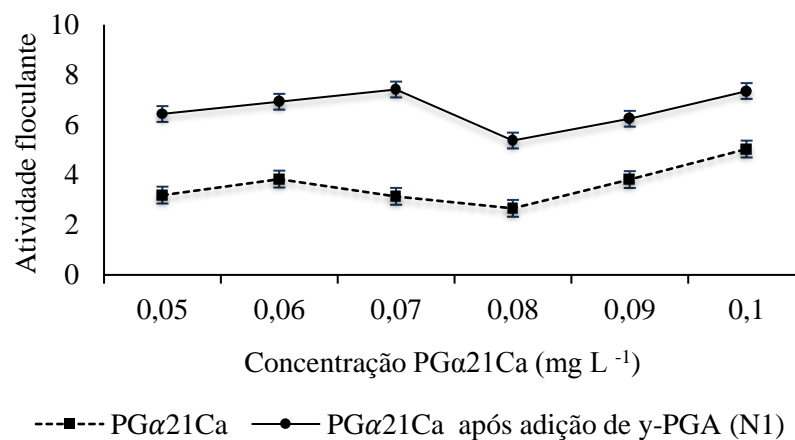
7.3.4 Atividade floculante do PG α 21Ca

Devido a alta concentração de material inorgânico, para análise de floculação em escala laboratorial, o PG α 21Ca não se mostrou com ampla eficiência quando comparado à combinação de apenas o ácido γ -poliglutâmico e sulfato de alumínio. O princípio do produto é baseado na neutralização das cargas coloidais presentes na água e conseguinte formação de flocos pelas pontes geradas através do biofloculante, ácido γ -poliglutâmico. Os demais produtos presentes atuam como material inerte, como o sulfato de cálcio, adotado para transporte das pequenas

quantidades de sulfato de alumínio e ácido γ -poliglutâmico, enquanto o carbonato de cálcio atua na estabilização do pH, altamente consumido devido a presença do sulfato de alumínio.

A geração de flocos é instantânea, como apresentado pela atividade flocculante desenvolvida nesse estudo utilizando o sulfato de alumínio e ácido γ -poliglutâmico, apenas. Contudo, mesmo apresentando ótima remoção de turbidez da água, parte dos flocos sofre flotação pela ação do carbonato de cálcio, sendo que este material é disponibilizado na superfície do tubo utilizado nos ensaios, o que interfere nos resultados.

Figura 24 - Atividade flocculante PG α 21Ca



O acréscimo do ácido γ -poliglutâmico extraído do natto na concentração de 10 mg L⁻¹ na reação do PG α 21Ca com a solução de caulim, incrementou a atividade flocculante do processo (Figura 24). Os flocos gerados apresentaram maior estabilidade e melhor sedimentação, indicando que maior quantidade do biopolímero seja responsável por maior eficiência do produto.

8 CONCLUSÕES

A metodologia de extração para o γ -PGA de maior eficiência foi através do uso de metanol refrigerado, como agente de precipitação, onde em apenas uma extração obteve-se o biopolímero com atividade floculante, quando comparado à extração com o álcool etílico e acetona. A precipitação lenta, sob refrigeração, torna-se conduta que favorece a extração de ácido γ -poliglutâmico.

As análises secundárias do grupamento amida I indicaram conformação estrutural α -helicoidal para o γ -PGA presente no natto antes do processo de extração e conformação estrutural de cadeia aberta para o γ -PGA após a extração.

A viscosidade e o pH mostraram-se, intrinsecamente, relacionados e diretamente proporcionais, validados pela conformação estrutural e pela ionização dos grupos carboxílicos, presentes na macromolécula. Confirmados pela conformação randômica, apresentada pela análise de grupamentos secundários da amida I na análise de espectroscopia de infravermelho.

Quanto ao método de extração de γ -PGA do P α 21Ca a extração por álcool etílico apresentou-se eficiente na separação do ácido γ -poliglutâmico, sendo observado apenas pequeno residual de cálcio. A viscosidade foi elevada para a concentração do biopolímero em solução, assim como, a análise elementar apresentou baixo teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio, não esperado para a fórmula molecular do γ -PGA, chamando atenção para baixa concentração de nitrogênio.

Foram identificados por espectroscopia de infravermelho os grupos funcionais característicos da molécula de γ -PGA no produto comercial, na análise de grupamentos secundários de amida, nesse comprimento de onda, os valores de amida I são associados à conformação estrutural β -sheet, considerando que a Nippon Poly-Glu Co. trabalha com a produção do γ -PGA na forma de hidrogel desidratado, conclui-se, por intermédio do resultado apresentado na análise de infravermelho, que a alta viscosidade para baixas concentrações do biopolímero presente no produto se deve à presença de ligações cruzadas nas moléculas do ácido γ -poliglutâmico.

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 P α 21Ca, a atividade floculante foi estimulada pela adição do ácido γ -poliglutâmico à solução coloidal, demonstrando maior estabilidade dos flocos formados.

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.

REFERÊNCIAS

- AKCELRUD, L. **Fundamento da ciência dos polímeros**. Barueri: Manole Ltda, 2007. 291 p.
- ASTM D6400-04**, Standard Specification for Compostable Plastics, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2004.
- ARPAL, J. A. A. **Compuestos estequimétricos del ácido poli(γ -glutâmico) com tensoativos catiónicos**. 2004. 183f. Dissertação (Mestrado) – Escola técnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona (UPC). Barcelona. 2004.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 15448-1**. Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis. Parte 1: Terminologia. 2008. 2 p.
- ASHIUCHI, M. Analytical approaches to poly- γ -glutamate: Quantification, molecular size determination, and stereochemistry investigation. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 879, n. 29, p.3096-3101, nov. 2011.
- ASHIUCHI, M; MISONO, H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 9-14, 2002.
- BAJAJ, I; SINGHAL, R. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. **Bioresource Technology**, v.102, n.10, p.5551–5561, may 2011.
- BAUER, W; WESTFALL, G. D; DIAS, H. **University physics with modern physics**, 1ed, The McGraw-Hill Companies inc., New York, NY, 347p. 2010.
- BAYSAL, Z.; UYAR, F. AND AYTEKIN, C. Solid-state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot spring water. **Process Biochemistry**, n. 38, p.1665-1668. 2003.
- BEDIENT, P. B; RIFAI, H. S.; NEWELL, C. J. **Ground water contamination: transport and remediation**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 604 p.
- 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.
- BRADSHAW, I. J.; NISBET, B. A.; KERR M. H.; SUTHERLAND, I. W. Modified xanthan: its preparation and viscosity. **Carbohydrate Polymers, Barking**, v.3, n.1, p.23- 38, 1983.
- BRITO JÚNIOR, C. A. R. et al. Poliacrilonitrila: processos de fiação empregados na indústria. **Polímeros**, vol. 23, n. 6, p. 764-770, 2013
- BRITO, P. N. **Produção de ácido gama-poliglutâmico: estudo e otimização do processo utilizando resíduos agroindustriais**. 2014. 50 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas. 2014.

BROCK, J. et al. Determinação experimental da viscosidade e condutividade térmica de óleos vegetais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.28, n.3, p. 564-570, set 2008.

BUESCHER, J. M.; MARGARITIS, A. Microbial biosynthesis of polyglutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.27, n.1, p.1-19, 2007.

CAMPOS, V. et al. Physicochemical characterization and evaluation of PGA bioflocculant in coagulation-flocculation and sedimentation processes. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.3753-3760, dez. 2016.

CANEVAROLO JÚNIOR, S. **Ciência dos polímeros**. 3. ed. São Carlos: Artliber, 2006. 280 p.

CANDELA, T; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v.60, n.5, p.1091-1098, 2006.

CAO, M. et al. Glutamic acid independent production of poly-c-glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of pgsBCA genes. **Bioresource Technology**, v.102, n.5, p.4251–4257, 2011.

CAPELETTE, B. C. **Emprego da quitosana como coagulante no tratamento de água contendo *Microcystis aeruginosa* – Avaliação de eficiência e formação de trihalometanos**. 2011. 127f. Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

ÇENGEI Y, A.; CIMBALA, J, M. **Mecânica dos fluidos: Fundamentos e aplicações**. 3. ed. São Paulo: Amgh Editora Ltda, 2015. 995 p.

CHAPMAN, D; LADBROOKE, B. D. Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes a review and summary of some recent studies. **Chem. Phys. Lipids**, v.3, n.3, p.304-367, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1969.

CHEN, X. et al. High yield of poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology**, v.96, n.17, p.1872-1879, 2005a.

CHEN, X. et al. Medium optimization by response surface methodology for poly- γ - glutamic acid production using dairy manure as the basis of a solid substrate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.69, n.4, p.390–396, 2005b.

COHN, E. J. et al. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids 1a,b,c,d. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 68, n. 3, p.459-475, mar. 1946.

Companhia Nacional de Abastecimento. Conab. 2013/2014. **Acompanhamento da safra de grão brasileiros**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_10_16_06_56_boletim_portugues_dezembro_2013.pdf. Acesso em 17 de mar 2015.

Companhia Nacional de Abastecimento - Conab. **Safra de grãos será de 210,5 milhões de toneladas.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/imprensa-noticia.php?id=39249>. Acesso em: 13/02/2016

COOPER S. L., VISSER S. A., HERGENROTHER R. W. *et al.*, 2004, “Polymers” In: Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J.E. (eds), **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine.** 2ª edição, Seção 2.2, San Diego, Elsevier.

DANTAS, A. B; DI BERNARDO, L. **Métodos e técnicas de tratamento de água.** v.2. 2. ed. São Carlos: RiMa. 792 p. 2005.

DE CESARO, A. **Uso de carreadores de oxigênio na produção de ácido- γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53 e caracterização do biopolímero.** 2013. 85f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

DENG, C. *et al.* RGD Peptide Grafted Biodegradable Amphiphilic Triblock Copolymer Poly(glutamic acid)-*b*-Poly(L-lactide)-*b*Poly(glutamic acid): Synthesis and Self-Assembly. **Journal Of Polymer Science**, v. 45, n. 15, p.3219-3230, nov. 2007.

DO, J. H. *et al.* Efficient Recovery of *g*-Poly (Glutamic Acid) From Highly Viscous Culture Broth. **Biotechnology and bioengineering**, v.76, n.3, p.219–223. 2001.

DUARTE, C. M. G. **Caracterização Químico-Física de Novos Polímeros Estabilizantes para Formulações da Indústria de Cosméticos.** 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

FELTRE, R. **Química.** 6. ed. São Paulo: Moderna, 2004. 432 p.

FERREIRA, E. J. B., **Avaliação dos Processos de Sedimentação e Flotação no Tratamento de Águas do Mar.** 2013. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2003.

FILHO, F. S., **Tecnologia de tratamento de água para a indústria.** 3 ed. São Paulo: Nobel, 1989.

FURLAN, F. R., **Avaliação da Eficiência do Processo de Coagulação, Floculação e Adsorção no Tratamento de Efluentes Têxteis.** 2008. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.

GARCÍA-OCHOA, F; GÓMEZ CASTRO, E.; SANTOS, V. E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 27, n. 9, p.680-690, nov 2000.

GEPEQ (Grupo De Pesquisa Em Educação Química – USP). LUIZ ROBERTO DE MORAES PITOMBO (Org.). **INTERAÇÕES E TRANSFORMAÇÕES.** 5. ed. São Paulo: Edusp, 2007. 136 p.

GIBSON, T.; GORDON, R. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, In: **Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology**, 8th ed., Buchanan, R. & Gibbons, N., (Ed.), pp. 529-550, The Williams & Wilkins Company, ISBN 0-683-01117-0, Baltimore, Md, 1974.

GOTO, A; KUNIOKA, M. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.56, n.7, p.1031-1035, 1992.

HAMBLIN, M. R. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.941-951, 1 jun. 2002. Oxford University Press

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.

HOWARD, P. H. **Handbook of Environmental Fate and Exposure Data For Organic Chemicals**. Chelsea: Lewis Publishers, Inc, 1990. 528 p.

IKEDA, T et al. Mode of inhibitory action of a bacteriocin produced by *Streptococcus mutans* C3603. **Infect. Immun.**, v. 44, n. 2, p.370-378, maio 1984.

Imep - Instituto Mato Grossense de Economia Agropecuária. Entendendo o mercado da soja. Disponível em: http://www.imea.com.br/upload/pdf/arquivos/2015_06_13_Paper_jornalistas_boletins_Soja_Versao_Final_AO.pdf. Acesso em 13 de jan. 2016.

IRURZUN, I; et al. MarkHouwink Parameters of Biosynthetic Poly(γ -glutamic acid) in Aqueous Solution. **Macromol. Chem. Phys**, v.202, n.17, p.3253-3256, 2001.

IVÁNOVICS, G; BRUCKNER, V. Chemische and immunologisdsche sudien über den mechanismus der milzbrandinfektion and imunitat; die chemische struktur der kapdelsubstanz de milzbrand *bacillus* und der serologisch identischen speziflschen substanz des *Bacillus mesenteriscus*. **Z. Immunitatsforsch**. V. 90, p.304-318, 1937.

HUNTER, R J. **Foundations of colloid science**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2001. 816 p.

HEZAYEN, F. F; REHM, B.H; TINDALL, B.J; STEINBUHEL, A; EBERHARDT, R. Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the Archaea from Egypt that produces extracellular poly (γ -glutamic acid). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1133-1142, 2001.

HOUGHTON, J; I; QUARMBY, J. Biopolymers in wastewater treatment. **Current Opinion In Biotechnology**, v.10, n.3, p.259-262, jun. 1999.

HUGGINGS, M. L; OKAMOTO, H. **Polymer fractionation**. Richmond laboratory. Academic press: California USA, 1967.

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.

KARP, G. **Biologia celular e moleculas**. Editora Manole, 2005. 786 p.

KATO, M. T. "pH". Curso Qualidade da Água, do Ar e do Solo. Escola de Engenharia Mauá. São Caetano do Sul/SP, 1983

KIMURA, K. et al. Characterization of *Bacillus subtilis* gamma-glutamyl transferase and its involvement in the degradation of capsule poly-gamma-glutamate. **Microbiology**, v.150, p.4115-4123, 2004.

KISSINGER, H. E. **Reaction Kinetics in Differential. Thermal Analysis Analytical Chemistry**. v.29, n.11, p.1702-1706, 1957.

MANDAL, K. P; MANDAL, T.K. Anion water in gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and hemihydrate ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$). **Cem. Concr. Res**, v. 32, n. 2, p.313-316, 2002.

NEIS, U; KLUTE, R.. Stability of colloidal kaolinite suspensions in the presence of soluble organic compounds. In: **Proceedings of the international conference, colloid interface science**,. 1976. p. 113.

KOLLMAN, P. A.; ALLEN, L. C. Theory of the hydrogen bond. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.283-303, jun. 1972. American Chemical Society (ACS).

KREJTSCHI, C; HAUSER, K. Stability and folding dynamics of polyglutamic acid. **Journal of European Biophysics**, v. 40, n.5, p. 673–685, 2011.

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.

KUNIOKA, M. Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly(amino acid)s. **Macromolecular Bioscience**, v.4, p.324–329, 2004.

KUNIOKA, M; GOTO, A. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.40, n.6, p.867-872, 1994.

LEFFLER J. E; GRUNWALD; E.: **Rates and Equilibria of Organic Reactions**, Wiley, New York, London, 1963.

FRIESEN W.T; LEVIN S. Flocculation of colloid particles by water soluble polymers. **Flocculation in biotechnology and separation system**. p. 3–20, 1987.

LIMA, E. R. A. **Cálculo de propriedades físico-químicas de sistemas coloidais via equação de poisson-boltzmann**. 2008. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

LU, Z. **Medicament of water treatment**. Publishing Company of Chemical Industry, Beijing, p. 100–102, 2002.

LUCAS, E.F; SOARES, B. G; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. E-papers, Rio de Janeiro, 365 p. 2001.

LUCAS, G.A.S. **Risco de base e demanda por derivativos agropecuários no Brasil**. 2009. 38f. Dissertação (Mestrado), Pontifícia Universidade Católica: Rio de Janeiro, RJ, 2009.

MAIA, A. M. S; COSTA M; GARCIA, R. B. **Caracterização do comportamento reológico de uma poliacrilamida hidrofobicamente modificada na presença de sais**. In: Congresso NACIONAL DE POLÍMEROS, 7, 2003. Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Associação Brasileira de Polímeros. 2003.

MACHADO, L. O. **Fatores de Formação do Preço da Soja em Goiás**. Goiás: Seplan-GO, 2010.

MEYLAN, W. M; HOWARD, P. H; BOETHLING, Robert S. Improved method for estimating water solubility from octanol/water partition coefficient. *Environmental Toxicology And Chemistry*. **Wiley-Blackwell.**, v. 15, n. 2, p.100-106, fev. 1996.

Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Culturas, soja. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/>. Acesso 13/01/2016.

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. 191-224, CRC Press, ISBN 978-1-4200-9495-4, Boca Raton, FL, 2010.

NETO, J. C. Q; BISCAIA, E. C; PETRI, D. F. S. Estudo sobre a adsorção do fluido de perfuração salgado contendo polímeros sobre SIO₂. **Quim. Nova**, v.30, n.4, p.909-915, 2007.

NITSCHKE, M; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p.772-776, 2002.

Nippon PGα21Ca Co. Ltd. Disponível em: http://www.PGα21Ca.com/eng/product_information/ca.pdf. Acesso em: 14 de janeiro de 2016.

NUNES, Alquiles Figueira. **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.

OH, S. M. et al. Characterization of γ -polyglutamic acid produced from the solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus* sp. **Food Science and Technology**, v.16, n.4, p.509-514, 2007.

OLIVEIRA, Cristiane; RUBIO, Jorge. **Mecanismos, técnicas e aplicações da agregação no tratamento mineral e ambiental**. Rio de Janeiro: Cetem/mct, 2011. 69 p.

OPPERMANN-SANIO, F.; STEINBÜCHEL, A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. **Naturwissenschaften**, v.89, n.1, p.11-22, 2002.

PARKER, A J. The effects of solvation on the properties of anions in dipolar aprotic solvents. **Chem. Soc.**, v. 16, p.163-187, jul. 1962.

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.

PEREIRA, L. C. R. T. **Estudos em macroalgas carragenófitas (Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa - aspectos ecológicos, bioquímicos e citológicos.** 2004. 325 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2004.

PIETRZAK, L. N.; MILLER, S. S. Microchemical Structure of Soybean Seeds Revealed in Situ by Ultraspatially Resolved Synchrotron Fourier Transformed Infrared Microspectroscopy. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 24, p.9304-9311, nov. 2005.

PISTOR, V. et al. Desvulcanização do resíduo de terpolímero de etileno-propileno-dieno (EPDM-R) por micro-ondas. **Polímeros**, v.20, n.3, p.165-169, 2010.

PRODANOVIC, D. et al. Kinetics of the dehydroxylation and mullitization processes of the halloysite from the FarbaniPotok locality, Serbia. **Applied Clay Science**. v.12, n.3, p.267-274, 1997.

RATNER, B. D., 2004, Surface properties and surface characterization of materials, In: Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J.E. (eds), **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine**. 2a edição, Seção 1.4, San Diego, Elsevier.

RAO, M. A. **Rheology of Fluid and Semisolid Foods: principles and applications.** New York: Ed. Aspen Publishers, 1999. p.433

REICHARDT, Christian. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry.** 3. ed. Marburg: Wiley-VCH, 2004. 646 p.

SANGSTER, J. **Octanol-water partition coefficients—fundamentals and physical chemistry.** New York: Wiley, 1997. 170 p.

SATO, Juliana Hiromi. **Métodos para determinação do carbono orgânico em solos do cerrado.** 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SALEHIZADEH H; VOSSOUGH, M; ALEMZADEH, I. Some investigations on biofloculant producing bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v.5, n.1, p.39-44, abr. 2000.

SAWAMURA, S. On the micro-organisms of natto. **Bulletin of the College of Agriculture**, Tokyo Imperial University, v.7, p.107-110, 1906.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** Tradução de Igenes Caraceli, Paulo Celso Isolani, Regina Helena de Almeida Santos. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.836

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.

SOARES, J. P. **Estudo microestrutural do gesso Alfa produzido pelo processo hidrotérmico de calcinação a seco e sua influência nas propriedades mecânicas após hidratação**. 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2005.

SOUSA, N. A. **Tratamento de água**. 1.ed. Natal : CEFET/RN, 2007. 149 p

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, Kidlington, v.11, n.6, p.663-674, 2001.

KOIZUMI, J. I., TAKEDA, M., MATSUOKA, H., HIKUMA, M. Factors affecting the activity of a protein bioflocculant produced by *Nocardia amarae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.74, n.6, p.408-409, 1992.

TANIGUCHI, M. et al. Proposals for wastewater treatment by applying flocculating activity of cross-linked poly- γ -glutamic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, n.3, p.245-251, 2005.

TANIGUCHI, M. et. al. Physicochemical properties of cross-linked poly- γ -glutamic acid and its flocculating activity against kaolin suspension. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, n.2, p.130-135, 2005.

TASHIMA, A. K. **Estudo da precipitação isoelétrica da insulina suína em soluções aquosas com o dióxido de carbono**. 2007. 218 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

UEDA, A. C. **Aplicação de Micelas Reversas na Remoção de Corantes Têxteis Catiônicos**. 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

U.S department of health & human services. International Chemical Safety Cards (ICSC). **Methanol**. 1994. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0057.html>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

U.S department of health & human services. International Chemical Safety Cards (ICSC). **Ethanol**, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0044.html>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

U.S department of health & human services. International Chemical Safety Cards (ICSC). **Acetone**, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0087.html>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

VILLETTI, M. A. **Propriedades estáticas e dinâmicas dos polímeros naturais xantana, hialuronato de sódio e metilcelulose por espalhamento de luz e raio-x a baixos**

ângulos. 2001. 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Volume 1: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias.** 3.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 2005. 452p.

WILMING, A. et al. Metabolic studies of γ -polyglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations. **Biochemical Engineering Journal.** v.73, p.29–37, 2013.

WU, Jane-yii; YE, Hsiu-feng. 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.

WU, Q; XU, H; SHI, N.N; YAO, J; LI, S; OUYANG, P. Improvement of poly(γ -glutamic acid) biosynthesis and redistribution of metabolic flux with the presence of different additives in *Bacillus subtilis* CGMCC 0833. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.79, n.6, p.527–535, 2008.

XU, J.; CHEN, S.; YU, Z. Optimization of process parameters for poly γ -glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048. **Process Biochemistry**, v.40, n.9, p.3075-3081, 2005.

YE, Y. et al. High impact strength epoxy nanocomposites with natural nanotubes. **Polymer**, v. 48, n. 21, p. 6426-6433, 2007.

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.

YOON, S. H; DO, J. H; LEE, S. Y; CHANG, H. N. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v.22, n.7, p. 585-588, 2000.

SUZUKI Y; WATANABE M; SASAKI K; NAKASHIMADA Y; NISHIO N. Flocculating property of extracellular polymeric substance derived from a marine photosynthetic bacterium, *Rhodovulum* sp.. **J Biosci Bioeng**; v.87, n. 5, p. 625–629, 1999.