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

(21) BR 10 2012 001577-3 A2

BR102012001577A2

(22) Data de Depósito: 24/01/2012
(43) Data da Publicação: 24/09/2013
(RPI 2229)

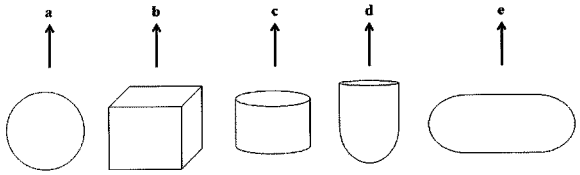
(51) Int.Cl.:
C12M 1/40
C03C 10/00
C03C 17/30
C03C 17/42
B01L 3/00

(54) Título: SUPORTE VÍTREO-CERÂMICO A PARTIR DE CINZAS VOLANTES DE CARVÃO MINERAL PARA IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E/OU MICRO-ORGANISMOS

(73) Titular(es): José Luiz de Lima Filho

(72) Inventor(es): Alessandro Victor Patrício de Albertini, Alexandre Líbanio Silva Reis, Benildo Sousa Cavada, Gustavo Alves do Nascimento, Jeckson Luiz da Silva, Jorge Luiz Martins, José Luiz de Lima Filho, Pedro José Rolim Neto, Ricardo Pires dos Santos, Valder Nogueira Freire

(57) Resumo: SUPORTE VÍTREO-CERÂMICO A PARTIR DE CINZAS VOLANTES DE CARVÃO MINERAL PARA IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E/OU MICRO-ORGANISMOS. A presente invenção refere-se a um processo de preparação de suporte vitreo-cerâmico para imobilização de biomoléculas e/ou micro-organismos, e, por conseguinte, a sua aplicação no desenvolvimento de produtos biotecnológicos.



SUPORTE VÍTREO-CERÂMICO A PARTIR DE CINZAS VOLANTES DE CARVÃO MINERAL PARA IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E/OU MICRO-ORGANISMOS

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

Esta invenção descreve o inovador processo laboratorial e industrial que envolva o uso de suporte cerâmico a partir da vitrificação das cinzas volantes de carvão mineral para a imobilização ou separação de substâncias biológicas e/ou micro-organismos que possam ser utilizadas em fins biotecnológicos de interesse comercial.

Antecedentes da Invenção

Muitos materiais e tipos de ligações químicas têm sido estudados para imobilização de biomoléculas em ampla diversidade de finalidades e que sejam viáveis a escala industrial.

As formas de imobilizar biomoléculas ou micro-organismos são através de ligação covalente e covalente cruzada (reticulação), adsorção, encapsulamento, troca iônica. Os materiais mais usados para suportes empregam-se: ágar, alginatos, quitosana, vários polímeros como de poliacrilamida, celulose, celulose substituído, pectina e também, carbono, alumina, montmorillonita, vidro poroso, cerâmica a partir de carbono mesoestruturado e membrana cerâmica. Mas, trabalhos são focados para usos de suportes de baixo custo a escala industrial, e alta resistência mecânica diante de ataques químicos e microbiológicos, e densidade compatível a aplicações em altas pressões em biorreator industrial.

Segundo a patente (US) 6,013,491 intitulada "*Fibrous cellulose support containing adhered yeast for converting sucrose to glucose and fructose*" de 11 de janeiro de 2000, descreve um material orgânico para imobilizar enzima, porém este método apresenta complicações no que diz respeito a contaminação do suporte ou o seu

empacotamento devido o tamanho, ocasionando oscilações de pressão quando usado em reator com sistema de fluxo contínuo.

A patente 5,270,177 (US) intitulada "*Method and apparatus for the production of glucose-fructose syrups from sucrose using a recombinant yeast strain*" de 14 de Dezembro de 1993, descreve um processo para imobilizar (*Saccharomyces cerevisiae*) levedura modificada geneticamente em alginato de sódio. Porém, essa patente proporciona um custo adicional ao processo ou produz compostos diferentes ao produto desejado.

Outra patente 2,005,031,006 (WO) intitulada "*Production of invert syrup from sugarcane juice using immobilized invertase*" de 29 de Setembro de 2004, descreve a utilização de invertase em grânulos de quitosana com auxílio de uma membrana de zircônio como um material inerte para aumento de sua resistência mecânica. Em sistema com biorreator batelada o processo obtido, considera-se desnecessariamente, por apenas evitar perdas de suporte no reator ou coluna durante a recirculação a partir do sistema de fluxo contínuo.

O glutaraldeído é um agente bifuncional usado para fixar, preservar os tecidos e das estruturas subcelulares nos estudos de microscopia. Também é empregado como agente esterilizante em material cirúrgico, entre outros. Ele é o composto químico mais popular para ligar biomoléculas ou micro-organismo ao suporte. Ele é empregado nas primeiras ligações citadas acima. Porém, o *N*-(p-maleimidofenil)isocinanato também pode ser usado como agente bifuncional, "*cross-linker*".

Entretanto, em materiais ricos em óxidos, por exemplo, SiO_2, inicialmente, há necessidade da modificação química (funcionalização) por intermédio da molécula 3-aminopropiltriethoxisilano, para emprego da reação amino-silano. Entretanto, outros organosilanos podem ser usados, por exemplo, 3-glicidoxipropiltrimetoxilsilano e o 3-mercaptopropiltrimetoxsilano, diante de prévia ativação do suporte para disponibilização de hidroxilas.

O insumo principal desta invenção, as cinzas volantes de carvão mineral, para a produção de suporte cerâmico para imobilização de biomoléculas e/ou micro-organismos descreve-se como material quimicamente que varia quantitativamente conforme a origem do carvão mineral, formados por SiO_2, CaO, Al_2O_3, FeO_3, MgO

(Tabela 1) e outros elementos, como: enxofre, carbono e diversos de elementos em menores concentrações. Morfologicamente, são constituídos por fases vítreas (amorfas) e cristalinas de silicatos e alumino silicatos; por pequenas partículas, geralmente cenosféricas, com dimensões menores que 0,15 mm.

Tabela 1. Composição química das cinzas volantes de carvão mineral por XRF (%).

SiO_2	FeO_3	Al_2O_3	CaO	K_2O	TiO_2	SO_3	P_2O_5	MgO	SrO
58.2	16.2	10.2	7.5	3.2	1.4	0.1	1.1	0.4	0.1

As cinzas volantes de carvão mineral são subprodutos da combustão do carvão mineral encontrados na natureza (temperatura acima 900 e 1600 °C), podendo ser obtidas em usinas termelétricas ou através do seu processamento. Geralmente representam 85 a 90 % das substâncias não combustíveis. Essas cinzas volantes de carvão mineral no fluxo de gás da chaminé, sendo coletados em precipitadores eletrostáticos, filtros mecânicos ou ainda, eliminadas na atmosfera.

Estatísticas mostram que somente nos EUA, mais de 80 milhões de toneladas de cinzas volantes são produzidas anualmente. Nas termelétricas do sul do Brasil, entre 65 e 85 % das cinzas geradas (em torno de 3 milhões de toneladas por ano) representam cinzas volantes. Geralmente, de cada 100 toneladas de carvão consumido pelas termelétricas, 42 toneladas de cinzas são geradas, das quais 70 % são as cinzas volantes. As cinzas volantes de carvão mineral são compostas de micropartículas sólidas que contêm metais pesados. Com isso, há necessidade do seu reaproveitamento ou formas especiais de acondicionamento para evitar a contaminação de lençóis freáticos. Apresentam altos teores de enxofre e ferro, potencialmente tóxicos para as plantas e ainda, possuem uma baixa resistência à decomposição, gerando problemas ecológicos quando depositados diretamente no ambiente. Devido aos problemas ambientais, baixo valor agregado e diversidade em sua composição química têm-se, nos últimos anos, buscado aplicações para as cinzas produzidas pela queima do carvão mineral resultando no uso como fertilizantes, na fabricação de cimento e concreto, cerâmicas convencionais, vítreo-cerâmicos, filtros cerâmicos, etc.

A patente 3,783,101 (US) intitulada "*A method for improving the water-durability of controlled pore glass (CPG)-immobilized enzymes*" de 1 de janeiro de 1974, descreve a possibilidade de aumentar a durabilidade alcalina, do material rico em silício com revestimento usando óxido de zircônio antes da imobilização de enzimas na superfície do suporte. A cerâmica a partir das vitrificação ou sinterização das cinzas volantes de carvão mineral é obtida de um único insumo, por isso, não há um custo adicional com agregação de outro material. Alem disso, devido a abrangente constituição química desse insumo permite que haja uma durabilidade do suporte mesmo quando este invento for posto a ambiente pH alcalino; onde muitas enzimas exibem sua atividade máxima.

A variedade de células vivas e moléculas biologicamente e/ou micro-organismos vêm, cada vez mais, sendo utilizadas nos processos produtivos. A utilização de células de leveduras em reações fermentativas tem sido aprimorada no que diz respeito ao rendimento de produção e rapidez na obtenção dos produtos em escala industrial. No entanto o uso de células de leveduras pode trazer prejuízos no âmbito da qualidade de pureza do açúcar invertido, devido a possível presença de microrganismos selvagens e/ou de algumas formas recombinantes. A possível falha no processo de separação das células e seus produtos podem acarretar num baixo rendimento dos produtos formados, principalmente em se tratando de açúcares redutores, pois estes podem seguir pela via fermentativa e serem metabolizados até a produção de álcool.

Neste contexto, a imobilização de biomoléculas no suporte cerâmico, tais como: proteínas, enzimas, glicoproteínas, antígenos, anticorpos, DNA, RNA e micro-organismos, podem contribuir no desenvolvimento de bioprodutos para fim farmacêutico, médico, alimentício, ambiental entre outros campos biotecnológicos, além desempenhar um importante papel econômico devido à possibilidade de reutilizações, estabilidade de atividade catalítica e obtenção de produtos puros. Por exemplo, a imobilização da invertase, torna-se a forma mais eficaz e viável economicamente para produção industrial de açúcares redutores, devido à estabilidade conformacional da proteína, uso múltiplo e repetido e redução significativa na contaminação do produto. Normalmente a invertase é utilizada para inversão da sacarose em açúcares redutores (glicose e frutose em mistura equimolar), produtos bastante apreciados das indústrias de

alimentos, pois conferem um poder adoçante maior que a própria sacarose em 20%, maior retenção de água, menor efeito de cristalização e menor viscosidade.

Descrição da Invenção

A preparação do suporte cerâmico para imobilização de biomoléculas e/ou micro-organismos é desenvolvida a partir das cinzas volantes de carvão mineral, agentes ligantes ou fundentes orgânicos e/ou inorgânicos. As cinzas volantes de carvão mineral e aditivos são compactadas uniaxialmente ou isostaticamente (a frio ou a quente), extrusão ou moldagem para a formação de "corpos verdes" (cinzas volantes de carvão mineral e aditivos). Os "corpos verdes" são secados, preferencialmente a 70 °C por 12 h, e em seguida sinterizados em 1000 °C a 1200 °C de 1 a 3 h em forno tipo mufla para obtenção da cerâmica. Porém, a formação da cerâmica não se restringe apenas a essas condições citadas a cima.

Os suportes vítreo-cerâmicos em formatos e tamanhos para imobilização de biomoléculas ou micro-organismos preferencialmente segue o esquema conforme a Figura 1, onde (a) é o suporte em forma esférica (523 mm^3), (b) forma cúbica (216 mm^3), (c) forma redonda plana (cilíndrica) (125 mm^3), (d) forma com uma das extremidades cilíndrica e outra lado convexa e (e) obilongo bicôncavo.

Numa primeira modalidade preferida as biomoléculas ou micro-organismos são imobilizados no suporte cerâmico a partir de etapas que consistem na modificação química da cerâmica, permitindo a ligação das biomoléculas ou micro-organismos. A funcionalização química inicial da cerâmica dá-se através da reação de silanização em solvente apolar. Preferencialmente, pode-se usar o 3-aminopropiltrietoxisilano (3-APTES), porém, vários outros compostos ou derivados semelhantes a esse podem ser usados. A reação para funcionalização pode ser realizada na temperatura de 85 °C por 4h. Posteriormente, a cerâmica é lavada com água e seca a 100 °C. Porém, esses processos não se restringem apenas a essas condições citadas a cima.

Na cerâmica funcionalizada ou simplesmente na superfície da cerâmica silanizada está presente um grupo amínico, que numa próxima etapa é posto em contato com o grupo carbonila do glutaraldeído (agente fixador), formando assim, uma ligação alquilamina ou base de Schiff. Posteriormente, é lavado exaustivamente para retirar o

excesso do agente fixador. Contudo, o agente fixador utilizado na presente invenção não se restringe apenas ao glutaraldeído, podendo-se utilizar outros compostos orgânicos ou inorgânicos que permitam a ligação entre a cerâmica funcionalizada e as biomoléculas.

A reação para ligação das biomoléculas e/ou micro-organismos com a cerâmica ativada com o agente fixador dá-se em solução ácida ou básica por um período pré-estabelecido através da ligação entre o grupo carbonila disponível do glutaraldeído. Após isto, a biomolécula (proteínas, enzima, RNA, DNA, anticorpos entre outros) ou micro-organismo é ligado ao complexo com o agente fixador em solução tampão sob agitação em temperatura e tempo preestabelecidos, à medida que se identifique a ligação da biomolécula ou micro-organismo ao complexo cerâmico.

A Figura 2 mostra as diferentes etapas de processamento do suporte cerâmico para imobilização de biomoléculas, sendo possível a caracterização da cerâmica (A), cerâmica funcionalizada com 3-APTES (B); cerâmica funcionalizada com 3-APTES e glutaraldeído (C); cerâmica funcionalizada com 3-APTES/glutaraldeído e 2.58 mg de proteínas imobilizadas/g cerâmica (D); 5.15 mg de proteínas imobilizadas/g cerâmica (E); e 7.73 mg de proteínas imobilizadas/g cerâmica (F). Ainda na Figura 2, as cinzas volantes de carvão mineral são caracterizadas quanto a composição e estrutura através de difratometria de raios-X e medidas de densidade, umidade e porosidade. O padrão de difração de raios-X apresenta uma fase predominante com sulfato de alumínio (a), quartzo (b) e mulita (c).

A Figura 3 mostra, esquematicamente, a reação para imobilização de biomoléculas ou micro-organismos, onde (a) representa a cerâmica, (b) 3-APTES, (c) Base de Shiff, (d) agente fixador e (e) biomoléculas, ou (f) representa a cerâmica, (g) 3-APTES, (h) Base de Shiff, (i) agente fixador e (j) micro-organismos.

Numa segunda modalidade preferida as biomoléculas ou micro-organismos são imobilizadados sem necessidade da silanização ou funcionalização da cerâmica a partir do 3-APTES ou outros compostos semelhantes que permitam a modificação química. Neste caso, a cerâmica é diretamente incubada com o agente fixador, preferencialmente o glutaraldeído, e as biomoléculas ou micro-organismos em água ou solução tamponada. Isso possibilita a formação de uma grande "rede" composta do material biológico imobilizado através ligação química denominada covalente-cruzada. A Figura

4 mostra, esquematicamente, a reação para imobilização de biomoléculas ou micro-organismos sem a funcionalização da cerâmica, onde (a) representa a cerâmica, (b) agente fixador, (c) biomolécula ou micro-organismo e (d) agente fixador.

Numa terceira modalidade preferida as biomoléculas ou micro-organismos são imobilizadados diretamente no suporte cerâmico por adsorção física, segundo o qual as forças de ligação que participam são principalmente pontes de hidrogênio e Forças de van-der-Waals, ou por ligação iônica com base em forças eletrostáticas.

A Figura 5 mostra, esquematicamente, a reação para imobilização de biomoléculas ou micro-organismos diretamente na cerâmica, onde (a) representa a cerâmica e (b) as biomoléculas ou micro-organismos. E como exemplo, a Figura 6 refere-se à atividade de uma biomolécula, proteínas, enzima, invertase imobilizada em cerâmica a partir das cinzas volantes de carvão mineral com aditivos inorgânicos (sulfato de zinco) prensados uniaxialmente.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO na forma de suporte vítreo-cerâmico a partir de cinzas volantes de carvão mineral para imobilização de biomoléculas e/ou microrganismos.

2. PROCESSO na forma de suporte vítreo-cerâmico tal como descrito na reivindicação 1 caracterizado por conter cinzas volantes de carvão mineral e agente ligante ou fundente orgânico ou inorgânico.

3. PROCESSO na forma de suporte vítreo-cerâmico tal como descrito na reivindicação 2 caracterizado por ser produzido através de prensagem, sendo formado o "corpo verde" ou "corpo de prova".

4. PROCESSO na forma de suporte vítreo-cerâmico tal como descrito na reivindicação 3 caracterizado por ser produzido através de sinterização ou vitrificação.

5. PRODUTO na forma de suporte vítreo-cerâmico a partir de cinzas volantes de carvão mineral para imobilização de biomoléculas e/ou micro-organismos.

6. PRODUTO na forma de suporte vítreo-cerâmico tal como descrito na reivindicação 5 caracterizado por compreender um agente funcionalizador com função de modificação química do suporte.

7. PRODUTO na forma de suporte vítreo-cerâmico tal como descrito nas reivindicações 5 e 6 caracterizado por compreender um agente fixador no suporte funcionalizado e com função de promover ligações covalentes entre biomoléculas e/ou micro-organismos.

8. PRODUTO na forma de suporte vítreo-cerâmico tal como descrito na reivindicação 5 caracterizado por compreender um agente fixador no suporte não funcionalizado e com função de promover ligações covalentes entre biomoléculas e/ou micro-organismos.

9. PRODUTO na forma de suporte vítreo-cerâmico tal como descrito na reivindicação 5 por compreender o suporte não funcionalizado e sem agente fixador para imobilização direta de biomoléculas e/ou micro-organismos a partir de ligação por adsorção física.

10. PRODUTO na forma de suporte vítreo-cerâmico tal como descrito na reivindicação 5 por compreender o suporte não funcionalizado e sem agente fixador para imobilização direta de biomoléculas e/ou micro-organismos a partir de ligações eletrostáticas.

5

Figura 1

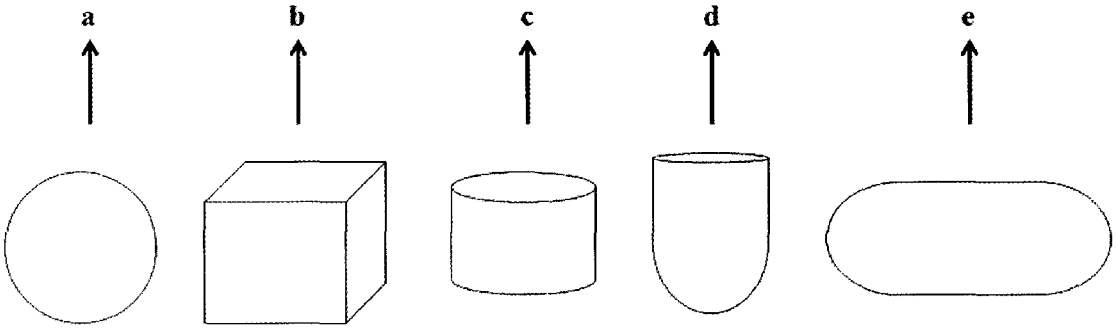


Figura 2

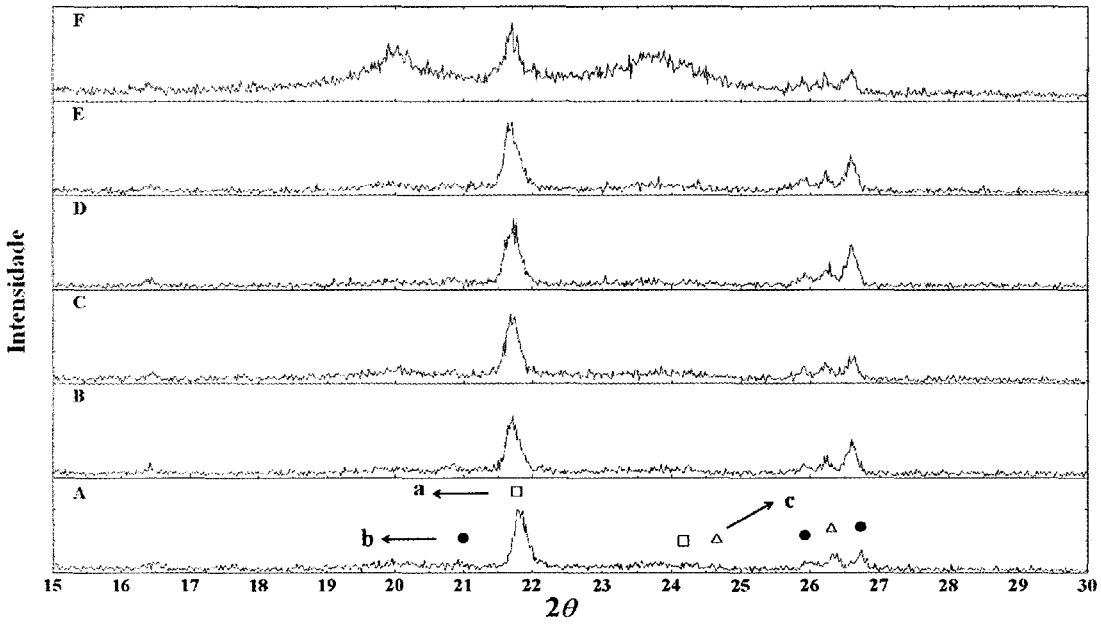

F
E
D
C
B
A
a
b
c
Intensidade
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
2θ

Figura 3

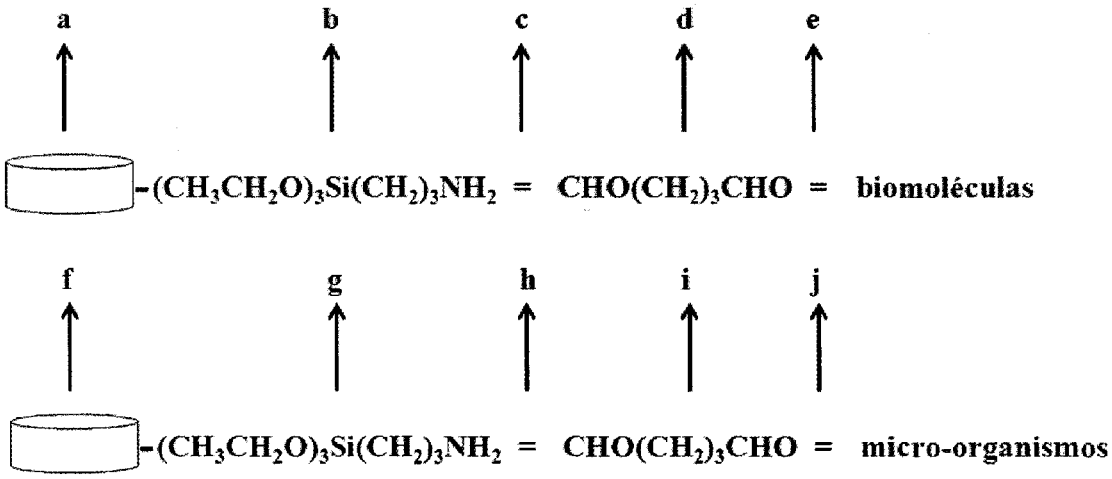

a
b
c
d
e
-(CH3CH2O)3Si(CH2)3NH2 = CHO(CH2)3CHO = biomoléculas
f
g
h
i
j
-(CH3CH2O)3Si(CH2)3NH2 = CHO(CH2)3CHO = micro-organismos

Figura 4

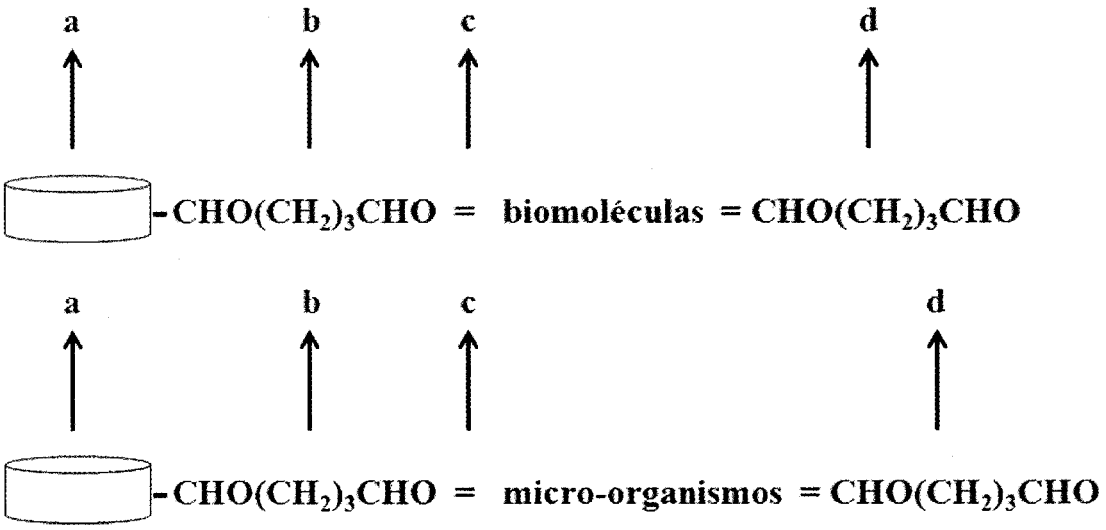

a
b
c
d
-CHO(CH2)3CHO = biomoléculas = CHO(CH2)3CHO
a
b
c
d
-CHO(CH2)3CHO = micro-organismos = CHO(CH2)3CHO

Figura 5

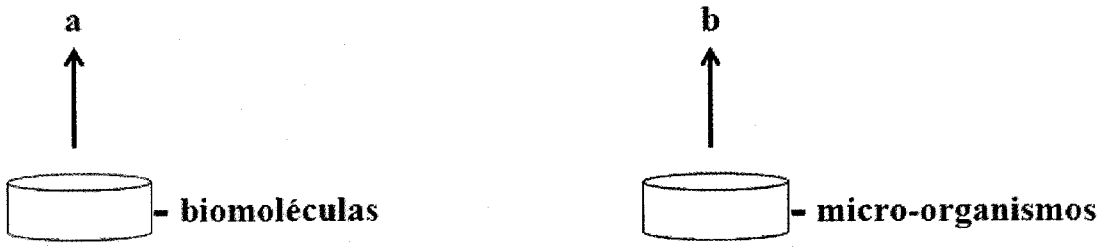
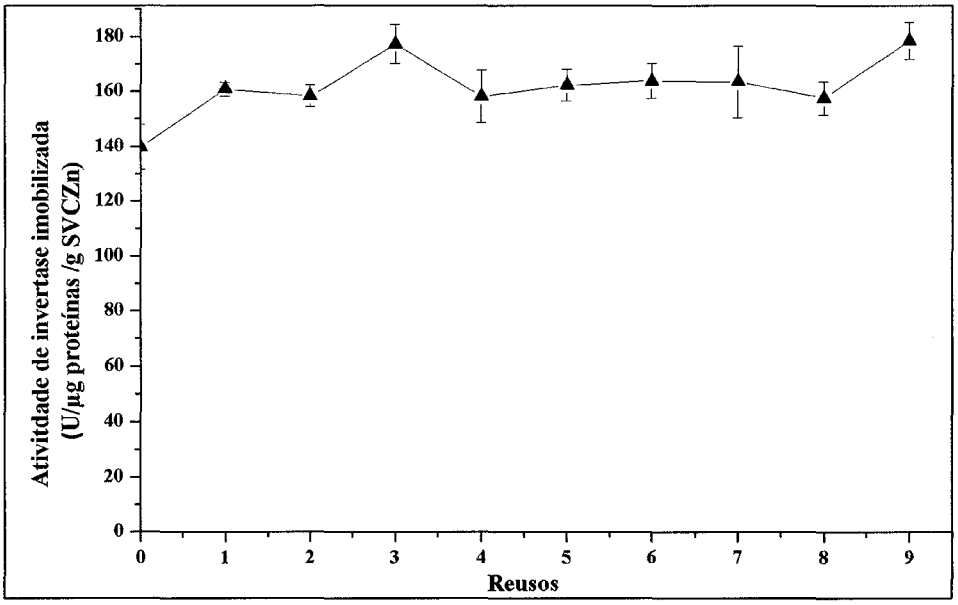


Figura 6


Atividade de invertase imobilizada
(U/µg proteínas /g SVCZn)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Reusos

RESUMO

SUPORTE VÍTREO-CERÂMICO A PARTIR DE CINZAS VOLANTES DE CARVÃO MINERAL PARA IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E/OU MICRO-ORGANISMOS. A presente invenção refere-se a um processo de preparação de suporte vítreo-cerâmico para imobilização de biomoléculas e/ou micro-organismos, e, por conseguinte, a sua aplicação no desenvolvimento de produtos biotecnológicos.