



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 1101127-0 A2**



\* B R P I 1 1 0 1 1 2 7 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 24/03/2011  
(43) Data da Publicação: 11/06/2013  
(RPI 2214)

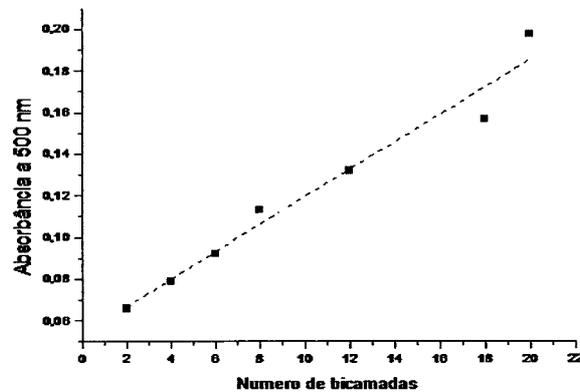
**(51) Int.Cl.:**  
B82B 1/00  
B82B 3/00  
C08B 37/00  
C02F 1/28  
C02F 1/62  
C02F 101/20  
C02F 103/16

**(54) Título:** FILME NANOESTRUTURADO CONTENDO POLISSACARÍDEO DE ORIGEM ALGAL IMOBILIZADO EM CONJUNTO COM POLIELETRÓLITO

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

**(72) Inventor(es):** CRISTINA SOUZA FREIRE NORDI, VALTECIR ZUCOLOTTO

**(57) Resumo:** FILME NANOESTRUTURADO CONTENDO POLISSACARÍDEO DE ORIGEM ALGAL IMOBILIZADO EM CONJUNTO COM POLIELETRÓLITO. A presente invenção refere-se à produção de um filme ultrafino híbrido, utilizando a técnica de automontagem contendo um polieletrólito catiônico e o polissacarídeo extracelular produzido pela microalga *Cryptomonas tetrapirenoïdosa*. O invento compreende também a utilização desse filme para remoção de metais pesados em soluções aquosas.



## **FILME NANOESTRUTURADO CONTENDO POLISSACARÍDEO DE ORIGEM ALGAL IMOBILIZADO EM CONJUNTO COM POLIELETRÓLITO**

### **CAMPO DE APLICAÇÃO**

A presente invenção refere-se à produção de um filme ultrafino híbrido nanoestruturado contendo um polissacarídeo extracelular produzido por microalgas de água doce. O produto tem a propriedade de adsorver íons metálicos de soluções aquosas, e uma das possíveis aplicações seria na remoção ou redução de metais poluentes de efluentes industriais.

### **ESTADO DA TÉCNICA**

A industrialização foi e continua sendo um marco da nossa civilização. Entretanto, vários resíduos lançados no meio ambiente tem causado a deterioração de vários ecossistemas, devido ao acúmulo de poluentes diversos, tais como, metais pesados, produtos sintéticos, despejos nucleares líquidos, etc. Os efluentes industriais contendo metais pesados e tóxicos escoam para os corpos aquáticos, os quais são freqüentemente fonte de água para o consumo humano. Os sistemas de tratamento empregados pelos órgãos municipais, até o momento, não são equipados para remover quantidades traços desses metais, expondo a população a quantidades desconhecidas destes poluentes através das águas que eles consomem. As principais fontes de poluição por metais pesados são a mineração e o refinamento dos minérios, poeira produzida pelos incineradores, indústrias de galvanização de metais, de manufatura de materiais elétricos, de tintas, baterias, pesticidas, preservativos e processamento de materiais radiativos. Estas descarregam uma ampla variedade de metais tóxicos nos ambientes aquáticos, tais como cádmio, cobre, níquel, cobalto, zinco, mercúrio e chumbo. Eles causam vários efeitos nocivos na saúde humana, além de uma gama de efeitos prejudiciais à flora e fauna.

Embora a remoção desses metais tóxicos dos efluentes utilizando processos físico-químicos venha sendo praticada há várias décadas, sua eficiência é bastante limitada. A exigência de altas quantidades de reagente, a imprevisibilidade da eficiência quantitativa do metal removido, seu custo financeiro alto, são algumas das desvantagens associadas com essas técnicas.

Portanto, a procura por métodos de remoção de metais pesados e tóxicos que sejam ao mesmo tempo inócuos ao meio ambiente e de custo mais baixo, tem-se intensificado. Pesquisas utilizando superfícies biológicas para limpeza dos metais indesejados vêm sendo extensivamente estudadas. É nesse sentido podemos citar como exemplo os documentos PT103286-A1 e PI0302273-0, que utilizaram as propriedades adsorventes da cortiça e da casca de arroz respectivamente.

As superfícies algais estão entre organismos pesquisados devido à sua habilidade em seqüestrar uma ampla variedade de metais. Várias espécies de algas vêm sendo investigadas e o baixo custo de produção dessas superfícies biológicas torna o processo altamente econômico e competitivo, particularmente para aplicações ambientais na desintoxicação de soluções aquosas. Como exemplo, podemos citar os documentos KR2005078461-A e KR533873-B, que utilizam ácido algínico ou a macroalga *Undaria pinnatifida* na forma de bioSORVENTES esféricos. Nesse contexto, podemos citar também a produção de esferas adsorventes (processo sol-gel) utilizando a biomassa da alga marinha *Sargassum* sp (patente PI0700023-5) utilizadas na adsorção e captura de metais pesados. Esse produto apresenta a vantagem de reter metais, inclusive metais presentes em baixas concentrações.

A comunidade fitoplanctônica, isto é as microalgas, são consideradas como um grupo importante, dentre as superfícies biológicas, devido à sua influência no destino dos metais em corpos de água naturais. Elas fornecem vários tipos de superfícies com propriedades adsorventes, tais como parede e membranas celulares, e matéria orgânica liberada no meio. Também podem captar metais por absorção interna, através de processos metabólicos. Aliado às propriedades de complexar metais, o fitoplâncton apresenta outras vantagens na sua utilização, tais como: sua relevância ambiental, sua facilidade de cultivo e sua disponibilidade de produção como clones isolados.

Os polissacarídeos extracelulares algais (PSE) têm se tornado alvo de muitas pesquisas, devido à sua importância ecológica nos ecossistemas aquáticos, tais como, sua utilização como substrato para bactérias e sua capacidade de formar complexos com metais tóxicos. Esta última pode ter um importante papel na retirada desses metais da coluna de água, através da precipitação dessas partículas para os sedimentos e/ou no transporte desses metais para a cadeia trófica.

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial ligante dos polissacarídeos extracelulares produzidos pelas algas, tais como, os trabalhos de A. T. Lombardi 2002; J. Rijstenbil & L. Gerring, 2002; D. Feng & C. Aldrich, 2004 e C. S. Freire-Nordi, 2005, entre outros. Outra propriedade interessante dos produtos extracelulares algais demonstrada em alguns estudos, é a possibilidade de regeneração da bioamassa algal, utilizando por exemplo, uma solução salina, que elimina os metais ligados e possibilitando sua reutilização. Esta importante função dos polissacarídeos produzidos por microalgas tem recebido atenção especial também, devido ao interesse crescente na exploração desses produtos. Como exemplo, podemos citar seu uso em processos de remediação de ambientes impactados, ou seja, na remoção de metais de águas poluídas, como evidenciado pela revisão de J. L. Wang & C. Chen., *Biotechnology Advances*, 27,; 195-226

(2009).

Sistemas que permitem estudar e controlar propriedades específicas de materiais, em nível molecular, tem sido objeto de estudo da nanociência e nanotecnologia. A construção de filmes ultrafinos organizados é essencial para a tecnologia de dispositivos moleculares e sensores, bem como para a interpretação de interações específicas nos materiais estudados. A produção de filmes híbridos, isto é, contendo estruturas supramoleculares inorgânicas/orgânicas, tem como meta principal a possibilidade de obter novas propriedades físicas, químicas, eletrônicas e óticas devido a interações específicas a nível molecular. A inclusão de biomoléculas nesses sistemas é eficiente para a produção de biossensores e para investigar interações específicas. Uma das técnicas mais utilizadas é a de automontagem, desenvolvida mais recentemente por Decher e seus colaboradores [G. Decher et al., 1992 e Lvov e colaboradores [Lvov, 1993]. Ela é baseada na atração eletrostática entre moléculas de cargas opostas, em que o filme é formado através da adsorção alternada de polieletrólitos aniônicos e catiônicos sobre um substrato sólido. Essa técnica permite um alto controle sobre propriedades como a espessura e a arquitetura molecular dos filmes e pode ser explorada para construção de sensores altamente específicos.

#### **OBJETO DA INVENÇÃO**

É um objeto da presente invenção a fabricação de filmes nano-estruturados utilizando o PSE de microalgas para aplicação no seqüestro de metais poluentes de soluções aquosas, promovendo sua remoção total ou parcial, ou seja, pelo menos reduzindo sua quantidade até níveis aceitáveis ambientalmente.

O produto desenvolvido consta de um filme multicamada nanoestruturado incorporando PSE algal em conjunto com um polieletrólito catiônico. Esse filme pode ser obtido sobre qualquer plataforma sólida, por exemplo, um substrato de vidro.

#### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1 apresenta um esquema da montagem de uma bicamada do filme híbrido polieletrólito-polissacarídeo algal (PSE).

A Figura 2 apresenta gráfico de regressão linear (— — —) do incremento da absorvância (■) em 500 nm (utilizando-se espectroscopia UV-Vis) vs número de bicamadas depositadas, do filme contendo a alga *Cryptomonas sp* e usando-se o polieletrólito PEI. O coeficiente de correlação linear calculado foi  $-R = 0,98304$ .

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção apresenta uma inovação sobre as tecnologias anteriores ao utilizar os polissacarídeos algais na montagem dos filmes nanoestruturados. A eficiência da formação dos filmes nanoestruturados polieletrólito/polissacarídeo algal, aliada a

simplicidade do processo de construção destes, qualifica o produto como viável de ser produzido em escala maior. A estratégia de adsorção do material algal em uma superfície suporte, atendeu também a expectativa de torná-lo menos susceptível a dissolução aquosa, com a possibilidade adicional de aumento da superfície suporte, trazendo como  
5 consequência direta o aumento da área de exposição desta, o que leva também a otimização do seu potencial de retenção de metais. Todos esses dados conjuntamente, qualificam esses filmes como superfícies eficientes em aplicações de limpeza ou redução de metais de soluções aquosas, por exemplo, efluentes industriais. Outro fator que deve ser levado em consideração diz respeito ao aspecto destas superfícies serem efetivas  
10 também na remoção de pequenas concentrações desses metais, como revelado nos testes realizados, tornando-os processos economicamente atrativos e competitivos em termos de aplicações ambientais que apresentem contaminação reduzida dos metais. A flexibilidade da montagem dos filmes híbridos em superfícies suportes diferentes, como vidro, ouro e eletrodos de cromo/ouro, sugerem outras aplicações potenciais de utilização  
15 desses filmes, por exemplo, como biossensores.

A presente invenção trata de um produto, na forma de um filme nanoestruturado fabricado segundo a técnica de automontagem composto majoritariamente pelo polissacarídeo proveniente de uma espécie de microalga e um polícatión.

O objeto da presente invenção é um filme híbrido nanoestruturado composto por  
20 camadas constituídas pelo polissacarídeo algal e um polieletrólito. O filme tem a propriedade de adsorver metais de soluções aquosas.

O processo de obtenção do referido filme nanoestruturado compreende 3 etapas: a primeira etapa consiste no cultivo da microalga, a segunda etapa consiste na obtenção do polissacarídeo algal e a terceira etapa é a imobilização do material algal no filme  
25 nanoestruturado.

O exemplo a seguir descreve a melhor forma de concretização da presente invenção e tem por objetivo melhor esclarecer o escopo da invenção, não devendo contudo ser tomado para efeito limitativo da invenção.

A primeira etapa citada acima consiste no cultivo da microalga. A microalga  
30 utilizada foi a *criptofíceia Cryptomonas tetrapirenoïdosa*. O cultivo foi do tipo "batch" em meio de cultura WC. As culturas da respectiva alga foram mantidas em sala com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados, utilizando-se frascos de 7 a 10 L de meio de cultura, sob aeração constante. O tempo de duração das culturas variou entre 30 a 40 dias, e após esse período as culturas foram encerradas.

A segunda etapa consiste na obtenção dos materiais polissacarídicos  
35 extracelulares algais (PSE). Para a referida obtenção dos materiais polissacarídicos

extracelulares algais os seguintes procedimentos foram seguidos: após o encerramento das culturas, elas foram submetidas a centrifugação, com o objetivo de separar as células algais do material excretado dissolvido no meio de cultura. Em seguida esse meio líquido contendo o polissacarídeo liberado foi submetido à filtração tangencial utilizando um cartucho de fibra oco com porosidade de 30 KDa, para isolar e concentrar o polissacarídeo de maior peso molecular. Na etapa seguinte, o filtrado foi tratado com EDTA, para eliminar prováveis metais que estivessem ligados a ele. Em seguida procedeu-se a diálise contra água destilada, em membranas de porosidade conhecida, para eliminar o EDTA. E finalmente o filtrado foi liofilizado e conservado a  $-15^{\circ}\text{C}$ , até a sua manipulação. Antes do seu uso na montagem dos filmes, pesava-se uma fração deste material algal liofilizado, o qual era depois dissolvido em água, portanto mantendo-se o controle das concentrações utilizadas na formação dos filmes.

A terceira e última etapa consistiu na montagem dos filmes automontados e encontra-se representada na Figura 1. O método de automontagem consiste basicamente na imersão do substrato S em soluções com polieletrólitos de carga e sinais opostos (SPE+ e SPE-). Na presente invenção, os filmes automontados foram compostos por camadas alternadas de um polieletrólito catiônico, e o polissacarídeo produzido pela alga *C. tetrapirenoidosa* (provavelmente de carga líquida negativa). O substrato utilizado foi de vidro. O polieletrólito catiônico utilizado na formação dos filmes com os polissacarídeos da alga foi o PEI (polietilenoimina) na concentração de 0,5 mg/mL. O excretado foi dissolvido em água ultra pura na concentração de 0,5 mg/mL e teve seu pH alterado para 9,0.

Os filmes multicamadas de polieletrólito e polissacarídeo algal foram depositados sobre substratos de vidro. A lâmina de vidro foi submersa na solução de polieletrólitos SPE por 3 minutos para permitir a adsorção desta camada na superfície do substrato. Em seguida a lâmina foi imersa em solução aquosa SAQ para a retirada das moléculas não efetivamente adsorvidas e secada em fluxo de  $\text{N}_2$ . Após secagem, o sistema substrato+polication SP foi mergulhado na solução de polissacarídeo e mantido por 5 minutos, procedendo-se novamente a lavagem e secagem. Dessa maneira obtém-se uma bicamada de polication/polissacarídeo algal BP/P depositada sobre o substrato, como indicado na Figura 1. A repetição do processo leva à formação do número de bicamadas que for desejado. O acompanhamento da formação das bicamadas foi feito através de espectroscopias no UV-Vis (Figura 2).

O potencial de remoção de metais de soluções aquosas pelos filmes polieletrólito/PSEalgal foi testado com uma solução aquosa contendo uma solução de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  de concentração fixa (3 ppm). Os filmes utilizados constavam de 80

bicamadas e foram montados com auxílio de um aparelho com sistema automático de deposição de filmes automontados (HMS series programmable slide stainer – Carl Zeiss). O tempo de exposição destes filmes às soluções de metais foi fixo (2 horas de exposição). Após esse intervalo de tempo, os filmes foram retirados e as soluções de metais conservadas na geladeira, para posterior análise. Frascos contendo o metal e um filme automontado que não continha alga, produzido com os polieletrólitos catiônicos e poli(ácido vinil sulfônico) (PVS) foram utilizados para comparação do efeito do PSE na retenção desses metais, bem como um frasco com a solução de metais sem biofilme acrescentado foi utilizado como controle. Após o término dos experimentos a concentração do íon metálico residual em solução foi determinada utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica (Z-8100 POLARIZED Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer). A diferença entre a concentração de metal do frasco controle e a residual dos frascos que continham os filmes de PSE algal/polieletrólito, forneceu a concentração do metal que se adsorveu ao filme. Uma curva padrão para o metal testado foi determinada em toda a análise realizada.

Com relação aos filmes nanoestruturados da presente invenção, a primeira consideração a ser feita diz respeito à produção do PSE algal que é simples, e envolve pouca sofisticação em termos de infra-estrutura, apesar de demandar um tempo mais longo para sua obtenção, ou seja, cultivo e manipulação do PSE algal até sua liofilização. Porém sua produção em termos quantitativos (15,5 mg de PSE/L) permitiu a produção de uma quantidade razoável de filmes.

A eficiência da formação dos filmes nanoestruturados PSE algal/polieletrólito, aliada a simplicidade do processo de construção destes, qualifica o produto como viável para ser produzido em escala maior. A estratégia de adsorção do material algal em uma superfície suporte, atendeu também a expectativa de torná-lo menos susceptível a dissolução aquosa, com a possibilidade adicional de aumentar a superfície suporte, trazendo como consequência direta o aumento da área de exposição desta, o que leva também a otimização do seu potencial de retenção de metais. Todos esses dados conjuntamente, qualificam esses filmes como superfícies eficientes em aplicações de limpeza ou redução desses metais de soluções aquosas, principalmente na remoção de pequenas concentrações desses metais, como revelado nos testes realizados, tornando-as processos altamente econômicos e competitivos em termos de aplicações ambientais que apresentem contaminação reduzida dos metais.

A utilização da microbalança como medida “in situ” da adsorção dos metais, mostrou-se como uma técnica simples, eficaz e rápida de avaliar o potencial de reter diferentes metais pelos filmes, e diante disso, permitindo testar essa propriedade para

uma variedade maior de metais, diretamente na superfície desse filmes.

A flexibilidade da montagem dos filmes híbridos em superfícies suportes diferentes, como vidro, ouro e eletrodos de cromo/ouro, como amplamente demonstrado nos experimentos, ampliaram a capacidade de utilização desses filmes, desde que testes  
5 iniciais mostraram também a capacidades destes filmes em adsorver também enzimas, portanto qualificando-os como biossensores em potencial e com aplicações em diversas áreas.

### REFERÊNCIAS

10 DECHER, G., HONG, J.D., SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210/211, p. 831-835, 1992.

FENG, D., ALDRICH, C. Adsorption of heavy metals by biomaterials derived from marine alga *Ecklonia maxima*. **Hydrometallurgy**, v. 73, p.1-10, 2004.

15 FREIRE-NORDI, C. S, VIEIRA, A. A. H , NASCIMENTO, O. R. The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: na EPR study. **Process Bioch.**, v. 40, p. 2215-2224, 2005.

LOMBARDI, A. T., VIEIRA, A. A. H., SARTORI, L. A. Mucilaginous capsule adsorption and uptake of copper by *Kirchineriella aperta* (Chlorococcales). **J. Phycol.**, v. 38, p. 332-337, 2002.

20 LVOV, Y., DECHER, G. AND MÖHWALD, H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfato) and poly(allylamine). **Langmuir**, v. 9, p. 481-486, 1993.

RIJSTENBIL, J. W., GERRINGA, L. J. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cells responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a  
25 gradual increase in copper. **Aquat. Toxicol.**, v. 56, p. 115-131, 2002.

WANG, J.L. , CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 195-226, 2009

## REIVINDICAÇÕES

1. Filme nanoestruturado contendo polissacarídeo de origem algal imobilizado em conjunto com polieletrólito, caracterizado por compreender:

Substrato (S) contendo camadas alternadas de um polieletrólito catiônico e um polissacarídeo produzido pela alga *C. tetrapirenoidosa*.

2. Filme, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o substrato (S) ser de vidro, ouro e eletrodos de cromo/ouro.

3. Filme, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o polieletrólito catiônico ser PEI (polietilenoimina).

4. Filme, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a concentração do polieletrólito catiônico PEI (polietilenoimina) ser de 0,5 mg/mL.

5. Filme, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o polissacarídeo produzido pela alga *C. tetrapirenoidosa* ser dissolvido em água ultra pura na concentração de 0,5 mg/mL e ter seu pH alterado para 9,0.

6. Uso de filme nanoestruturado contendo polissacarídeo de origem algal imobilizado em conjunto com polieletrólito, das reivindicações 1 a 5, caracterizado por ser para aplicação na remoção de metais pesados como Cu, Ag, Ni, Cr, Hg de ambientes aquáticos, através da adsorção dos metais no filme nanoestruturado.



**RESUMO****FILME NANOESTRUTURADO CONTENDO POLISSACARÍDEO DE ORIGEM ALGAL  
IMOBILIZADO EM CONJUNTO COM POLIELETRÓLITO**

5 A presente invenção refere-se à produção de um filme ultrafino híbrido, utilizando a técnica de automontagem contendo um polieletrólito catiônico e o polissacarídeo extracelular produzido pela microalga *Cryptomonas tetrapirenoidosa*. O invento compreende também a utilização desse filme para remoção de metais pesados em soluções aquosas.