



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

(11) PI 0702934-9 B1

(22) Data do Depósito: 19/06/2007

(45) Data de Concessão: 22/11/2016



(54) **Título:** MICROESFERAS PARA ABSORÇÃO DE METAIS PESADOS, PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO, E PROCESSO DE REMOÇÃO DE METAIS PESADOS DE MEIOS AQUOSOS

(51) **Int.Cl.:** B01J 20/30; B01J 20/24; B01J 20/04; A62D 101/24; A62D 3/30; C02F 1/28

(73) **Titular(es):** CBPF - CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

(72) **Inventor(es):** ELENA MAVROPOULOS OLIVEIRA TUDE. CGC/CPF: 72230428772, MARIA HELENA MIGUEZ ROCHA LEÃO. CGC/CPF: 02608073700, NILCE CARBONEL CAMPOS DA ROCHA. CGC/CPF: 46777253734, ALEXANDRE MALTA ROSSI. CGC/CPF: 26220644700, MARCELO HENRIQUE PRADO DA SILVA. CGC/CPF: 87019183700

Relatório Descritivo de Patente de Invenção**MICROESFERAS PARA ABSORÇÃO DE METAIS PESADOS,
PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO, E
PROCESSO DE REMOÇÃO DE METAIS PESADOS DE MEIOS AQUOSOS**

5

Campo da Invenção

A presente invenção revela microesferas compostas de um polissacarídeo de origem biológica e um mineral pertencente ao grupo das apatitas, preferencialmente o alginato e a hidroxiapatita respectivamente, bem
10 como processos para sua preparação e seu uso na remoção de metais pesados como o chumbo de meios aquosos como, por exemplo, fluidos gástricos e/ou reservatórios contaminados.

Antecedentes da Invenção

15 Metais pesados são metais altamente reativos e bio-acumulativos, ou seja, o organismo em geral não é capaz de eliminá-los. Os seres vivos necessitam de pequenas quantidades de alguns desses metais, incluindo cobalto, cobre, manganês, molibdênio, vanádio, estrôncio, e zinco, para a realização de funções vitais do organismo. Porém níveis excessivos desses
20 elementos podem ser extremamente tóxicos.

Metais pesados como o antimônio, arsênio, bário, cádmio, cromo, chumbo, mercúrio, níquel, selênio e prata altamente tóxicos para seres humanos e animais são encontrados durante diversos processos industriais e muitos destes compostos podem ser absorvidos pela pele, pelas vias
25 respiratórias ou ainda pela ingestão direta de água ou alimentos contaminados, causando dermatite alérgica, ulcerações, perfurações do septo nasal, câncer, distúrbios afetivos, irritação neuromuscular, cefaléia, náuseas e desmaios. Quando lançados como resíduos industriais, na água, no solo ou no ar, esses elementos podem ser absorvidos pelos vegetais e animais das proximidades,
30 provocando graves intoxicações ao longo da cadeia alimentar, devido a seus efeitos cumulativos.

O chumbo é um metal amplamente utilizado e potencialmente tóxico a seres humanos, particularmente às crianças. A ingestão é a rota de exposição

mais comum. Uma vez ingerido, o Pb^{2+} é complexado nos fluidos digestivos do estômago após a atividade gástrica ácida, sendo liberado na corrente sanguínea. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-USA) (<http://www.epa.nsw.gov.au/leadsafe>), o trato gastro-intestinal das crianças absorve 50% do total de Pb^{2+} ingerido enquanto o dos adultos absorve de 10 a 15% do total ingerido. Uma vez ingerido, o metal é estocado nos ossos e a taxa de eliminação deste tecido é estimada em anos (*J.Hazard.Mater.B 101,55 (2003)*). Diante do alto dano causado pela ingestão de metais pesados, particularmente, o chumbo, é essencial que sejam encontradas soluções a fim de remover tais metais pesados, inclusive de fluidos corporais como suco gástrico e/ou entérico.

A literatura patentária compreende diversos documentos revelando tentativas de solucionar tal problema. Na patente US 5,055,402 é relatado o uso de microorganismos como as algas como agentes absorventes de íons metálicos de soluções aquosas. Por tal método, após a absorção do íon metálico pelas algas, estas são lavadas e aquecidas a temperaturas entre 300 e 500 °C para a obtenção de uma composição estável que não se dissolve em água novamente.

O documento US 5,037,479 trata de um método de descontaminação de rejeitos sólidos contaminados com metais pesados como o chumbo, cádmio e zinco. Em tal método, o rejeito é inicialmente solubilizado em solução tamponante à qual é adicionado um sal ou um ácido cujo ânion forma um composto insolúvel com o metal pesado, ou complexos que não liberam o metal. Neste documento, o sal ou o ácido adicionado é escolhido do grupo que compreende o ácido fosfórico, o fosfato de amônio, o fosfato di-amônio, o ácido bórico, o superfosfato triplo ou outras fontes de fosfato e ferro metálico. Nesta invenção, forma-se um complexo insolúvel que precipita quando em solução.

O uso de fosfatos minerais como imobilizadores de chumbo já foi relatado por Takeuchi (*J.Chem.Eng.Japan 98-100 (1988)*). Já foi documentado na patente US 5,512,702 o uso de fosfato de cálcio como a hidroxiapatita sintética, a hidroxiapatita de ocorrência natural, o fosfato de cálcio dibásico ou rochas de fosfato para imobilizar chumbo em solos, areias ou rejeitos

contaminados com chumbo. No entanto, nada é dito da sua associação com outros materiais, como polímeros ou polissacarídeos.

O documento US 4,737,356 fala da remoção de chumbo e cádmio de resíduos de combustão através de um tratamento com óxido de cálcio seguido de uso de fosfato, de forma a precipitar sais insolúveis destes metais pesados.
5 No entanto, nada é dito da sua associação com outros materiais, como polímeros ou polissacarídeos.

O documento US 5,284,636 relata o uso de fósforo como agentes imobilizadores de chumbo em sistemas de combustão, gerando sais produtos
10 facilmente removíveis do sistema.

Os documentos US 6,136,345, US 4,525,339, US 5,407,686, US 4,775,536, WO 01/528333 e US 5,558,879 referem-se a formulações gástricas e entéricas mas com a finalidade de liberação determinada substância, e não, com a finalidade de seqüestra-la do fluido gastro-intestinal.

O alginato é um polissacarídeo biocompatível seguro que tem sido aplicado em muitos produtos industriais (*J. Pharm.Sci.*61,279 (1972)). Desde 1980, o alginato tem sido utilizado em produtos alimentícios. Exemplos da sua utilização hoje incluem o uso como um aditivo alimentar seguro, como material de base para modelagem de alimentos ou ainda, como alimento da dieta. Além
20 disso, microesferas de alginato oferecem várias aplicações em muitos campos da medicina regenerativa tais como material injetável para a formação de novos ossos (*J. Cranio-Maxillofac.Surg.*33,50 (2005)), armações injetáveis para regeneração de tecidos (*Wiley Periodics, Inc.* 57 (2004)), sistemas de *drug delivery* de antibióticos, proteínas ou genes (*J. Mater.Sci.:Mater.Med.*13,87 (2002); *Clin. Orthop.Relat.Res.* 437,236 (2005)) e como matriz para
25 imunoisolamento de células transplantadas. Em aplicações ambientais, esferas de gel de alginato cruzados foram propostas como absorventes para remover íons de metais pesados de soluções aquosas (*Chemosphere* 55,57 (2004)). Além disso, a hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tem sido reconhecida pela
30 eficiente captura de metais em soluções aquosas (*Environ.Sci.Technol.*36,1625 (2002); *Environ.Sci.Technol.* 36, 1630(2002)). A viabilização da cristalização da HA na presença de alginato de sódio foi relatada por Malkaj (*J.Mater.Sci.: Mater.Med.*16,733(2005)).

A patente US 6,989,102 relata o uso de um gel de alginato para purificação de água.

Apesar de todos esses trabalhos da técnica anterior, não há registro do uso do alginato associado com a HA para a remoção de metais pesados em meios e/ou soluções aquosas.

Os autores da presente invenção propõem o uso de microesferas compostas de alginato e hidroxiapatita como meio para capturar metais pesados em meios e/ou soluções aquosas, preferencialmente pH abaixo de 7. Essa capacidade de resistir a pHs baixos amplia as possibilidades de uso das microesferas da invenção, incluindo seu uso como sequestrante em fluidos como suco gástrico. As microesferas da invenção são também úteis na reversão de casos de intoxicação por tais metais pesados e podem ajudar também a remediar contaminações ambientais.

15 **Sumário da Invenção**

É um objeto da presente invenção proporcionar microesferas compreendendo:

- a) um polissacarídeo de origem biológica;
- b) um mineral pertencente ao grupo das apatitas;

20 Em especial, o polissacarídeo de origem biológica é escolhido dentre o grupo que compreende alginato, pectina e/ou quitosana, e o mineral pertencente ao grupo das apatitas é a hidroxiapatita.

É um adicional objeto da presente invenção microesferas de alginato e hidroxiapatita com tamanho de partícula variando entre 250 μm a 2500 μm .

25 É um objeto adicional da presente invenção um processo de produção de microesferas compreendendo as etapas de:

a) suspender um mineral pertencente ao grupo das apatitas em água;

30 b) adicionar à suspensão do item a) uma solução de um polissacarídeo de origem biológica;

c) realizar a extrusão da solução resultante do item b) em uma solução de íons Ca^{+2} .

Em especial, a extrusão da solução de alginato e hidroxiapatita é feita através de uma seringa extrusora, com objetivo de formar microesferas de diferentes diâmetros.

É um adicional objeto da presente invenção um processo de absorção de metais pesados em solução compreendendo as etapas de:

- a) adicionar as microesferas à solução aquosa contendo um metal (divalente ou trivalente, como, por exemplo, Pb^{2+} e Al^{3+}) a ser removido; e
- b) opcionalmente remover as microesferas.

Esses e outros objetos da invenção serão mais bem compreendidos e valorizados a partir da descrição detalhada a seguir.

Breve Descrição das Figuras

A **Figura 1** mostra a dissolução da hidroxiapatita (HA), alginato-hidroxiapatita (alginato-HA) em fluido gástrico simulado não contaminado: (○) Ca (HA), (●) P(HA), (◇) Ca (alginato-HA) e (◆) P (alginato-HA).

A **Figura 2** mostra a captura de Pb^{2+} por HA e de microesferas de alginato-HA em fluido gástrico simulado contendo 220 mg L^{-1} de Pb^{2+} (○) HA e (◆) alginato-HA.

A **Figura 3** mostra o teste padrão por difração de raios-X (XRD) de microesferas de alginato-HA após 3 minutos, 2 horas, 8 horas e 5 dias de absorção de chumbo com concentração inicial de 220 mg L^{-1} .

A **Figura 4** mostra a captura de Pb^{2+} por microesferas de alginato-HA em fluido gástrico simulado contendo 256 mg L^{-1} Pb^{2+} : (○) pequenas - $500\mu\text{m} < \varnothing < 710\mu\text{m}$; (■) médias - $1000\mu\text{m} < \varnothing < 1200\mu\text{m}$ e (Δ) grandes - $1700\mu\text{m} < \varnothing < 2000\mu\text{m}$.

A **Figura 5** mostra a micrografia eletrônica de varredura de microesferas de alginato-HA (a) em água Milli-Q (x 2500); (b) incubado no fluido gástrico simulado sem Pb^{2+} durante 2 horas, (c) após 2 horas no fluido gástrico simulado contendo 220 mg L^{-1} Pb^{2+} (d) imagem com contraste por elétrons retro-espalhados após 2 horas de captura de Pb^{2+} .

A **Figura 6** mostra o espectro EDS indicando a presença de Pb na superfície de alginato-HA após 2 horas de captura de Pb^{2+} ; a) superfície, b) interior.

A **Figura 7** mostra (a) a micrografia eletrônica de superfície (contraste eletrônico secundário 2500X) de microesferas de alginato-HA após 5 dias no fluido gástrico simulado com Pb^{2+} ; (b) análise eletrônica de superfície imagem com contraste por elétrons retro-espalhados após 2 horas de captura de Pb^{2+} .
5 (2.500X); (c) interface SE 2.500X; (d) interface BSE 2.500X.

A **Figura 8** mostra a micrografia eletrônica de varredura (contraste eletrônico secundário) no interior das de microesferas de alginato-HA (2500X) após 5 dias de captura Pb^{2+} no fluido gástrico simulado. (b) espectro EDS indicando a ausência de Pb^{2+} no interior das nas microesferas de alginato-HA .
10

Descrição Detalhada da Invenção

Para efeitos dessa invenção, a expressão “mineral pertencente ao grupo das apatitas” compreende, mas não se limita a hidroxiapatita, carbonato-apatita, fluoro-apatita, cloro-apatita e mistura dos mesmos. O mineral
15 pertencente ao grupo das apatitas utilizado na presente invenção pode ser de origem sintética e/ou natural. A expressão “metais pesados” compreende, mas não se limita a metais divalentes e/ou trivalentes como alumínio, arsênio, cádmio, cromo, chumbo, mercúrio, níquel e mistura dos mesmos.

Além disso, a expressão “polissacarídeo de material biológico”
20 compreende, mas não se limita a alginato, dextrina, pectina, quitosana e mistura dos mesmos. Adicionalmente, derivados desses polímeros também são incluídos no escopo da definição. O peso molecular dos polímeros pode variar naturalmente, dependendo de sua origem biológica e processos de purificação.

A faixa de diâmetros preferencial para as esferas descritas nesse
25 exemplo variam de 250 μm a 2500 μm .

Os exemplos a seguir descritos não têm a intenção de limitar a invenção, mas somente de exemplificar algumas das maneiras de concretizá-la.

Exemplo 1 - Preparo das microesferas

30 a) Microesferas de alginato-HA

Amostras de hidroxiapatita foram sintetizadas por gotejamento de uma solução aquosa de $(NH_4)_2HPO_4$ em uma solução $Ca(NO_3)_2$ a $80^\circ C$ e o pH mantido em 11. O pH da solução foi ajustado pela adição de NH_4OH para

alcançar pH 11. O precipitado foi separado por filtração, repetidamente lavado com água deionizada fervente e seco a 100°C por 24 h. O pó seco foi manualmente moído e partículas com tamanho menor que 210 µm foram separadas por peneiramento.

5 A hidroxiapatita foi incorporada em um polímero de alginato de sódio. Uma mistura bem homogênea de alginato de sódio e hidroxiapatita foi preparada pela mistura de uma solução aquosa de alginato a 3% p/p com uma suspensão de hidroxiapatita em 1g/mL de HA em água Mili-Q.

10 A mistura foi extrudada por uma agulha de seringa de injeção com diferentes diâmetros em uma solução 0.15 M CaCl₂ na qual permaneceu durante 24 horas para troca iônica (*Mater.Sci.Eng.C 24,625 (2004)*).

b) Microesferas de alginato

15 Microesferas de alginato sem hidroxiapatita foram produzidas para uso em experimentos controle, seguindo o mesmo procedimento descrito para o item a) acima, com a única diferença sendo a ausência da hidroxiapatita do meio.

c) Microesferas de hidroxiapatita

20 As esferas de hidroxiapatita foram inicialmente preparadas conforme descrito no Exemplo 1a e em seguida sinterizadas para a remoção do alginato.

Exemplo 2 - Caracterização das microesferas de alginato-HA

25 A hidroxiapatita sintética em pó utilizada possui relação molar cálcio/fósforo (Ca/P) $1,65 \pm 0,02$ e área superficial específica BET de $45 \pm 4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. A análise química elementar do conteúdo de cálcio e de fósforo e de outros elementos foram determinados por ICP-OES em equipamento OPTIMA 3000 PERKIN-ELMER.

30 A identificação da nova fase mineral formada após e durante a captura de Pb²⁺ foi determinada por difração de raio-X (XRD) utilizando um difratômetro SEIFERT-FPM GmbH operando com radiação CuK α (1.5418 Å) a 40 kV e 40 mA com um monocromador de grafite no grupo primário. Os padrões de XRD foram obtidos no intervalo de 2 θ para um intervalo de 10° a 100°C. O tamanho médio do cristalito ao longo das direções (002) e (300) foram determinados a partir dos padrões por XRD utilizando a equação de Scherer. O tamanho médio

de cristalitos ao longo das direções (002) e (300) foram 24 e 18 nm respectivamente. Um microscópio eletrônico de varredura (SEM) LEICA modelo S440 com espectrômetro de energia dispersiva (EDS) foi utilizado para medir a morfologia e a composição de fases. Imagens com contraste por elétrons retro-espalhados (BSE) e de elétrons secundários (ES) foram obtidas para identificar fases ricas em Pb^{2+} .

Exemplo 3 - Experimentos de Dissolução

Experimentos de dissolução foram acompanhados em triplicata utilizando 0,45g de hidroxiapatita, 0,45g de alginato e 0,45 g de amostra alginato-HA. Todas as amostras foram mecanicamente agitadas durante 2 horas em tubos de 40 mL contendo fluido gástrico simulado (2 mL HCl e 6g NaCl em 1L de solução com pH ajustado para 1,2). Alíquotas das soluções foram coletadas após 3, 7, 15, 25, 60 e 120 minutos. As alíquotas foram diluídas em HNO_3 0,25% e as concentrações de cálcio e fósforo determinadas por ICP-OES. Esse experimento foi realizado com microesferas de alginato e microesferas de hidroxiapatita para avaliação comparativa.

O comportamento da composição alginato-HA e do pó de HA em um fluido gástrico simulado não contaminado é mostrado na Figura 1. O pó de HA mostrou alta taxa de dissolução devido ao pH baixo. Nos primeiros 3 minutos da reação em pH 1,2, o pó foi quase totalmente dissolvido e $5,25 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de Ca^{2+} e $3,29 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de P foram liberados para o fluido. As microesferas de alginato-HA tiveram um comportamento diferente: a dissolução da hidroxiapatita foi fortemente reduzida e a matriz de alginato protegida da hidroxiapatita nestas condições ácidas. Somente $6,31 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de Ca^{2+} e $3,81 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de P foram liberados pela microesfera alginato-HA após 2 horas no fluido gástrico simulado.

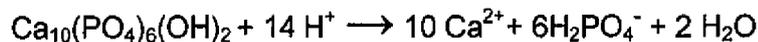
Exemplo 4. Experimentos de absorção e liberação do metal pesado pelas microesferas de alginato-HA

Microesferas de alginato-HA (alginato e hidroxiapatita) de três diâmetros diferentes (pequenas: $500\mu\text{m} < \varnothing < 710\mu\text{m}$; médias: $1000\mu\text{m} < \varnothing < 1200\mu\text{m}$ e grandes: $1700\mu\text{m} < \varnothing < 2000\mu\text{m}$) foram utilizadas para medir a influência do

tamanho das esferas na captura de Pb^{2+} no fluido gástrico simulado. Os experimentos foram feitos em triplicata utilizando 0,1 g de microesferas de alginato-HA em 10 mL de fluido gástrico simulado contendo 265 mg L^{-1} de Pb^{2+} durante 120 minutos. Para comparar a eficiência das microesferas médias de HA, alginato e alginato-HA na absorção de Pb^{2+} , grupos de experimentos em triplicata foram feitos utilizando amostras de 0,45 g de cada formulação em 40 mL de fluido gástrico simulado contendo 220 mg L^{-1} de Pb^{2+} . As amostras foram mecanicamente agitadas durante 2 horas e alíquotas foram coletadas, diluídas com solução HNO_3 a 0.25% v/v e então, analisadas por ICP-OES. Imediatamente após os experimentos de absorção, as amostras de alginato-HA foram agitadas durante 1 hora no fluido gastro-intestinal simulado (6.8 g KH_2PO_4 e 77 mL 0.2N NaOH em 1L de solução com pH ajustado a 6.8) para medir a imobilização de Pb^{2+} pelo alginato-HA no fluido gástrico simulado. Os resíduos sólidos foram secos a $40^\circ C$ e analisados por difração de raios-X.

A determinação da captura de Pb^{2+} pelo pó de hidroxiapatita no fluido gástrico simulado contaminado contendo 220 mg L^{-1} de Pb^{2+} é mostrada na Figura 2. Nos primeiros 3 minutos de reação, o chumbo do fluido gástrico simulado foi completamente removido pelo pó da hidroxiapatita. Ao mesmo tempo, quase todo o cálcio da hidroxiapatita foi liberado para o fluido gástrico simulado como mostrado na Figura 1.

Os mecanismos de captura de chumbo pelo pó de hidroxiapatita foram detalhados por vários autores, tendo sido concluído que a imobilização de chumbo é controlada pela dissolução da hidroxiapatita e pela precipitação da hidroxiomorfita, de acordo com as reações:



Os presentes inventores estudaram os mecanismos acima e propuseram que a dissolução dos cristais de hidroxiapatita foi seguida pela precipitação de uma solução sólida instável de chumbo e cálcio $Pb_{(10-x)}Ca_x(PO_4)_6(OH)_2$. Durante o processo de captura, um mecanismo de dissolução e re-precipitação

acontece, gerando uma fase termodinamicamente estável sob estas condições. Então, o conteúdo de Pb^{2+} dos cristais recém-formados aumenta com o tempo até o valor estequiométrico da hidroximorfita $Pb/P=1,67$ ser atingido por longos tempos de reação. Esta mudança na estequiometria dos cristais foi também
5 seguida pela modificação no tamanho dos cristais e na morfologia.

A captura de Pb^{2+} mostrou um comportamento diferente quando as microesferas de alginato-HA foram utilizadas, como mostrado na Figura 2. Neste caso, a variação da concentração de Pb^{2+} com o tempo, sugeriu que dois mecanismos estavam envolvidos na imobilização de chumbo pelas
10 microesferas. O primeiro mecanismo foi responsável pela menor parte da imobilização de chumbo e satura nos primeiros 15 minutos de reação (12%). O segundo mecanismo teve uma taxa de imobilização mais lenta, mas contribuiu para 88% da captura de chumbo. Após 2 horas as microesferas de alginato-HA foram efetivas na imobilização de 220 mg L^{-1} de Pb^{2+} do fluido gástrico
15 simulado. Este tempo corresponde ao período em que o alimento ingerido permanece no estômago. Embora as microesferas de alginato-HA sejam menos efetivas na captura de Pb^{2+} nos primeiros minutos, quando comparado à hidroxiapatita pura, as microesferas mostraram quase a mesma eficácia que a hidroxiapatita na captura de Pb^{2+} no fluido gástrico simulado contendo 220 mg L^{-1} de Pb^{2+} após 2 horas de incubação.
20

A cinética de captura de chumbo pelas microesferas de alginato-HA teve um comportamento diferente do que o do pó de HA porque i) o alginato participou na imobilização do chumbo e ii) os nanocristais da hidroxiapatita devem ter sido preferencialmente incorporados na estrutura "egg-box" do
25 alginato. Esta estrutura "egg-box" foi formada quando cadeias lineares de polímeros das microesferas formadas pelos ácidos β -D manurônico (M) e α -L gulurônico (G) foram interconectados por substituir Na^+ por Ca^{2+} em blocos consecutivos de unidades G. Substituições adicionais de Ca^{2+} por outros íons divalentes tais como Pb^{2+} podem ocorrer sem afetar a estabilidade da estrutura
30 "egg-box". Portanto, a captura mais rápida de Pb^{2+} nos primeiros minutos da reação foi atribuída a esta substituição de Ca^{2+} por Pb^{2+} na estrutura do alginato. A estrutura "egg-box" apresentou uma solubilidade muito baixa sob valores de pH ácidos, tais como o pH do fluido gástrico simulado (pH=1,2)

porque cargas iônicas estão ausentes na estrutura do alginato. Como resultado, as microesferas de alginato permaneceram estáveis quando imersas no fluido gástrico simulado e protegeram a hidroxiapatita da dissolução rápida. A estabilidade das microesferas no fluido gástrico simulado sugeriu uma promissora aplicação destas microesferas como agentes imobilizadores de Pb^{2+} e eliminação subsequente nas fezes.

A Figura 3 mostra o ensaio padrão por difração de raio-x (XRD) das microesferas de alginato-HA após 3 minutos, 2 horas, 8 horas e 5 dias no fluido gástrico simulado contaminado com Pb^{2+} . O padrão de difração dos picos das amostras incubadas em fluido gástrico simulado contaminado com Pb^{2+} indica a presença de hidroxiapatita cristalina com pico pequeno a $\theta=30,1$, correspondendo à fase secundária atribuída à solução sólida de fosfato de chumbo e fosfato de potássio. A figura 3 também mostra que o padrão XRD desta nova fase continuou a aumentar mesmo quando o chumbo foi completamente removido do fluido gástrico simulado por microesferas de alginato-HA. Este resultado confirmou que a imobilização de chumbo foi principalmente controlada por um mecanismo envolvendo a dissolução da hidroxiapatita e a formação de uma solução sólida de $Pb_{(10-x)}Ca_x(PO_4)_6(OH)_{2-x}(Cl)_x$. A solução sólida de nanocristais dissolve continuamente para formar uma estrutura mais estável com maior concentração de íons chumbo. Para longos tempos de reação, a estrutura é transformada em hidroxipiromorfita pura.

A Figura 4 mostrou que a taxa de captura de Pb^{2+} pode ser controlada pela variação da área da superfície das microesferas de alginato-HA. A redução da dimensão das microesferas de alginato-HA produziu significativo aumento na dissolução de HA e substituição de Ca^{2+} por Pb^{2+} na estrutura do alginato. Foi observado que as microesferas pequenas, $500\mu m < \varnothing < 710\mu m$, imobilizaram mais de 50% do Pb^{2+} nos primeiros 5 minutos e que 15 minutos foram suficientes para imobilizar a totalidade do chumbo presente na solução (265 mg L^{-1} de Pb^{2+}). Por outro lado, as microesferas de tamanhos médio ($1000\mu m < \varnothing < 1200\mu m$) e grande ($1700\mu m < \varnothing < 2000\mu m$) alcançaram a mesma eficiência após 30 minutos.

A morfologia das microesferas de alginato-hidroxiapatita após a imersão por 2 horas em água Milli-Q não mostrou diferença significativa quando

comparada com as microesferas recém-preparadas, conforme mostrado na Figura 5a. A amostra incubada durante 2 horas no fluido gástrico simulado livre de Pb^{2+} mostrou que a estrutura do alginato permaneceu estável quando imersa em tal fluido, mas mudanças morfológicas ocorrem na superfície das microesferas, como mostrado na Figura 5b. Este resultado confirma a dissolução parcial de HA, mostrada na Figura 1 onde se pode observar a liberação de Ca^{+2} e P neste ponto. A análise por microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microesferas de alginato-HA após a incubação no fluido gástrico simulado rico em Pb utilizando contraste de elétrons secundários (ver Figura 5c) indicou a presença de precipitados na superfície. A mesma região foi analisada por SEM utilizando contraste BSE, como mostrado na Figura 5d, onde o precipitado aparece cinza claro em uma matriz escura. As imagens mostraram o precipitado com maior peso atômico (regiões claras) quando comparadas à matriz (regiões escuras). Na verdade, as análises por EDS feitas nas regiões claras da Figura 5d, confirmaram que o precipitado é rico em chumbo (Figura 6a).

As microesferas de alginato-HA foram cortadas para permitir observação no interior do material. Nenhum precipitado de Pb^{2+} foi observado nas regiões internas da amostra, indicando que a captura ocorreu apenas na superfície. Esta evidência foi também confirmada por análises de EDS feitas em amostras fraturadas como mostrado na Figura 6b.

A formação de cristais aciculares na superfície das microesferas de alginato-HA foi bem caracterizada em imagem eletrônica por contraste de elétrons retroespalhados das microesferas de alginato-HA mantidas em solução rica em chumbo durante 5 dias. Este longo tempo experimental confirmou que cristais de PbHA foram firmemente ligados à superfície da microesfera porque nenhum chumbo foi detectado em solução. Esta associação de cristais de PbHA na superfície das microesferas é importante para aplicações biomédicas futuras porque previne que os nanocristais de PbHA sejam liberados no fluido gástrico e sejam absorvidos pela corrente sanguínea. As Figuras 7a-d mostraram a morfologia dos cristalitos da hidroxipiromorfita na superfície das microesferas com ambos, contraste de elétrons secundário e contraste de elétrons retroespalhados (ver as Figuras 7a

e 7b respectivamente). As imagens revelaram que as dimensões da partícula aumentaram com o tempo de reação, o que corresponde às amostras com maior conteúdo de chumbo. As microesferas que foram fraturadas e analisadas por SEM nas regiões internas não mostraram cristal de piromorfita (ver Figuras 7c e 7d) com contraste secundário e por elétrons retroespalhados (respectivamente). Resultados por SEM e EDS confirmaram os resultados XRD e mostraram que cristais de fosfato de chumbo exibindo morfologia acicular foram apenas precipitados na superfície das microesferas. Nenhum Pb^{2+} foi detectado no interior de uma esfera fraturada como mostrado nas Figuras 8a e 8b.

Logo após a captura, as microesferas de alginato-HA foram submetidas aos experimentos de liberação em um fluido gástrico simulado. Foi verificado que apenas 0,4% do Pb^{2+} imobilizado foi liberado no fluido durante os primeiros 60 minutos de imersão. Experimentos de liberação mostraram que as microesferas contendo cristais de PbHA permaneceram estáveis por 1 hora no fluido gástrico simulado. Depois disto, as microesferas começaram a se dissolver porque o alginato é instável em pHs maiores do que 6,8. Embora os cristais de PbHA sejam liberados no fluido, o Pb^{2+} permaneceu imobilizado na estrutura PbHA. Estes resultados reforçam a hipótese de que as microesferas de alginato-HA podem ser um sistema muito eficiente para a captura de Pb^{2+} do fluido gastro-intestinal contaminado prevenindo a contaminação sistêmica pela captura através da corrente sanguínea. Além disso, isso pode minimizar o risco da liberação das nanopartículas de PbHA no fluido gastro-intestinal evitando que estas nanopartículas alcancem a membrana gastro-intestinal promovendo efeitos indesejáveis tais como a endocitose pelas células dos enterócitos para a corrente sanguínea.

Estes resultados demonstram que as microesferas de alginato-HA são um potencial sistema a ser utilizado na dieta humana de populações submetidas à contaminação ambiental por íons Pb^{2+} . Os resultados claramente mostram que as microesferas de alginato-HA propostas podem ser um dispositivo adequado para imobilizar o Pb^{2+} no fluido gástrico humano sendo, portanto úteis para evitar os efeitos tóxicos causados pela ingestão de metais.

Os versados na arte valorizarão imediatamente os importantes benefícios decorrentes do uso da presente invenção. Variações na forma de concretizar o conceito inventivo aqui exemplificado devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e das reivindicações anexas.

Reivindicações

**MICROESFERAS PARA ABSORÇÃO DE METAIS PESADOS,
PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO, E
PROCESSO DE REMOÇÃO DE METAIS PESADOS DE MEIOS AQUOSOS**

5

1. Microesfera para absorção de metais pesados **caracterizada** por compreender:

- a) pelo menos um polissacarídeo de origem biológica; e
- b) pelo menos um mineral pertencente ao grupo das apatitas.

10

2. Microesfera, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo polissacarídeo de origem biológica ser escolhido do grupo que compreende alginato, derivados de alginato, pectina, derivados de pectina, dextrina, derivados de dextrina, quitosana, derivados de quitosana e mistura dos mesmos.

15

3. Microesfera, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo polissacarídeo de origem biológica ser alginato.

4. Microesfera, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo mineral pertencente ao grupo das apatitas ser escolhido do grupo que compreende hidroxiapatita, carbonato-apatita, fluoro-apatita, cloro-apatita e mistura dos mesmos.

20

5. Microesfera, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo mineral pertencente ao grupo das apatitas ser hidroxiapatita.

6. Microesfera, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pela hidroxiapatita possuir razão molar Ca:P de 1,5 a 1,7.

25

7. Microesfera, de acordo com as reivindicações 1 a 5, **caracterizada** por possuir diâmetro de 250 μm a 2500 μm .

8. Processo de preparo de microesfera para absorção de metais pesados **caracterizado** por compreender as etapas de:

30

a) preparar uma solução aquosa de um polímero de origem biológica numa concentração de 0,1% p/p a 5% p/p.

b) preparar uma suspensão aquosa de um mineral pertencente ao grupo das apatitas em uma concentração de 0,1 g/mL a 5 g/mL

c) misturar a solução do item a) com a suspensão do item b).

d) realizar a extrusão da solução do item c) em uma solução de íons Ca^{+2} .

9. Processo de preparo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo polímero de origem biológica ser escolhido do grupo que compreende
5 alginato, derivados de alginato, pectina, derivados de pectina, dextrina, derivados de dextrina, quitosana, derivados de quitosana e mistura dos mesmos.

10. Processo de preparo, de acordo com as reivindicações 8 e 9, **caracterizado** pela solução do item a) ser uma solução de alginato em uma
10 concentração de 3% p/p.

11. Processo de preparo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo mineral pertencente ao grupo das apatitas ser escolhido do grupo que compreende hidroxiapatita, carbonato-apatita, fluoro-apatita, cloro-apatita e mistura dos mesmos.

12. Processo de preparo, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo mineral pertencente ao grupo das apatitas ser hidroxiapatita.

13. Processo de preparo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pela hidroxiapatita possuir razão molar Ca:P de 1,5 a 1,7.

14. Processo de preparo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado**
20 pela solução de íons Ca^{+2} ser uma solução de CaCl_2 .

15. Processo de preparo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pela extrusão produzir microesferas com diâmetro de 250 μm a 2500 μm .

16. Processo de remoção de metais pesados, **caracterizado** por compreender a contactação de uma microesfera com uma solução aquosa
25 contendo pelo menos um metal pesado, a referida microesfera contendo pelo menos um polissacarídeo de origem biológica e pelo menos um mineral pertencente ao grupo das apatitas,.

17. Processo de remoção, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo metal pesado ser escolhido do grupo que compreende metais divalentes
30 e/ou trivalentes.

18. Processo de remoção, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo metal pesado ser escolhido do grupo que compreende Al^{+3} e/ou Pb^{+2} .

19. Processo de remoção, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo polissacarídeo de origem biológica ser escolhido do grupo que compreende alginato, derivados de alginato, pectina, derivados de pectina, dextrina, derivados de dextrina, quitosana, derivados de quitosana e mistura dos mesmos.

20. Processo de remoção, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo polissacarídeo de origem biológica ser alginato.

21. Processo de remoção, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo mineral pertencente ao grupo das apatitas ser escolhido do grupo que compreende hidroxiapatita, carbonato-apatita, fluoro-apatita, cloro-apatita e mistura dos mesmos.

22. Processo de remoção, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo mineral pertencente ao grupo das apatitas ser hidroxiapatita.

23. Processo de remoção, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pela hidroxiapatita possuir razão molar Ca:P de 1,5 a 1,7.

24. Processo de remoção, de acordo com as reivindicações 19 a 23, **caracterizado** pela microesfera possuir diâmetro de 250 μm a 2500 μm .

25. Processo de remoção, de acordo com as reivindicações 16 a 24, **caracterizado** por possuir uma etapa adicional de remoção das microesferas da solução aquosa.

26. Processo de remoção, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pela solução aquosa ser o suco gástrico.

Figuras

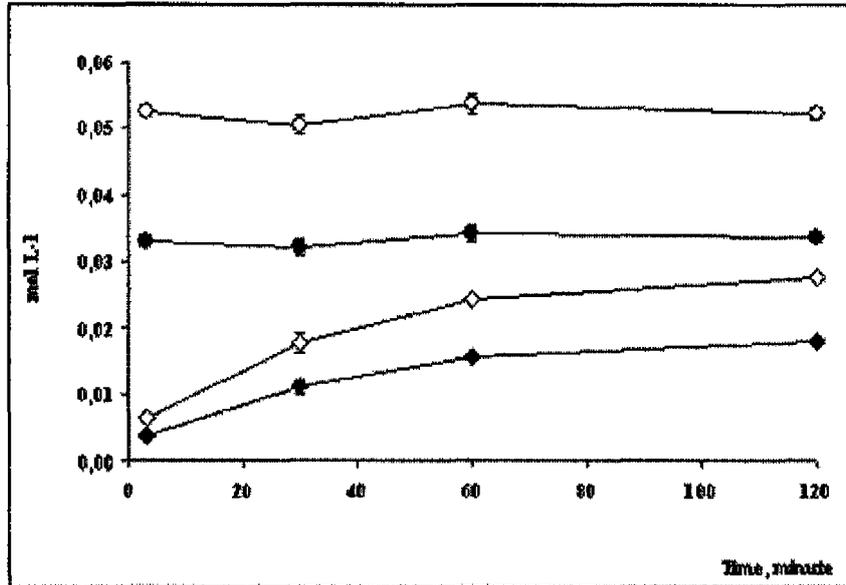


FIGURA 1

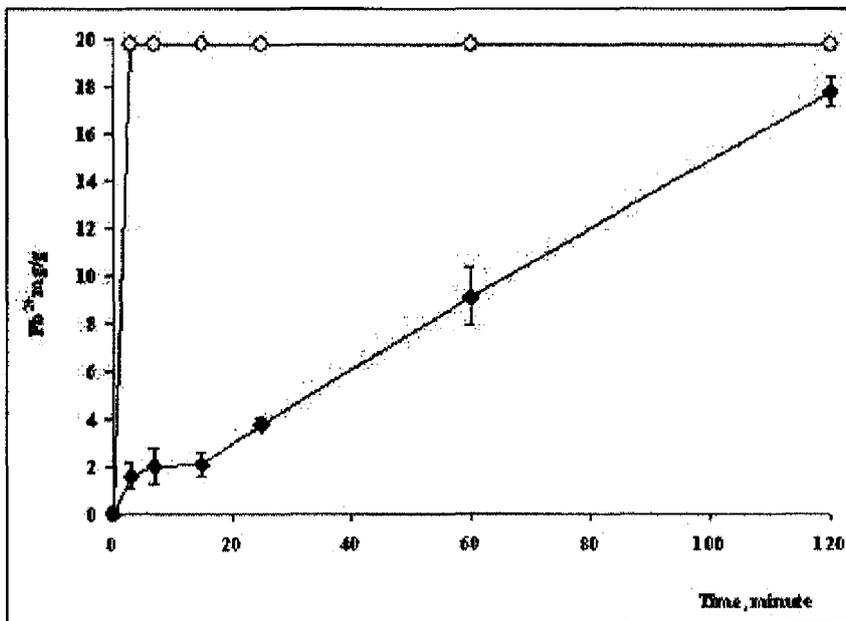


FIGURA 2

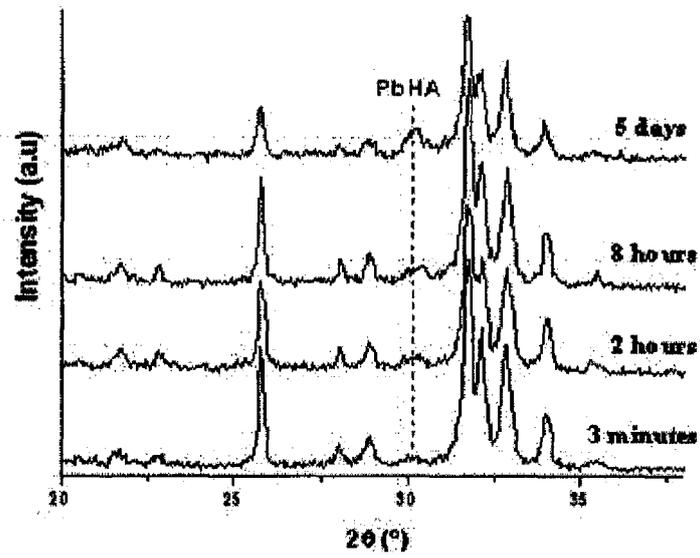


FIGURA 3

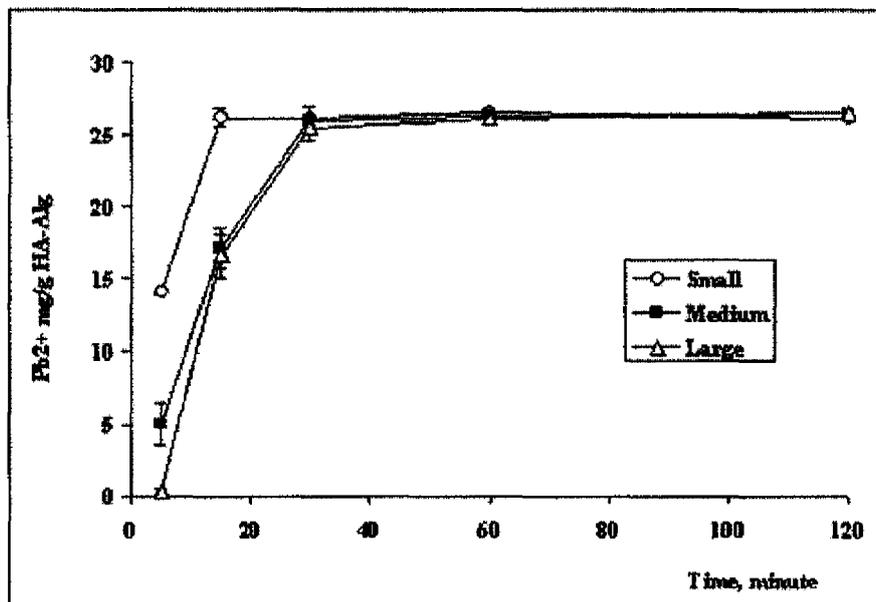
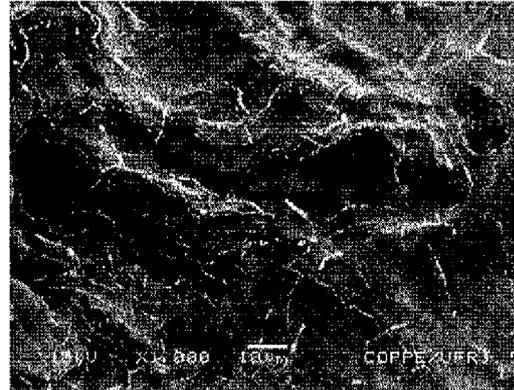


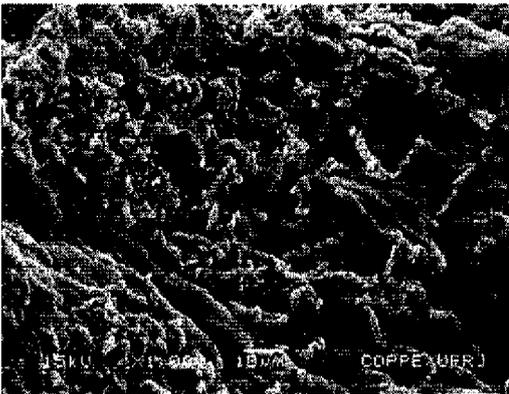
FIGURA 4



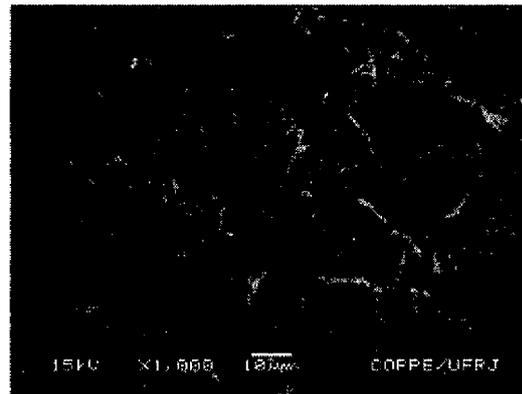
a)



b)



c)



d)

FIGURA 5

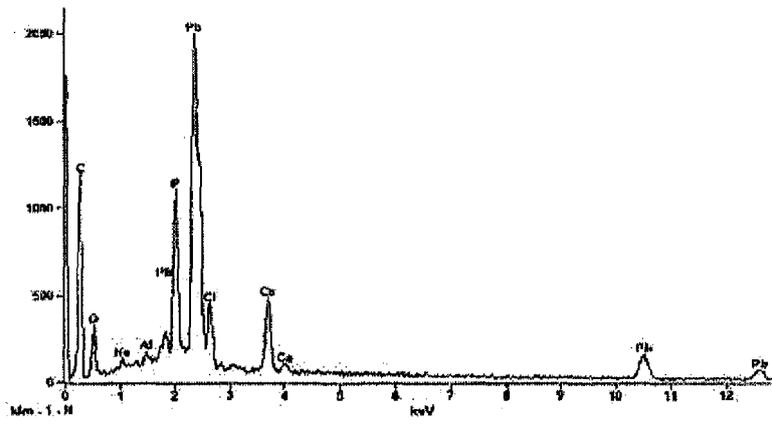


FIGURA 6a

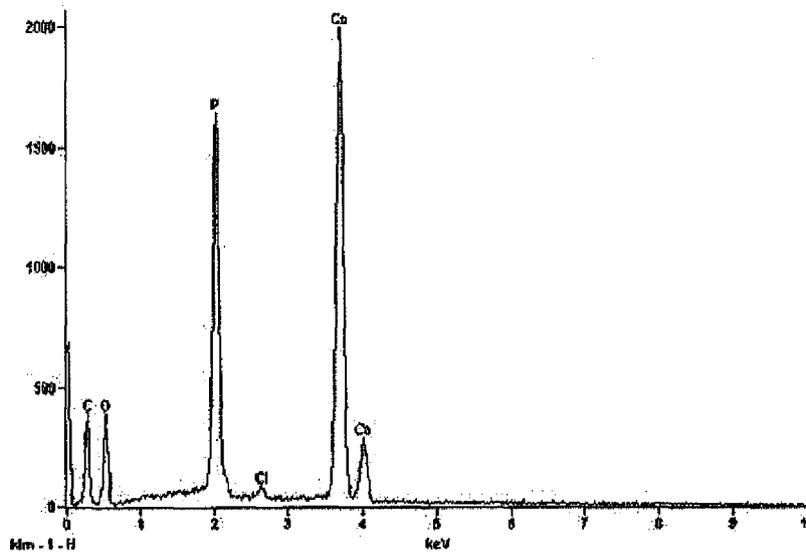
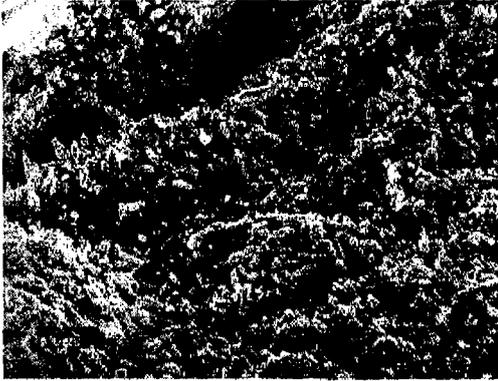
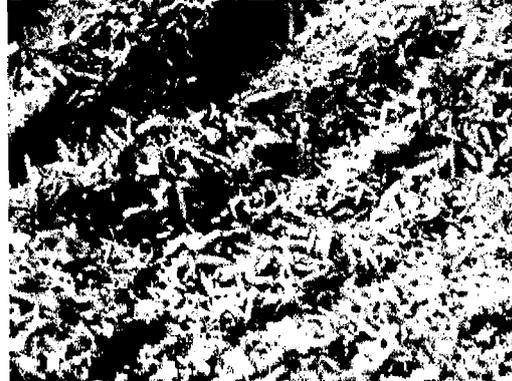


FIGURA 6b



a)



b)

FIGURAS 7a e 7b



c)



d)

FIGURAS 7c e 7d

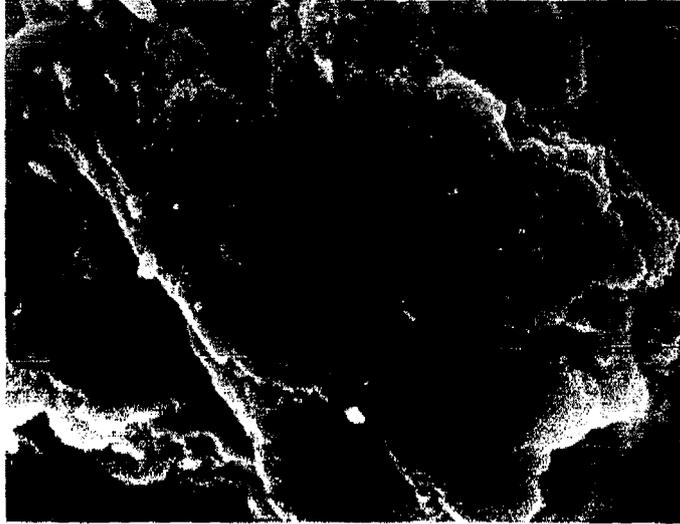


FIGURA 8a

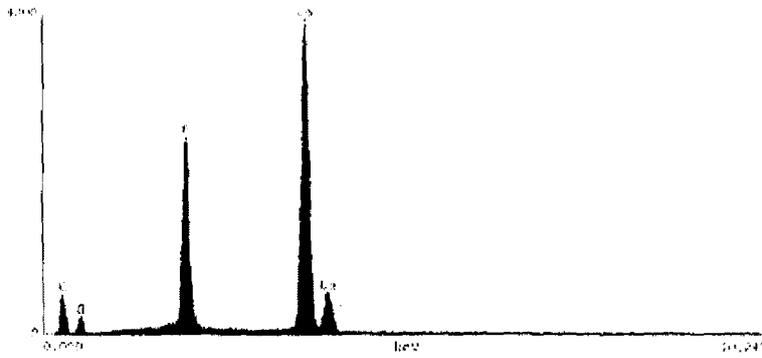


FIGURA 8b

Resumo**MICROESFERAS PARA ABSORÇÃO DE METAIS PESADOS,
PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO, E
PROCESSO DE REMOÇÃO DE METAIS PESADOS DE MEIOS AQUOSOS**

5

A presente invenção revela microesferas compostas de um polissacarídeo de origem biológica e um mineral pertencente ao grupo das apatitas, em especial o alginato e a hidroxiapatita, processos para sua preparação e seu uso na remoção de metais pesados como o chumbo em 10 soluções aquosas em qualquer faixa de pH, como, por exemplo, em reservatórios contaminados e *in vivo* através de sua ação nos fluidos gástricos e/ou entéricos.