

WALTER FELIZARDO DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA CENTRIFUGAÇÃO COMO MÉTODO PARA SEPARAÇÃO
GRANULOMÉTRICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

São Paulo

2016

WALTER FELIZARDO DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA CENTRIFUGAÇÃO COMO MÉTODO PARA SEPARAÇÃO
GRANULOMÉTRICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Dr. Marcelo Martins Seckler

São Paulo

2016

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob
responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Sousa, Walter

AVALIAÇÃO DA CENTRIFUGAÇÃO COMO MÉTODO PARA SEPARAÇÃO
GRANULOMÉTRICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA / W. Sousa --versão
corr. -- São Paulo, 2016.

70 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia Química.

1.Separação 2.Centrifugação 3.Nanopartículas I.Universidade de São Paulo.
Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

AGRADECIMENTOS

Ao professor, Marcelo Martins Seckler, pela orientação e pelo constante estímulo transmitido durante todo o trabalho.

Aos familiares e amigos pelo total apoio e a todos que colaboraram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

RESUMO

Nanopartículas de prata (AgNPs) vêm ganhando grande importância na prevenção contra infecções, principalmente pela sua incorporação em dispositivos médicos, tecidos entre outros produtos relacionados. Estudos prévios indicaram que partículas de menores tamanhos têm ação biocida mais efetiva. Nesse contexto, a separação granulométrica pode ser explorada para se obter partículas com as dimensões desejadas. A centrifugação foi escolhida, entre outros métodos de separação granulométrica, por sua possibilidade de ressuspensão das AgNPs após a separação, pela facilidade do aumento de escala e baixa complexidade. Um modelo do perfil de concentração (em uma cela centrífuga) de AgNPs em função do tempo e intensidade de centrifugação foi proposto a partir da Equação de Lamm, considerando a difusividade Browniana e o coeficiente de Svedberg calculado a partir do balanço de forças. A equação foi resolvida com a solução semi-analítica proposta inicialmente por Fujita (1962) e melhorada pelos alemães Joachim Behlke e Otto Ristau (2001). O desempenho da centrifugação de AgNPs sintetizadas pelo Método Turkevich foi avaliado analisando-se as partículas sobrenadantes por DLS, UV-Vis e microscopia eletrônica e comparando com o modelo proposto. O modelo previu razoavelmente a concentração total de partículas e a sua distribuição de tamanhos em diferentes tempos de centrifugação para forças de campo baixas (força centrífuga relativa até 1480). Para maiores forças de campo, houve uma sedimentação mais acelerada que a prevista pelo modelo.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, AgNPs, centrifugação, Equação de Lamm, Turkevich, separação granulométrica, nanotecnologia, DLS.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) have gained great importance in preventing infections, especially by their incorporation into medical devices, tissues and related products. Previous studies indicated that particles of smaller sizes have more effective biocidal action. In this context, granulometric separation may be explored to deliver nanoparticles of desired size. Centrifugation was chosen, among other particle size separation methods, for their ability to resuspend the AgNPs after separation, for the ease of scale-up and low complexity. A profile concentration model (in the centrifuge cell) of AgNPs as a function of time and intensity of centrifugation has been proposed from the Lamm equation, considering the Svedberg and Brownian diffusivity coefficients calculated from a force balance. The equation was solved with the semi-analytical solution proposed initially by Fujita (1962) and improved by the Germans Joachim Behlke and Otto Ristau (2001). The centrifugation performance of AgNPs synthesized by the Turkevich method was evaluated by analyzing the supernatant particles by DLS, UV-Vis and electron microscopy and comparing to the proposed model. The model reasonably predicted the total concentration of particles and their size distribution at different centrifugation times at low field strengths (1480 RCF). For higher field strengths, the sedimentation was faster than expected by the model.

Keywords: Silver nanoparticles, AgNPs, centrifugation, Lamm equation, Turkevich, particle size separation, nanotechnology, DLS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de oxidação do citrato a dicarboxilcetona	15
Figura 2 - Comparação do mecanismo de Nucleação (volume do cristal em função do tempo) com evolução comparativa da conversão em diferentes condições. (RICHARDS et al., 2010 à esquerda e Oliveira, 2013 à direita)	16
Figura 3 - Distribuição de tamanhos por DLS (Dynamic Light Scattering) das nanopartículas de partículas sintetizadas a 90°C, pH 7 e 20 minutos de reação. (Oliveira, 2012).....	16
Figura 4 – Princípio de separação granulométrica de nanopartículas pelo método de "Field Flow Fractionation"	18
Figura 5 - Aparelho centrifugador.....	19
Figura 6 - Princípio de medição do DLS (MALVERN INSTRUMENTS).	21
Figura 7 - Distribuição de uma mesma população referente a número, volume e intensidade. (MALVERN INSTRUMENTS).....	22
Figura 8 - Balanço de Forças de uma partícula sob a ação de força externa.	26
Figura 9 - Reator em funcionamento.	31
Figura 10 - Dimensões em mm da cela centrífuga utilizada nos experimentos.....	32
Figura 11 - Distribuição da concentração radial de nanopartículas de prata com raio de 5 nm sob rotação de 7000 RPM (4500 RCF) calculada pela Equação 8. A simulação foi obtida para concentrações iniciais $C_0 = 0,998 \mu\text{g/ml}$, $T = 22^\circ \text{C}$, difusividade browniana estimada $D=9,27 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ e coeficiente de Svedberg = 141,5 S.....	35
Figura 12 – Distribuição da concentração radial calculada pela Equação 8 para nanopartículas de prata de diferentes raios ((a) 5 e (b) 15 nm) sob rotação de 5000 RPM (2320 RCF) . Concentrações iniciais $C_0 = 0,998 \mu\text{g/ml}$, $T = 22^\circ \text{C}$, difusividade browniana estimada (a) $D=9,27 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ e (b) $D=3,09 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ e coeficiente de Svedberg (a) $s = 141,5 \text{ S}$ e (b) $s=1273,7 \text{ S}$	36

Figura 13 – Distribuição da concentração radial calculada pela Equação 8 para nanopartículas de prata de raio 5 nm sob rotações de (a) 2000 RPM (370 RCF), (b) 4000 RPM (1480 RCF) e (c) 6000 RPM (3340 RCF). A simulação foi obtida para concentrações iniciais $C_0 = 0,998 \mu\text{g/ml}$, $T = 22^\circ \text{C}$, difusividade browniana estimada $D=9,27 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ e coeficiente de Svedberg $s = 141,5 \text{ S}$	38
Figura 14 - Concentração média do sobrenadante em função do tamanho para diferentes tempos de centrifugação a 4000 RPM (1480 RCF).....	43
Figura 15 - DLS dos sobrenadantes em diferentes tempos de centrifugação.....	44
Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão da solução inicial da síntese de nanopartículas de prata.....	46
Figura 17 - Espectro de absorção UV-Vis ao longo do sobrenadante em diferentes tempos de centrifugação a 5000 RPM (2320 RCF).....	47
Figura 18 - Nanopartículas de prata do sobrenadante após centrifugação.....	48
Figura 19 - Espectroscopia do Uv/Vis dos sobrenadantes centrifugados a 4000 RPM (1480RCF).....	51
Figura 20 - Da esquerda para direita, as alíquotas dos sobrenadantes após 0, 6, 12, 18, 24 e 30 minutos de centrifugação, respectivamente.	52
Figura 21 - Comparativo dos resultados de DLS (experimental) com os resultados da Tabela 8 (teórico) a 4000 RPM (1480 RCF).....	55
Figura 22 – Evolução dos resultados de DLS experimentais com intensidades proporcionais a sua concentração medida por UV-Vis centrifugadas a 4000 RPM (1480 RCF) em diferentes tempos de centrifugação.....	56
Figura 23 - Comparativo dos resultados de DLS (experimental) com os resultados teóricos a 4000 RPM (1480 RCF).	59
Figura 24 - Comparativo dos resultados de DLS (experimental) com os resultados teóricos a 5000 RPM (2320 RCF).	62
Figura 25 - Comparativo dos resultados de DLS (experimental) com os resultados teóricos a 6000 RPM (3380 RCF).	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mínima concentração inibitória de nanopartículas de prata. (MARTINÉZ-CASTAÑÓN <i>et al.</i> , 2008).....	14
Tabela 2 - Comparação dos Métodos de Separação.	19
Tabela 3 - Resultado do número de Knudsen para nanopartículas de prata a 20°C.	26
Tabela 4 - Tamanhos das partículas nos sobrenadantes por DLS para tamanho médio e desvio padrão em diferentes tempos de centrifugação a 5000 RPM (2320 RCF) e 22°C.....	39
Tabela 5 - Dados iniciais de uma simulação exemplo.....	40
Tabela 6 - Concentração inicial de cada faixa de tamanho. Para o exemplo, supõe-se que todas as faixas de tamanho têm a mesma concentração inicial.....	40
Tabela 7 - Concentração média do sobrenadante em cada faixa de tempo de centrifugação.....	41
Tabela 8 - Momentos m_0 , m_3 e m_6 de uma população inicial de nanopartículas de prata obtidos experimentalmente.	49
Tabela 9 – Simulações da distribuição granulométrica do sobrenadante em termos de concentrações ($\mu\text{g/ml}$) em diferentes tempos de centrifugação.	50
Tabela 10 - Comparativo do decaimento da concentração normalizada experimental e teórica do sobrenadante de alíquotas centrifugadas a 4000 RPM (1480 RCF).	52
Tabela 11 – Simulações de m_6 normalizados do sobrenadante para cada tempo de centrifugação.....	53
Tabela 12 - Tamanho granulométrico médio experimental e teórico baseados nos resultados de DLS centrifugados a 4000 RPM (1480 RCF).	57
Tabela 13 - Comparativo do decaimento da concentração normalizada experimental e teórica do sobrenadante de alíquotas centrifugadas a 5000 RPM (2320 RCF).	60
Tabela 14 - Tamanho granulométrico médio experimental e teórico baseados nos resultados de DLS centrifugados a 5000 RPM (2320 RCF).	62

Tabela 15- Comparativo do decaimento da concentração normalizada experimental e teórica do sobrenadante de alíquotas centrifugadas a 6000 RPM (3380 RCF).62

Tabela 16 - Tamanho granulométrico médio experimental e teórico baseados nos resultados de DLS centrifugados a 6000 RPM (3380 RCF).64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. Produtos no mercado com nanopartículas de prata.....	12
3.2. Propriedades das nanopartículas de prata.....	13
3.3. A Síntese de nanopartículas de prata	14
3.4. Revisão dos métodos de separação granulométrica de nanopartículas	17
3.5. Revisão da modelagem matemática	20
3.6. Revisão dos métodos de caracterização de nanopartículas	20
4. MODELO MATEMÁTICO PARA A SEDIMENTAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SOB AÇÃO DA FORÇA CENTRÍFUGA	25
4.1. Modelo para populações monodispersas	25
4.2. Modelo matemático para populações polidispersas.....	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1. Materiais e equipamentos	31
5.2. Procedimento para síntese das nanopartículas e centrifugação	32
5.3. Métodos de Caracterização.....	32
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1. Estudos exploratórios do modelo teórico e experimental.	34
6.2. Perfil de concentração do sobrenadante a partir do modelo teórico.	39
6.3. Resultados das caracterizações experimentais	44
6.4. Comparação do modelo frente aos resultados experimentais.....	48
7. CONCLUSÕES	65
8. NOMENCLATURA	66
9. REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

Segundo um relatório recente do The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN, 2013), o número de produtos catalogados contendo nanotecnologia cresceu de 54 em 2005 para 1628 em 2013. Nanopartículas de prata têm atraído muita atenção neste contexto, pois elas estão presentes em 383 dos produtos mencionados.

Esta atenção é devida a diversas propriedades peculiares das nanopartículas de prata. Dentre as mais importantes, podemos citar as propriedades como agente catalisador e principalmente a ação antimicrobiana. Neste último caso, as nanopartículas de prata são usadas atualmente em purificação de ar e água, produtos alimentícios, cosméticos, roupas, itens de higiene pessoal, produtos infantis, dispositivos médico-hospitalares e implantes.

Estudos anteriores apontam que a ação antimicrobiana das nanopartículas de prata é fortemente influenciada pelas características morfológicas das nanopartículas, tais como seu tamanho e formato. Foi demonstrado que partículas de menores tamanhos aumentam o poder antimicrobiano (MARTINÉZ-CASTAÑÓN *et al.*, 2008). Quanto ao formato, partículas triangulares têm um maior efeito bactericida, seguido das partículas esféricas e dos bastonetes (PAL *et al.*, 2007).

A síntese das nanopartículas deve preferencialmente ser realizada por métodos baseados em princípios da química verde, que empregam reagentes e produtos benignos para a saúde humana e o meio ambiente. Das sínteses verdes, o método de Turkevich se mostrou vantajoso por sua rapidez, custo baixo e boa reprodutibilidade (OLIVEIRA, 2012). No entanto, nas condições ótimas de síntese, as partículas resultantes são polidispersas em relação ao tamanho. Além disso, menores partículas são obtidas em condições de baixa conversão da prata iônica para coloidal e de baixa concentração de partículas. Assim sendo, nanopartículas de prata ainda mais efetivas quanto a sua ação antimicrobiana poderão ser obtidas com o desenvolvimento de processos pós-síntese que controlem melhor a concentração e tamanho das partículas. Além disso, a integração da etapa de síntese a uma etapa de separação e de um reciclo em princípio possibilitará o total aproveitamento da prata.

Esta pesquisa está centrada no desenvolvimento de uma alternativa para separação granulométrica e concentração de nanopartículas de prata produzidas pelo método de Turkevich.

Critérios como a possibilidade de aumento de escala do processo, a possibilidade de ressuspender as nanopartículas após a separação e a complexidade do método foram julgados importantes na seleção do método de separação visando ao objetivo proposto. Assim sendo, neste trabalho foi selecionado o método da centrifugação.

Nesse contexto, neste estudo propõe-se analisar a centrifugação como um potencial método para separar nanopartículas de prata por tamanho, bem como para sua concentração e subsequente troca de solvente, com o objetivo de obter populações menores e mais monodispersas de nanopartículas de prata, características estas ótimas para ação antimicrobiana.

Pode-se observar que há poucos trabalhos que envolvem a escala nanométrica nos processos de separação de Engenharia Química. Dessa forma, nesta pesquisa busca-se, também, estender o conhecimento sobre esse nano universo, trazendo uma maior sensibilidade dos parâmetros que são importantes nessa escala, em prol do seu grande potencial de uso na área médica.

2. OBJETIVO

Nesse estudo, propõe-se avaliar a centrifugação como método de separação granulométrica de nanopartículas de prata. Busca-se compreender a cinética das nanopartículas sob ação da força centrífuga e movimento browniano, bem como estabelecer parâmetros de separação a partir de modelos teóricos e análises experimentais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produtos no mercado com nanopartículas de prata

Segundo um relatório do PEN (The Project on Emerging Nanotechnologies) lançado em 2013, o número de produtos contendo nanotecnologia cresceu de 54 em 2005 para 1628 em 2013. Em outubro de 2013, dos 1628 produtos catalogados, o material mais utilizado foi a prata, em 383 produtos, seguido do titânio, em 179 produtos (PEN, 2013). A maior parte dos produtos com prata busca utilizar os efeitos bactericidas das nanopartículas. Dentre os produtos catalogados encontramos: placa para cortar alimentos, desodorantes, sprays antimicrobianos, desinfetantes, secadores de cabelo, mordedores para bebês, esparadrapo, preservativos, lubrificante íntimo com espermicida, sabonetes, filtro de ar condicionado, "spray" nasal, desinfetantes para limpeza doméstica, cosméticos, limpadores de dentaduras, equipamentos de informática e telefones celulares com revestimento de nanopartículas de prata, luvas para limpeza doméstica, palmilhas de calçados, escova de dente, detergentes, tecidos para usos hospitalares, chupetas, diversos tipos de roupas e dispositivos hospitalares.

Dentre os dispositivos médico-hospitalares mais utilizados, encontram-se os cateteres venosos, que são empregados em pacientes para administrar fluidos, hemoderivados e nutrição parenteral. Sabe-se que o uso desses dispositivos está associado à maioria dos casos de infecção da corrente sanguínea. Segundo um levantamento, somente nos Estados Unidos, dos 5 milhões de pacientes cateterizados anualmente, cerca de 400.000 (ou 8%) desenvolvem infecção, aumentando em média 6,5 dias de internação em unidades de terapia intensiva, a um custo aproximado de US\$29.000,00 por paciente (MERMEL et al., 2001). Dos métodos para se evitar essas infecções, um muito promissor é o uso de cateteres revestidos de nanopartículas de prata.

Recentemente, em 2014, para eliminar bactérias e fungos que se acumulam em escovas de dente, fios dentais e higienizadores de língua, uma empresa brasileira lançou uma linha de produtos, como suportes e estojos, com nanoestruturas de prata incorporadas à matéria-prima. Segundo a empresa, a prata nanoestruturada incorporada a uma cerâmica e posteriormente adicionada ao plástico consegue

reduzir até 99% das bactérias da superfície dos produtos (Revista Pesquisa Fapesp, 2014).

3.2. Propriedades das nanopartículas de prata

A ação antimicrobiana das nanopartículas de prata vem ganhando particular importância por ser muito mais efetiva em termos de concentração mínima inibitória do que seus homólogos iônicos (FURNO, 2004), de forma que sua incorporação em dispositivos médicos, tecidos e outros produtos relacionados à saúde tem possibilitado um maior controle preventivo contra infecções. Acredita-se que os microorganismos são menos propensos a desenvolver resistência às nanopartículas de prata em comparação aos antibióticos convencionais, isso ocorre porque metais em escala nanométrica atuam em diversos estágios vitais de bactérias e vírus (PAL *et al.*, 2007), requerendo diversas mutações consecutivas para o desenvolvimento de resistência sobre eles.

A propriedade antimicrobiana da prata já é conhecida desde os tempos mais primórdios, apesar disso os mecanismos de ação correspondentes a esta atividade ainda não foram completamente esclarecidos. Marini *et al.* 2007 apoiam a ideia que as espécies de prata liberam íons Ag^+ que interagem com grupos Tiol nas proteínas das bactérias, afetando a replicação de seu DNA. Também já foi reportado que íons Ag^+ interagem com enzimas da cadeia respiratória, como NADH desidrogenase, atrapalhando a síntese de ATP (adenosina trifosfato). Marambio-Jones and Hoek, 2010 relatam que as nanopartículas podem causar dano direto ou colapsar a força próton-motiva da membrana celular das bactérias. Há ainda autores que argumentam que a prata iônica liberada da superfície das nanopartículas de prata é responsável por sua propriedade bactericida.

Estudos importantes correlacionam a eficiência da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata com sua estrutura cristalográfica, razão superfície-volume, tamanho de partícula, formato da partícula, presença de estabilizadores e formas iônicas dos sais de prata (BAKER, 2005). Quanto ao tamanho, em testes de concentração mínima inibitória (concentrações mínimas nas quais as nanopartículas são capazes de inibir o crescimento de um microorganismo, ou seja, quanto menores essas concentrações, mais eficientes serão essas partículas) revelam que partículas menores são mais eficazes. Um exemplo é mostrado na Tabela 1, na qual

nanopartículas de menores tamanhos apresentaram melhores resultados antibacterianos contra as bactérias das espécies *E. Coli* e *S. Aureus*. Estas duas bactérias são comumente escolhidas por ser uma bactéria gram negativa e outra gram positiva, respectivamente. Possivelmente, as menores partículas, com dimensões de 7 nm, poderiam mais facilmente atingir o núcleo da bactéria.

Tabela 1 - Mínima concentração inibitória de nanopartículas de prata. (MARTINÉZ-CASTAÑÓN *et al.*, 2008)

Amostra	Mínima concentração inibitória (µg/mL)	
	Bactéria	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
7-nm Nanopartículas de Prata	6,25	7,5
29-nm Nanopartículas de Prata	13,02	16,67
89-nm Nanopartículas de Prata	11,79	33,71

3.3. A Síntese de nanopartículas de prata

A síntese de nanopartículas por redução química com citrato em meio aquoso foi proposta inicialmente por Turkevich em 1951 (Turkevich *et al.*, 1951) para nanopartículas de ouro. Em 1982, esse método foi adaptado por Lee e Meisel para a síntese de nanopartículas de prata (Lee e Meisel, 1982).

O método consiste em aquecer uma solução de nitrato de prata até a ebulição, e adicionar uma solução contendo citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7$). O citrato de sódio se oxida, formando dicarboxilcetona e liberando elétrons que reduzem os íons de prata. A Figura 1 mostra a reação de oxidação do ácido cítrico. Embora haja formação de íons H^+ , o pH do meio reacional não muda muito, pois as concentrações são baixas. A variação de pH pode ser de, no máximo, 0,5 (Jiang *et al.*, 2009).

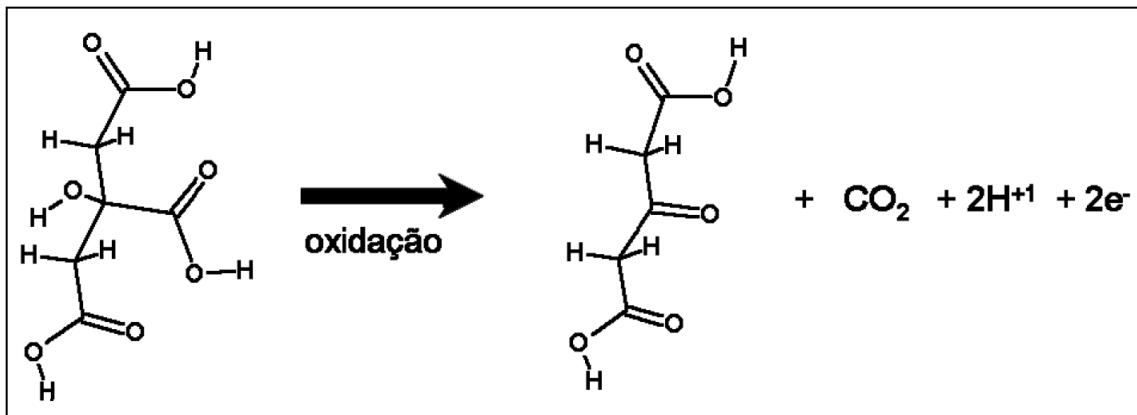


Figura 1 - Reação de oxidação do citrato a dicarboxilcetona

Esse método de síntese foi selecionado por diversas vantagens como sua rapidez, custo baixo, reprodutibilidade boa, mas principalmente por se enquadrar nos “princípios da química verde”, que utilizam reagentes não perigosos, não tóxicos ou pouco tóxicos para a saúde humana e o meio ambiente, além de não gerar produtos de reação perigosos ou tóxicos (DAHL et al., 2007). Uma revisão extensa sobre os diferentes métodos de síntese de nanopartículas foi realizada por Oliveira (2012).

Em pesquisas anteriores, Oliveira estudou como nanopartículas de prata se desenvolvem ao longo do tempo durante sua síntese por redução do nitrato de prata, usando citrato de sódio como agente redutor e estabilizante (Oliveira, 2012). Foram analisadas as características morfológicas das nanopartículas, como seu tamanho, forma e grau de aglomeração. Também foi estudado o desenvolvimento da reação, em termos da conversão de prata iônica a metálica ao longo do tempo, bem como a relação entre conversão e a absorvância no espectro ultra-violeta e visível. Estes estudos foram realizados em diferentes valores de pH e temperatura de reação.

A partir dessas informações, foi possível selecionar as condições de síntese adequadas, em termos de temperatura, pH e tempo de reação, para se obter nanopartículas com tamanhos diferentes. Conforme ilustrado na Figura 2, comparando-se o mecanismo de nucleação e crescimento com a evolução comparativa da conversão em diferentes condições de síntese, observa-se que as menores partículas são formadas no começo da conversão, quando ainda nem toda a prata iônica foi convertida para prata metálica.

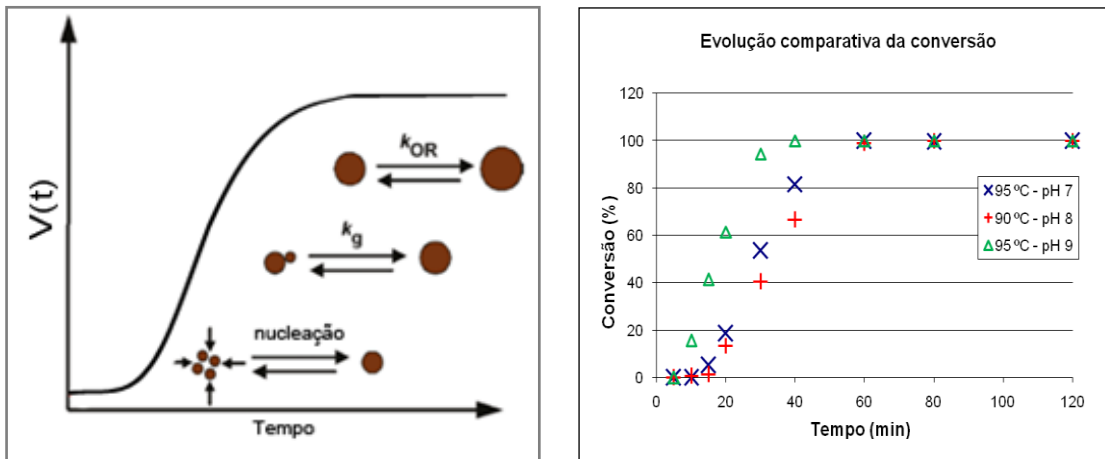


Figura 2 - Comparação do mecanismo de Nucleação (volume do cristal em função do tempo) com evolução comparativa da conversão em diferentes condições.

(RICHARDS et al., 2010 à esquerda e Oliveira, 2013 à direita)

A distribuição de tamanhos de nanopartículas de prata obtidas na fase inicial de uma síntese, onde são formadas as menores partículas, pode ser observada na Figura 3. Pode-se constatar que a população de nanopartículas de prata formada nessa etapa é bastante polidispersa em relação ao tamanho (3 a 70 nm), justificando a necessidade de uma etapa de processos pós-síntese que controle melhor a concentração e tamanho das partículas.

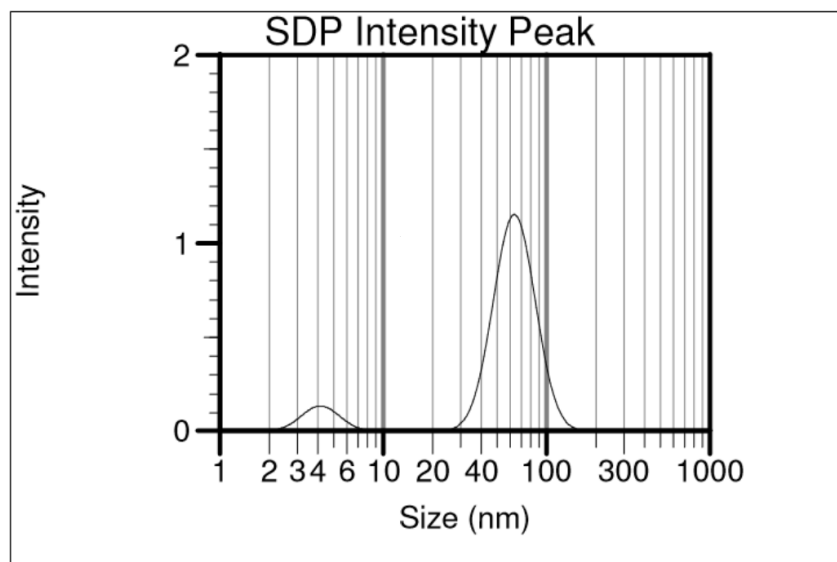


Figura 3 - Distribuição de tamanhos por DLS (Dynamic Light Scattering) das nanopartículas de partículas sintetizadas a 90°C, pH 7 e 20 minutos de reação. (Oliveira, 2012)

3.4. Revisão dos métodos de separação granulométrica de nanopartículas

Parte importante do escopo dessa pesquisa foi avaliar criticamente métodos alternativos para separação granulométrica de nanopartículas de prata, bem como para sua concentração, com o objetivo de se obter populações mais monodispersas de nanopartículas de prata, tendo em vista que estas características são consideradas ótimas para ação antimicrobiana.

Em revisão na literatura, observou-se que muitos dos processos utilizados para separação de nanopartículas são essencialmente métodos analíticos ou foram adaptados de outros processos da área biotecnológica como, por exemplo, separação de proteínas ou macromoléculas. A seguir uma breve descrição sobre os princípios dos processos de separação granulométricas revisados, bem como suas vantagens e desvantagens para objetivo em questão. Foram revisados quatro métodos: Eletroforese, Métodos Cromatográficos, "Field Flow Fractionation" e Centrifugação.

A eletroforese é uma técnica de separação de nanopartículas baseada principalmente no tamanho, forma e carga superficial da partícula (KUMAR et. al., 2010). Basicamente, o movimento de partículas dispersas num meio conveniente é promovido pela aplicação de um campo elétrico uniforme. O meio pode ser um gel, um capilar, entre outros. Partículas de tamanhos diferentes movem-se sobre o gel com velocidade diferenciada, pois têm diferentes razões de carga-tamanho. Esta técnica possui vantagens como boa resolução na separação e prevenção da agregação das partículas, possibilitando sua ressuspensão após a separação. Por outro lado, é uma técnica bastante laboriosa e essencialmente analítica, ou seja, é limitada ao processamento de quantidades muito pequenas de dispersão de nanopartículas.

Métodos cromatográficos também têm sido empregados na separação granulométrica de nanopartículas, tais como cromatografia hidrodinâmica, cromatografia contra-corrente e cromatografia por exclusão de tamanho. Elas diferem principalmente quanto à fase estacionária empregada (diferentes tipos de recheio, por exemplo) e ao fluxo (McGOWAN et al., 1982). Apesar de ser uma técnica de média complexidade, ela é essencialmente analítica e não permite a ressuspensão das partículas após a separação.

"Field Flow Fractionation" é uma técnica de separação onde um campo externo é aplicado perpendicularmente a um fluxo de uma suspensão que escoar no interior de um canal longo e estreito, causando separação das partículas presentes devido à diferença de mobilidade causada pela força exercida pelo campo (Figura 4) (WILLIAMS et al. 2011). Apesar do seu bom poder de resolução, e possibilidade de ressuspensão das partículas, esta é uma técnica bastante laboriosa. Para chegar a condições perfeitas e boa eficiência na separação, uma série de parâmetros devem se otimizados, incluindo fluido de transporte, membranas, dimensões dos canais e intensidade do campo externo.

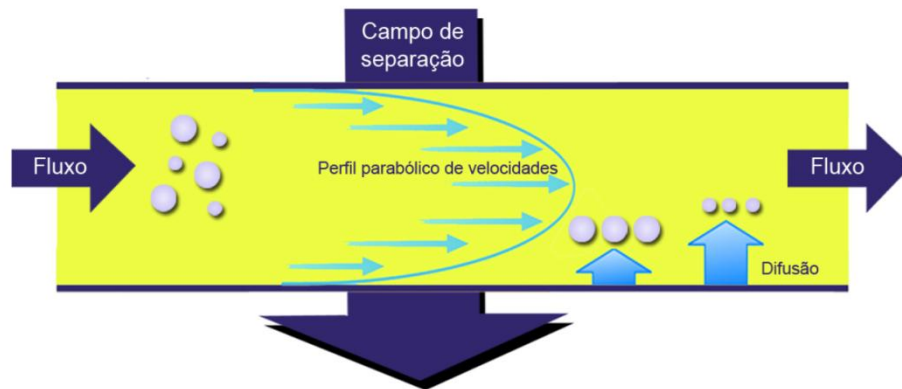


Figura 4 – Princípio de separação granulométrica de nanopartículas pelo método de "Field Flow Fractionation"

Por último a centrifugação (Figura 5), um processo em que uma solução é submetida a um campo gravitacional a fim de se promover a separação dos componentes baseado nos seus coeficientes de sedimentação. Este coeficiente é função de propriedades como tamanho, formato e densidade das partículas. Desta forma, as partículas se depositam sob a ação da força centrífuga com diferentes velocidades promovendo a separação das nanopartículas. Esse método conta com a vantagem de também separar por formato e possibilidade de aumento de escala.



Figura 5 - Aparelho centrifugador

Critérios como a possibilidade de aumento de escala do processo, a possibilidade de ressuspender as nanopartículas após a separação e a baixa complexidade do método (assinalados na Tabela 2 como + quando possíveis e - quando não) foram julgados importantes na seleção do método visando o objetivo proposto. Assim sendo, neste trabalho foi selecionado o método da centrifugação.

Tabela 2 - Comparação dos Métodos de Separação.

Método de Separação	Separação por formato	Ressuspensão	Aumento de Escala	Complexidade
Eletroforese	+	+	-	Alta
“Field Flow Fractionation”	-	+	+	Alta
Métodos Cromatográficos	-	-	-	Média
Centrifugação	+	+	+	Média

3.5. Revisão da modelagem matemática

A modelagem matemática teve como base diversas teorias aplicadas em fundamentos de sistemas particulados e dinâmica da partícula em aerossóis. Como se tratam de nanopartículas, o tipo de abordagem (tratar o sistema como contínuo ou discreto) deve ser definido a partir do adimensional de Knudsen (SEINFELD, 2006). A partir daí, realiza-se um balanço diferencial mássico de um sistema particulado sedimentando em um meio fluido considerando a difusividade browniana e um campo externo (Equação de Lamm), no caso em questão, esse campo é a centrífuga (FRIEDLANDER, 2000).

Soluções analíticas fechadas para a equação do transporte de Lamm não são disponíveis dentro das condições de contorno requeridas (BEHLKE, 1997). No entanto, nos anos sessenta, Fujita (1962) desenvolveu uma solução semi-analítica aproximada dentro das condições de contorno requeridas e em 2001, os alemães, Joachim Behlke e Otto Ristau, propuseram uma modificação na solução originalmente proposta por Fujita, a qual levou a coeficientes de sedimentação e difusão mais corretos quando comparados com o anterior. Todos os adimensionais e equações citadas serão apresentadas no item 4 adiante.

3.6. Revisão dos métodos de caracterização de nanopartículas

3.6.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (DLS do inglês, “dynamic light scattering”) é uma técnica para determinar a distribuição de tamanhos de partículas, a qual é baseada no espalhamento dinâmico de luz. O espalhamento de luz é uma consequência da interação da luz com o campo elétrico de pequenas partículas ou moléculas, na qual um fóton incidente induz um dipolo oscilante na nuvem de elétrons das nanopartículas, que irradia energia em todas as direções. Pode-se resumir o princípio da técnica nos três itens a seguir:

- Quando a luz atinge pequenas partículas, ela se dispersa em todas as direções, sem perda ou ganho de energia. Com um laser como fonte de luz, observa-se uma flutuação na intensidade do espalhamento que varia em função do tempo.

- Flutuações ocorrem, pois as nanopartículas apresentam movimento aleatório (Movimento Browniano). A posição das partículas na suspensão está constantemente mudando com o tempo.

- Essa luz difusa sofre interferência construtiva e destrutiva em torno das partículas. Pela aplicação de algoritmos é possível associar essa variação de intensidade de espalhamento de luz em função do tempo ao tamanho das partículas dispersas em suspensão. A Figura 6 ilustra resumidamente o princípio descrito.

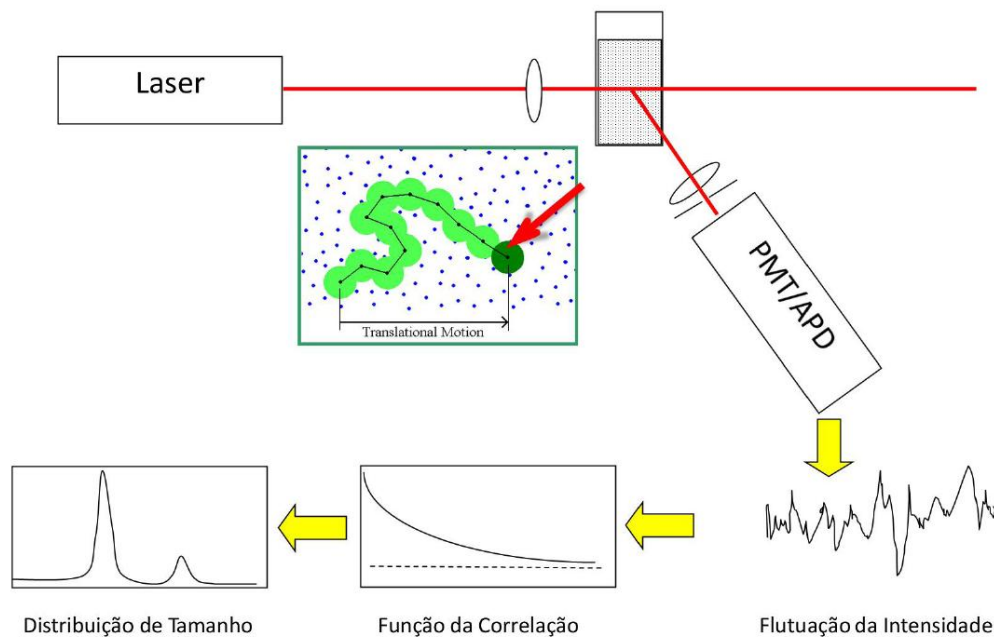


Figura 6 - Princípio de medição do DLS (MALVERN INSTRUMENTS).

Sabe-se que o método DLS possui algumas desvantagens que são inerentes aos princípios da técnica. O tamanho da partícula é determinado a partir das oscilações da intensidade do espalhamento de luz devido ao movimento browniano das partículas. O fato do espalhamento de luz ser proporcional à sexta potência do diâmetro da partícula torna esta técnica muito sensível à presença de partículas grandes. Esta pode ser uma vantagem se o objetivo for detectar pequenas quantidades de partículas grandes, mas pode ser uma grande desvantagem para a determinação precisa da distribuição de tamanhos numa população. Partículas de poeira ou pequenas quantidades de agregados podem impedir a determinação do tamanho se o componente principal apresentar um tamanho nitidamente menor.

Nesse contexto, técnicas de caracterização complementares devem ser realizadas para uma mais precisa avaliação.

Usualmente os resultados experimentais são apresentados na forma de intensidade de espalhamento de luz, de forma que a transposição para tamanho deve levar em conta esta sexta potência. Uma maneira simples de entender a relação entre distribuições granulométricas baseadas em intensidade, volume e número é considerar uma amostra que contenha apenas duas populações com tamanhos uniformes, por exemplo 5 e 50 nm, sendo que as duas populações são presentes em igual número de partículas. O primeiro gráfico da Figura 7 (MALVERN INSTRUMENTS) mostra a distribuição granulométrica em base numérica. Conforme esperado, os dois picos possuem o mesmo tamanho (1:1), uma vez que há o mesmo número de partículas. O segundo gráfico mostra a distribuição volumétrica. A área do pico das partículas de 50 nm é 1000 vezes maior em relação ao pico das partículas de 5 nm (razão 1:1000). Isto se deve ao fato do volume de uma partícula de 50 nm ser 1000 vezes maior do que uma partícula de 5nm. O terceiro gráfico mostra a distribuição de intensidade. A área do pico das partículas de 50 nm é agora 10^6 vezes maior do que o pico de 5 nm (razão 1:10⁶).

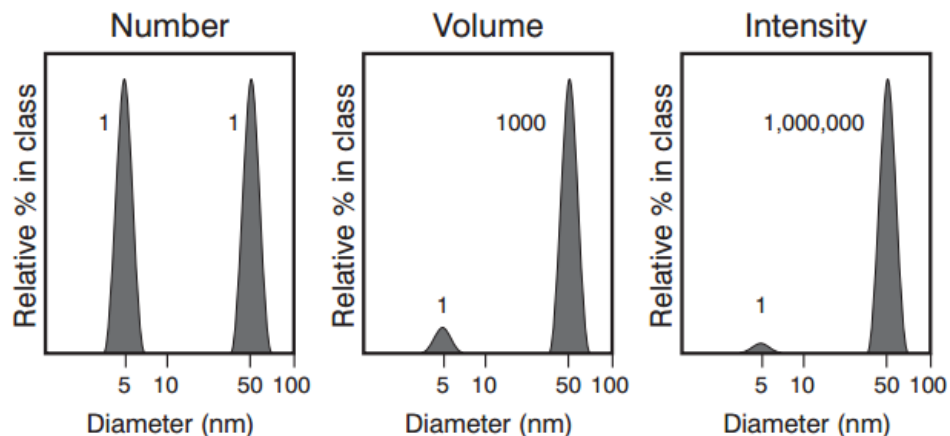


Figura 7 - Distribuição de uma mesma população referente a número, volume e intensidade. (MALVERN INSTRUMENTS).

3.6.2 Velocimetria de nanopartícula (NTA)

A velocimetria de nanopartículas (do inglês, “nanoparticle tracking analysis” – NTA) é um sistema para caracterização de tamanho de partículas de 30 a 1000 nm, com um limite menor de detecção dependendo do índice refrativo da nanopartícula. A técnica

combina microscopia de espalhamento de luz a laser com uma câmera de dispositivo de carga acoplada, que permite a visualização e gravação do movimento das nanopartículas em solução. O software do NTA então, por análise de imagem, é capaz de identificar e rastrear individualmente as nanopartículas ao se deslocarem em movimento Browniano e relacionar o movimento ao tamanho da partícula de acordo com a fórmula derivada da Equação 9 de Stokes-Einstein (FILIPE, V. et al., 2010).

$$\overline{(x, y)^2} = \frac{2k_B T}{3r_h \pi \mu} \quad (9)$$

Onde K_B é a constante de Boltzmann e $\overline{(x, y)^2}$ é a média quadrática da velocidade uma partícula à temperatura T , num meio de viscosidade μ e com raio hidrodinâmico r_h .

A NTA é uma técnica mais laboriosa e requer uma maior habilidade operacional no ajuste de todos os parâmetros do software, mas certamente possui algumas vantagens sobre o DLS. O NTA permite a visualização da amostra, oferece uma aproximação da concentração de partículas e obtém informação baseada no movimento browniano de partículas individuais. NTA tem boa precisão para medir o tamanho de amostras mono e polidispersas, diferente do DLS que não apresenta boa resolução para populações polidispersas. Porém há de se ressaltar a limitação do tamanho mínimo de partículas detectado pela técnica (por volta de 30 nm) e que o sistema em estudo possui partículas menores que esse limite.

3.6.3 Potencial zeta

O Pontencial Zeta é uma medida da magnitude da carga eletrostática de repulsão/atração entre partículas dispersas em solução, e é um parâmetro fundamental no estudo da estabilidade das dispersões. Sua medição explica dispersão, floculação ou agregação (ZHANG, Y. et al., 2008).

3.6.4 Espectroscopia no UV/Vis

A absorção de radiação eletromagnética da região ultravioleta (UV) (100-400 nm) e visível (Vis) (400-800 nm) por parte das moléculas, átomos ou íons está normalmente associada a transições eletrônicas. Estas ocorrem quando, por interação da radiação eletromagnética com o meio absorvente, um elétron é

promovido de um estado eletrônico de baixa energia para outro de energia mais elevada.

A quantidade de luz absorvida quando um feixe de radiação monocromático atravessa o meio absorvente depende da concentração, do coeficiente de absorção molar e do percurso óptico da radiação. O estudo de sua variação com a concentração permite: determinação quantitativa de um grande número de substâncias químicas e biológicas, estudo cinético de reações em soluções, determinação de curvas de titulação entre outras aplicações.

Sabe-se também que comprimento de onda onde ocorre o máximo de absorção no espectro UV-VIS de soluções coloidais fornece informações sobre o tamanho médio das partículas, enquanto que a largura da banda de absorção na metade da altura relaciona-se à dispersão dos tamanhos das partículas (LEOPOLD; LENDL, 2003).

Oliveira (2013) demonstrou que é possível estabelecer uma relação direta entre os parâmetros de absorbância e de concentração de nanopartículas de prata em solução.

4. MODELO MATEMÁTICO PARA A SEDIMENTAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SOB AÇÃO DA FORÇA CENTRÍFUGA

4.1. Modelo para populações monodispersas

Escolhido o método da centrifugação, algumas questões importantes são levantadas. Centrífugas comuns são capazes de sedimentar nanopartículas? Quanto a difusividade browniana e a aceleração centrífuga influenciam na separação? Quanto tempo e intensidade de centrifugação serão necessários na separação? Qual a taxa de sedimentação por faixa de tamanho? Para responder a essas perguntas, primeiramente é estudado o comportamento dinâmico das nanopartículas sob a ação da força centrífuga.

A seguir, definido o tipo de abordagem e premissas, a sedimentação de nanopartículas de prata em solução aquosa sob a ação da força centrífuga é analisada teoricamente a partir da Equação de Lamm, considerando a difusividade Browniana e o coeficiente de Svedberg calculado a partir do balanço de forças na partícula. Com uma solução semi-analítica primeiramente proposta por Fujita (1962) e posteriormente melhorada pelos alemães Joachim Behlke e Otto Ristau (2001), foi possível estabelecer parâmetros do processo de separação como velocidade de rotação e tempo de centrifugação.

4.1.1. Abordagem e Premissas

Foi estimado o número Knudsen para um corpo (no caso em pauta a nanopartícula de prata) num meio fluido, um adimensional definido como a razão entre o comprimento do caminho livre médio do corpo (HINDS, 1999) e uma escala de comprimento fisicamente representativa para o corpo. Esta escala de comprimento pode ser, por exemplo, o raio do corpo no fluido. Este adimensional guia o tipo de abordagem dada ao problema: se podemos considerar o fluido a volta da partícula como meio contínuo ou se sua dimensão é tão pequena que ele deve ser tratado de forma discreta, em nível (SEINFELD, 2006). No primeiro caso, a análise do fenômeno é baseada na mecânica dos meios contínuos, equações de Navier-Stokes, funções contínuas. Já no segundo caso, emprega-se mecânica estatística, teoria cinética dos gases e funções discretas. A Tabela 3 nos mostra esses resultados estimados para nanopartículas de prata de diferentes tamanhos em meio

aquoso a temperatura ambiente (20°C):

Tabela 3 - Resultado do número de Knudsen para nanopartículas de prata a 20°C.

D_p (nm)	Kn
1	0,0113
10	0,004
100	0,0012

Onde:

$$Kn = \frac{2\lambda}{D_p} \quad \lambda = \frac{C_c}{6\mu} \sqrt{\frac{\rho k T D_p}{3}}$$

Kn - Número de Knudsen
 ρ - Densidade do Fluido
 μ - Viscosidade do Fluido
 T - Temperatura do Fluido
 k - Constante de Boltzmann
 D_p - Diâmetro da Partícula
 λ - Livre Caminho Médio

Como o número de Knudsen continua bastante pequeno (valores muito menores do que 1) mesmo para as menores partículas, o fluido pode ser tratado como meio contínuo. Sendo assim, propõe-se um balanço de forças (Figura 8) de uma partícula sob a ação de campo externo com algumas premissas importantes: a partícula é considerada esférica e isolada (meio diluído). A figura mostra a secção de uma cela centrífuga que gira no sentido z da orientação apresentada.

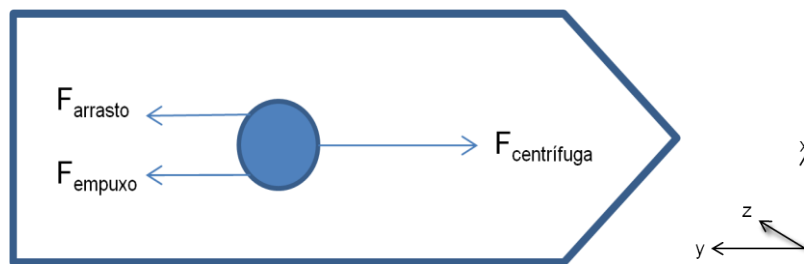


Figura 8 - Balanço de Forças de uma partícula sob a ação de força externa.

O balanço de forças pode ser descrito por:

$$F_{\text{arrasto}} + F_{\text{empuxo}} + F_{\text{centrifuga}} = 0 \quad (1)$$

$$\text{Sendo: } F_{\text{centrifuga}} = m\omega^2 r \quad F_{\text{arrasto}} = \frac{3\pi\mu D_p v}{C_c} \quad F_{\text{empuxo}} = m_0 \omega^2 r \quad (2)$$

Substituindo-se (2) em (1), chegamos ao seguinte valor da velocidade de

sedimentação:

$$v = \frac{w^2 r (m - m_o)}{3\pi\mu D_p C_c}$$

D_p - Diâmetro da Partícula
 m - massa partícula
 v - velocidade relativa ao fluido
 m_o - massa do líquido deslocado
 w - velocidade angular
 r - distancia ao centro da centrífuga
 C_c - fator de escorregamento

(3)

O fator de escorregamento é um parâmetro que depende do número de Knudsen e tende a 1 quando este é muito pequeno. Desde forma, daqui em diante ele será omitido.

4.1.2. Equação de Lamm

A partir das informações prévias, nesta etapa é possível modelar o perfil de concentração de nanopartículas em função do tempo e do raio da centrífuga partindo do seguinte balanço de forças diferencial (4). A nomenclatura é apresentada no final do trabalho:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \vec{V} \bullet \text{grad}C = \text{div}(D\text{grad}C) - \text{div}(\vec{v}C)$$

(4)

A equação (5) mostra o significado físico de cada termo do balanço. Considera-se que não há convecção do fluido na cela centrífuga, conforme explicitado pela seta.

Transitório Convectivo Difusivo Campo Externo

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \vec{V} \bullet \text{grad}C = \text{div}(D\text{grad}C) - \text{div}(\vec{v}C)$$

(5)

0 (Fluido Parado)

Escrevendo-se a equação (5) para escoamento unidimensional na direção r , chega-se à Equação de Lamm (6), na qual é introduzida a difusividade browniana e o coeficiente de Svedberg:

$$\boxed{\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[rD \frac{\partial C}{\partial r} - sw^2 rC \right]} \quad (6)$$

$D = \frac{kTC_c}{3\pi\mu D_p}$
 Difusividade Browniana

$s = \frac{v}{w^2 r} = \frac{(m - m_0)}{3\pi\mu D_p}$
 Coeficiente Svedberg

Com as seguintes condições iniciais (C.I.) e de contorno (C.C.):

$$\text{C. I.:} \quad t = 0 \quad ; \quad C = C_0 \quad ; \quad r_m < r < r_b$$

Isto é, concentração inicial C_0 uniforme em toda a extensão da cela centrífuga.

$$\text{C.C. no menisco:} \quad t > 0 \quad ; \quad D \frac{\partial C}{\partial r} = rw^2 sC \quad ; \quad r = r_m$$

Nenhum soluto entra no menisco ar-líquido.

$$\text{C.C. no fundo:} \quad t > 0 \quad ; \quad D \frac{\partial C}{\partial r} = rw^2 sC \quad ; \quad r = r_b$$

Nenhum soluto passa do fundo da cela centrífuga.

4.1.3. Soluções semi-analíticas

Soluções analíticas fechadas para a equação do transporte de Lamm não são disponíveis dentro das condições de contorno requeridas (BEHLKE, 1997). No entanto, nos anos sessenta, Fujita (1962) desenvolveu uma solução semi-analítica aproximada dentro das condições de contorno requeridas, descrita pela equação (7). A nomenclatura é apresentada no final do trabalho.

$$C = \frac{C_0}{2} e^{-\tau} \left\{ \begin{array}{l} 2 - \operatorname{erfc}\left(\frac{z - \tau\alpha}{2\sqrt{ae\tau}}\right) - \frac{a}{e} \exp\left(\frac{z\alpha}{ae}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{\tau\alpha + z}{2\sqrt{ae\tau}}\right) + \frac{\gamma}{e} \exp\left(\frac{e\tau + z}{e}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{\tau\gamma + z}{2\sqrt{ae\tau}}\right) \\ - \operatorname{erfc}\left(\frac{1 - z + \alpha\tau}{2\sqrt{ae\tau}}\right) - \frac{a}{e} \exp\left(\frac{-\alpha(1 - z)}{ae}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{1 - z - \alpha\tau}{2\sqrt{ae\tau}}\right) \\ + \frac{\gamma}{e} \exp\left(\frac{e\tau - 1 + z}{e}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{1 - z - \gamma\tau}{2\sqrt{ae\tau}}\right) \end{array} \right\} \quad (7)$$

Em 1997, uma dupla de alemães, Joachim Behlke e Otto Ristau, propuseram uma modificação na solução originalmente proposta por Fujita, a qual levou a coeficientes de sedimentação e difusão mais corretos quando comparados com o anterior (BELHKE, 1997).

Em 2001, essa mesma dupla publicou um novo artigo com uma abordagem um pouco diferente, que melhorava ainda mais a precisão do modelo semi-analítico e que permitiam a especificação dos coeficientes de difusão e sedimentação com desvios menores que 1% aos valores esperados (BEHLKE, 2001). Essa solução semi-analítica é explicitada na Equação (8) e foi a utilizada nas simulações realizadas neste trabalho.

$$C = \frac{C_0}{2} e^{-\tau} \left\{ \begin{aligned} & \operatorname{erfc} \left(\frac{e^{-\tau/2} - 0,5w - 1 + 0,25\varepsilon(e^{-\tau/2} - e^{\tau/2})}{\sqrt{\varepsilon(e^\tau - 1)}} \right) \\ & - \frac{1}{(1-b)} \exp \left(\frac{bw}{\varepsilon} \right) \operatorname{erfc} \left(\frac{w + 2b(e^{\tau/2} - 1)}{2\sqrt{2\varepsilon(e^{\tau/2} - 1)}} \right) \\ & + \frac{(2-b)}{(1-b)} \exp \left(\frac{w + 2(e^{\tau/2} - 1)(1-b)}{\varepsilon} \right) \operatorname{erfc} \left(\frac{w + 2(2-b)(e^{\tau/2} - 1)}{2\sqrt{2\varepsilon(e^{\tau/2} - 1)}} \right) \\ & - \operatorname{erfc} \left(\frac{d\tau - z}{2\sqrt{\varepsilon_b\tau}} \right) - \frac{1}{1-d} \exp \left(\frac{dz}{\varepsilon_b} \right) \operatorname{erfc} \left(\frac{-z - d\tau}{2\sqrt{\varepsilon_b\tau}} \right) \\ & + \frac{2-d}{1-d} \exp \left(\frac{(1-d)\tau + z}{\varepsilon_b} \right) \operatorname{erfc} \left(\frac{-z - (2-d)\tau}{2\sqrt{\varepsilon_b\tau}} \right) \end{aligned} \right\} \quad (8)$$

4.2. Modelo matemático para populações polidispersas

O modelo apresentado anteriormente prevê a sedimentação de nanopartículas de prata sob a ação da força centrífuga e difusividade browniana, de populações inicialmente monodispersas. Ocorre que as partículas sintetizadas são bastante polidispersas em relação ao tamanho, e objetiva-se promover a separação das mesmas a partir dessa diferença na velocidade de sedimentação das partículas com diferentes tamanhos. Dessa forma, para populações polidispersas, utiliza-se da mesma teoria utilizada no item anterior, com a diferença que ela é aplicada para cada faixa de tamanho de uma população discretizada. Composto todas as faixas é

possível prever o perfil de concentração, bem como prever o perfil populacional na cela centrífuga em função da rotação e tempo de centrifugação.

Para comparação com dados experimentais, foram consideradas populações de partículas distribuídas em 24 faixas de tamanho discretas. Define-se o momento de ordem zero (m_0) como o número de partículas contidas em cada faixa por unidade de volume. A partir de m_0 , calcula-se a distribuição de tamanhos baseada nos momentos de ordem três (m_3) e a distribuição baseada nos momentos de ordem seis (m_6). O valor de m_3 em cada faixa será utilizado, com o auxílio da densidade da prata e do fator de forma volumétrico das partículas (adotado $\pi/6$ pois partículas são aproximadamente esféricas) para o cálculo da distribuição mássica de tamanhos.

A distribuição de tamanhos em base numérica é a forma primitiva usada no modelo. A distribuição em base mássica pode ser integrada sobre todos os tamanhos para fornecer a concentração total de partículas. A distribuição em base de tamanho elevado à sexta potência, m_6 , é adequada para comparar com resultados experimentais por DLS (como foi dito previamente, o espalhamento de luz é proporcional à sexta potência do diâmetro da partícula).

Assim sendo, para uma população polidispersa inicial, o modelo computa m_0 ao longo da cela e ao longo do tempo a partir da Equação (8). Estas distribuições de tamanhos em base numérica são convertidas em base m_3 e m_6 para comparação com dados de concentração e DLS, respectivamente.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Materiais e equipamentos

Nitrato de prata (AgNO_3) e citrato de sódio tribásico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ambos da marca Vetec Química Fina, foram utilizados sem tratamentos adicionais. Água milli-Q MILLIPORE foi usada em todas as preparações.

Para realizar a síntese das nanopartículas de prata, utilizou-se de um reator encamisado de vidro, com agitação mecânica constante e vigorosa. O reator é um recipiente cilíndrico, vertical, de vidro, encamisado e provido de tampa. A Figura 9 mostra o reator em funcionamento. A parte interna do reator tem 10 cm de diâmetro e 17 cm de altura, totalizando um volume útil de 1335 mL. A agitação foi feita através de um impelidor de metal, com 4 pás inclinadas em 45° de 2,5 cm, gerando um sentido de fluxo de baixo para cima.



Figura 9 - Reator em funcionamento.

Para a centrifugação, as celas centrífugas são utilizadas microtubos MCT-200-C da marca Axygen de 1,5 mL e dimensões ilustradas na Figura 10. O aparelho centrifugador utilizado foi o modelo Eppendorf 5415 R, com rotor de ângulo fixo F-45-24-11.

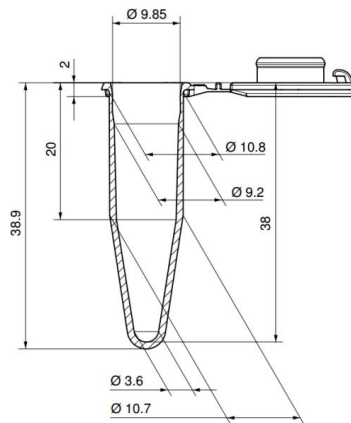


Figura 10 - Dimensões em mm da cela centrífuga utilizada nos experimentos.

5.2. Procedimento para síntese das nanopartículas e centrifugação

Para a síntese das nanopartículas de prata, coloca-se 0,5 L de água milli-Q em um cristalizador encamisado, liga-se um agitador a 900 RPM e aquece-se a água até 90°C. Nessa temperatura, coloca-se 90 mg de nitrato de prata e em seguida goteja-se 10 ml de uma solução aquosa 1% mássica de Citrato de Sódio com uma bomba peristáltica a 30 mL/min. Após 20 minutos de reação, retira-se a solução pelo fundo do reator e deixa-se resfriar a temperatura ambiente.

Amostras dessa dispersão são colocadas em um eppendorf de 1,5 ml e centrifugadas em um aparelho centrifugador em variadas rotações a 22°C, retirando-se alíquotas de 0,75 ml (metade superior) do sobrenadante em intervalos de tempos iguais com uma micropipeta de precisão para posterior caracterização. O intervalo entre a síntese e as análises é inferior a 12 horas.

5.3. Métodos de Caracterização

Alíquotas do sobrenadante em variados momentos da centrifugação são caracterizadas por DLS (Dinamic Light Scattering), espectro de absorção UV/Vis e comparadas com a solução antes da centrifugação. Análises de Zeta Potencial, Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão também foram realizadas nesse trabalho.

As análises de uv-vis foram empregadas para determinar a concentração de prata particulada, da seguinte forma. Oliveira (2013) mostrou que o valor máximo da absorbância do espectro uv-vis é proporcional à concentração da solução de nanopartículas de prata para partículas obtidas numa mesma condição de síntese.

Assim sendo, foram tomadas amostras de suspensão em tempos sucessivos de centrifugação. Sendo a concentração inicial de partículas conhecida, as absorvâncias máximas dos picos foram normalizadas entre 0 a 1 (sendo 1 a máxima absorvância do minuto 0), para determinar as concentrações ao longo do tempo de centrifugação. A concentração inicial em todos os experimentos foi de 25 µg/ml de prata na forma de particulado.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Estudos exploratórios do modelo teórico e experimental.

Nessa etapa, a solução teórica semi-analítica é testada e avaliada com os parâmetros referentes a nanopartículas de prata para que se tenha maior sensibilidade das variáveis de separação, como a rotação e o tempo de centrifugação. Para avaliar os resultados, um experimento exploratório foi realizado centrifugando-se nanopartículas de prata sintetizadas nas mesmas condições do modelo teórico.

Com a solução semi-analítica proposta (Equação 8), é possível simular o perfil de concentração de uma população monomodal de nanopartículas de prata em uma cela centrífuga em função do tempo e intensidade de centrifugação.

Os dados de entrada para obtenção desse perfil são: tamanho da população de nanopartículas, concentração inicial de nanopartículas, taxa de rotação, temperatura do fluido, densidade das nanopartículas de prata, densidade do fluido, viscosidade do fluido, posição radial relativa ao centro do rotor do menisco e posição radial relativa ao centro do rotor do fundo da cela.

Para um melhor entendimento do gráficos, a Figura 11 ilustra uma simulação feita em Microsoft Excel 2007 para uma população de nanopartículas de prata de raio 5 nm e taxa de rotação de 7000 RPM. Cada linha do gráfico representa o perfil de concentração ao longo da cela após um determinado tempo de centrifugação. Nota-se que, em baixos tempos de centrifugação, a concentração é praticamente uniforme ao longo da cela, enquanto para maiores tempos tem-se um diminuição gradativa da concentração próxima ao menisco (interface líquido-ar) e acúmulo no fundo da cela, acompanhados de uma diminuição da concentração na região central da cela.

O perfil de concentrações próximo ao menisco revela que partículas iguais estão se difundindo com taxas diferentes. Este comportamento é explicado pela difusão associada ao movimento Browniano das partículas.

O decréscimo de concentração ao longo da cela com o tempo é consistente com o acúmulo de partículas no fundo da cela à medida que a sedimentação progride.

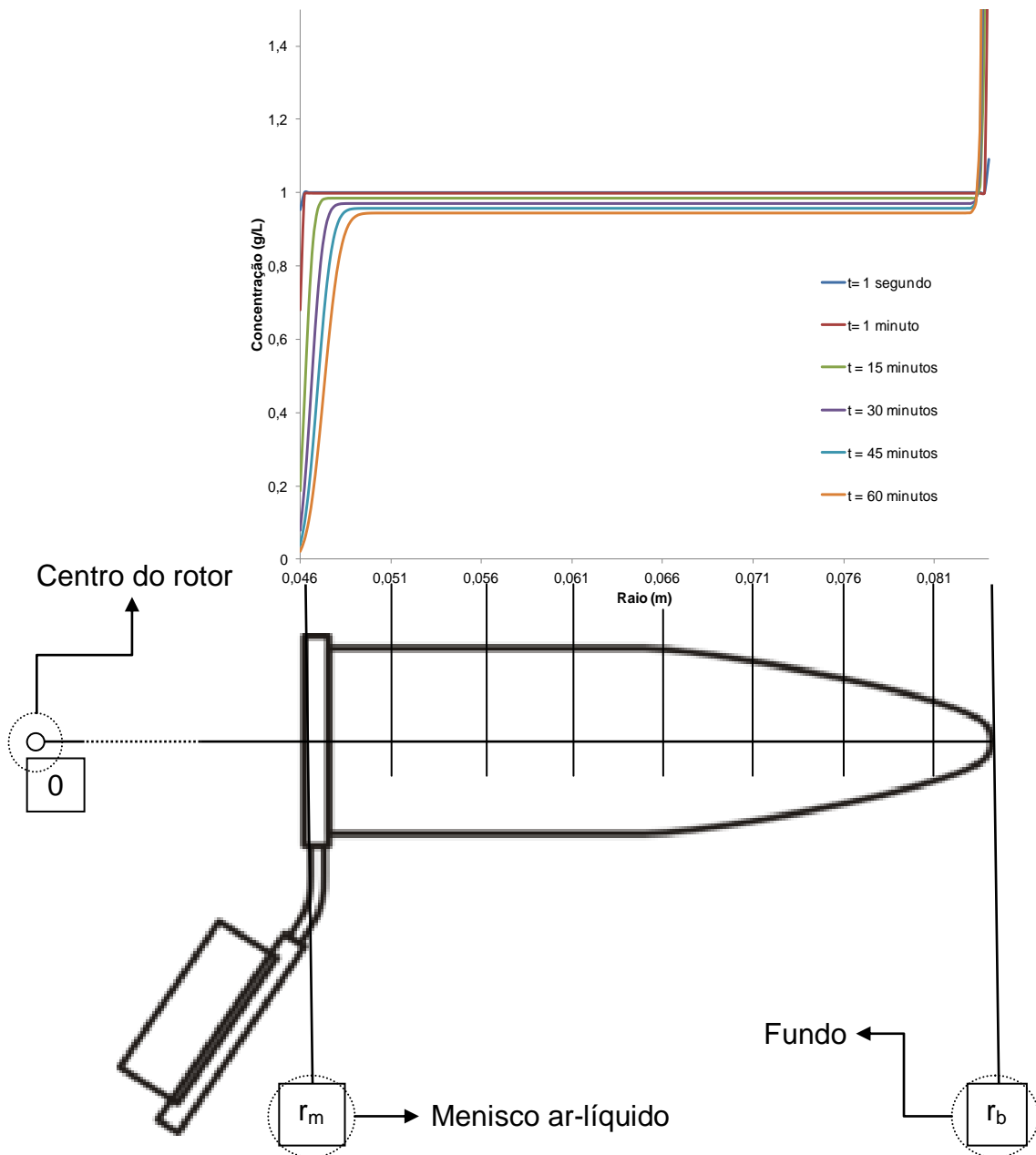


Figura 11 - Distribuição da concentração radial de nanopartículas de prata com raio de 5 nm sob rotação de 7000 RPM (4500 RCF) calculada pela Equação 8. A simulação foi obtida para concentrações iniciais $C_0 = 0,998 \mu\text{g/ml}$, $T = 22^\circ \text{C}$, difusividade browniana estimada $D = 9,27 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ e coeficiente de Svedberg = 141,5 S.

O modelo matemático revela ainda que as partículas de maiores tamanhos sedimentam mais rápido do que as menores, conforme Figura 12, para uma rotação de 5000 RPM. Partículas de maiores tamanhos sedimentam de forma mais rápida

devido à maior massa e a uma menor influência da difusividade browniana, ao contrário das menores nanopartículas de prata onde o efeito da difusividade browniana é importante.

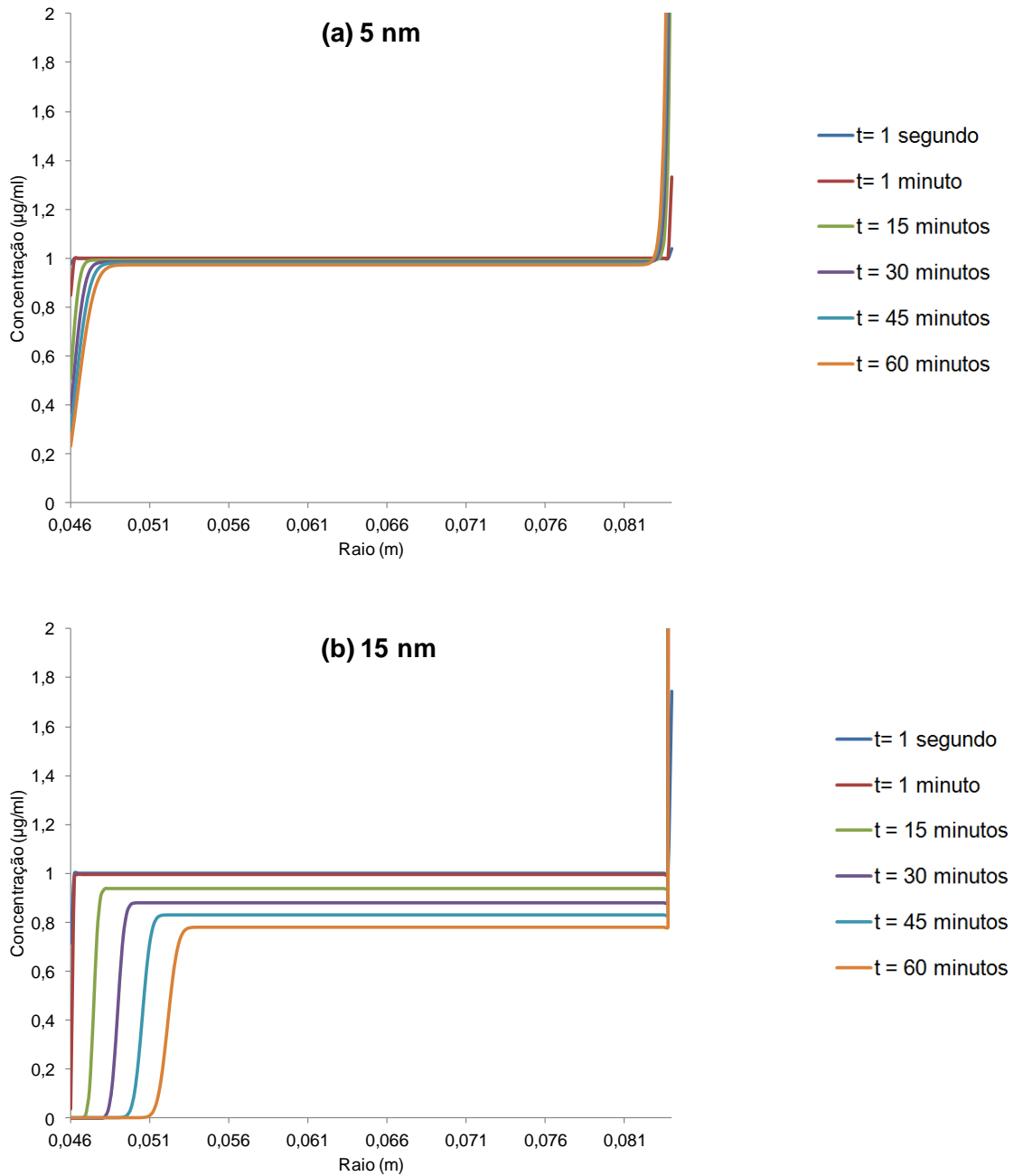
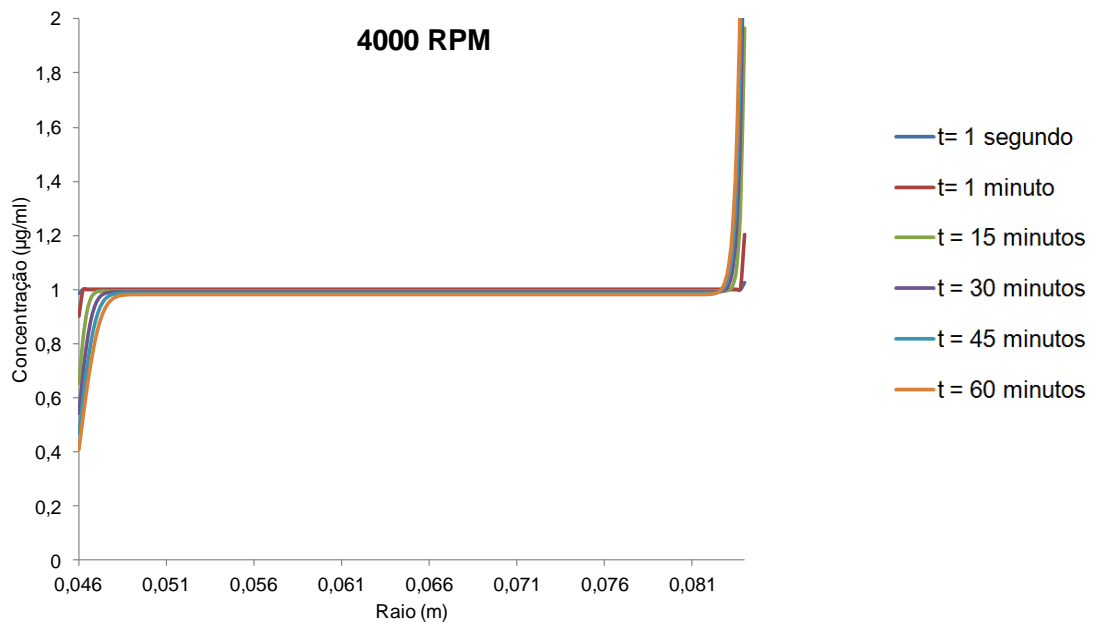
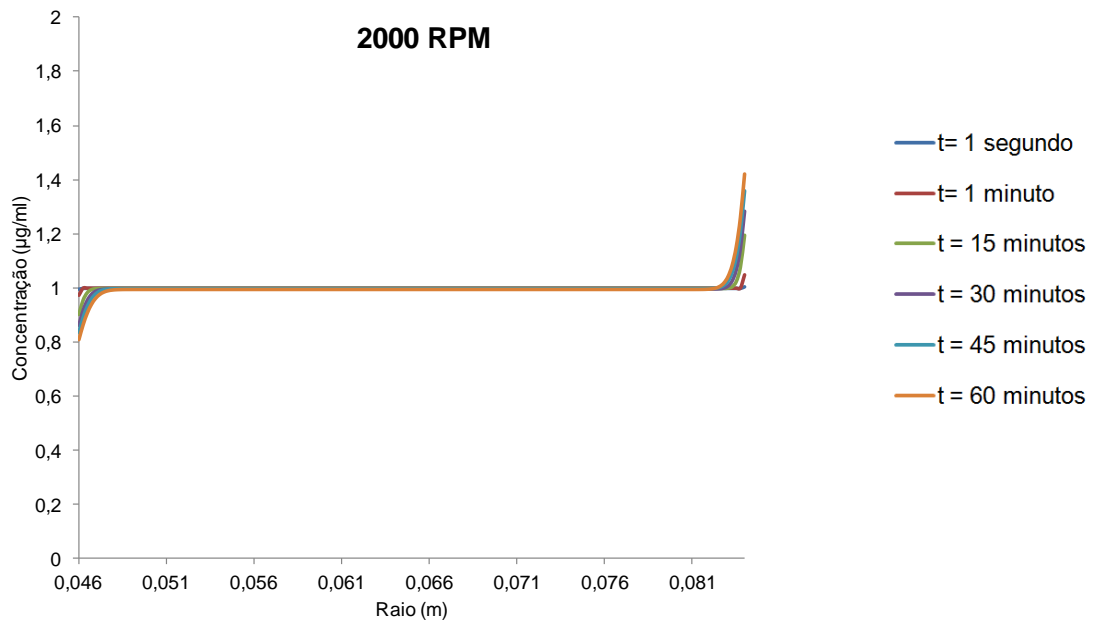


Figura 12 – Distribuição da concentração radial calculada pela Equação 8 para nanopartículas de prata de diferentes raios ((a) 5 e (b) 15 nm) sob rotação de 5000 RPM (2320 RCF) . Concentrações iniciais $C_0 = 0,998 \mu\text{g/ml}$, $T = 22^\circ \text{C}$, difusividade browniana estimada (a) $D=9,27 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ e (b) $D=3,09 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ e coeficiente de Svedberg (a) $s = 141,5 \text{ S}$ e (b) $s=1273,7 \text{ S}$.

O modelo também permite simular o comportamento da sedimentação em função de diferentes velocidades de rotação, conforme Figura 13. Para partículas de um mesmo tamanho (no exemplo, de 5 nm) observa-se que a sedimentação é mais rápida no mesmo sentido da taxa de rotação, conforme esperado.



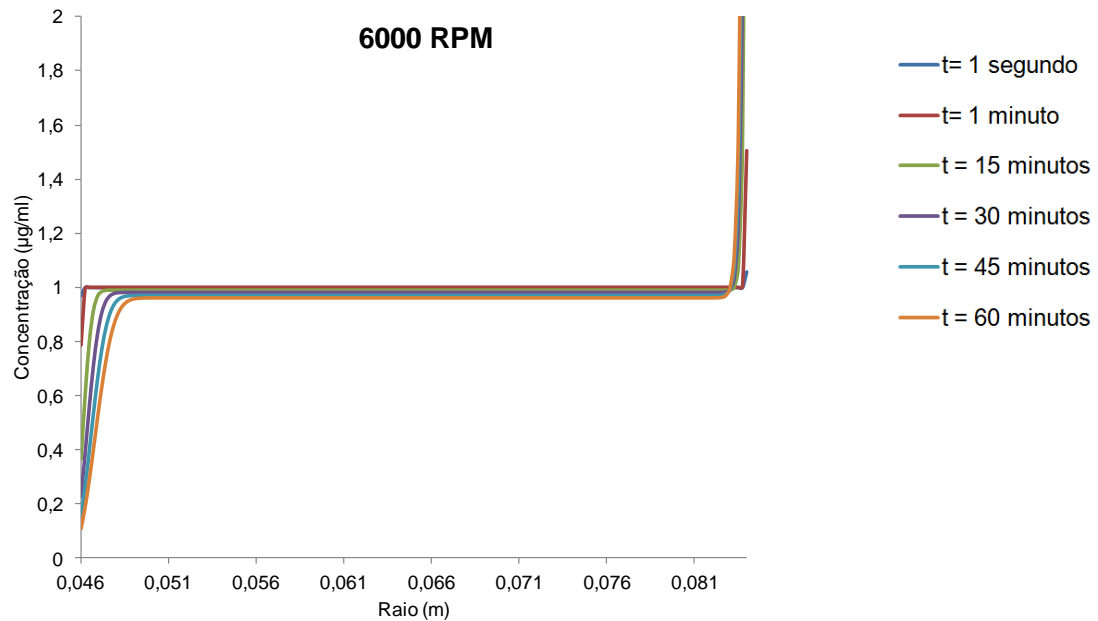


Figura 13 – Distribuição da concentração radial calculada pela Equação 8 para nanopartículas de prata de raio 5 nm sob rotações de (a) 2000 RPM (370 RCF), (b) 4000 RPM (1480 RCF) e (c) 6000 RPM (3340 RCF). A simulação foi obtida para concentrações iniciais $C_0 = 0,998 \mu\text{g/ml}$, $T = 22^\circ \text{C}$, difusividade browniana estimada $D=9,27 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ e coeficiente de Svedberg $s = 141,5 \text{ S}$.

Os estudos exploratórios foram importantes para se ter maior sensibilidade das duas principais variáveis de separação: o tempo de centrifugação e a rotação. Nota-se que centrífugas comuns são capazes de sedimentar as nanopartículas de prata na faixa de tamanho desejados, uma vez que a densidade da prata é bastante superior à do meio aquoso. Na Figura 12, observa-se que para um mesmo instante as partículas de 15 nm sedimentaram com maior velocidade em relação às de 5 nm, sendo em princípio possível promover a separação entre elas.

Para uma primeira avaliação experimental desse método de separação, nanopartículas de prata foram sintetizadas e centrifugadas a 5000 RPM e temperatura de 22°C (mesmas condições das simulações da Figura 12). A síntese e a centrifugação foram realizadas no mesmo dia. Alíquotas de seu sobrenadante foram analisadas a cada 15 minutos de centrifugação e caracterizadas por DLS. Observa-se na Tabela 4 que os tamanhos médios das nanopartículas de prata diminuíram conforme aumentava o tempo de centrifugação, indicando que menores tamanhos podem ser obtidos com esse processo pós-síntese, baseado na diferença da velocidade de sedimentação dos diferentes tamanhos analisadas pelo modelo.

Tabela 4 - Tamanhos das partículas nos sobrenadantes por DLS para tamanho médio e desvio padrão em diferentes tempos de centrifugação a 5000 RPM (2320 RCF) e 22°C.

Tempo de Centrifugação (minutos)	Tamanho médio (nm)	Desvio Padrão do tamanho (nm)
0	52,49	25,25
15	36,15	27,49
30	28,54	16,99
45	13,03	19,08
60	2,00	0,10

Nota-se que a difusão molecular retarda o processo, mas devido à alta densidade da prata, uma separação granulométrica eficiente é possível com rotações moderadas. Tais previsões foram confirmadas experimentalmente pela possibilidade de separar completamente nanopartículas com tamanhos entre 2 e 50 nm.

O Zeta Potencial das amostras de nanopartículas de prata indicaram estabilidade moderada (resultado de -31,7 mV em testes realizados em alíquotas retiradas no mesmo dia da síntese no ZetaSizer da Malvern), uma vez que ficaram entre 20 e 40 mV, em módulo.

Os resultados experimentais foram qualitativamente consistentes com as previsões do modelo, porém as simulações foram feitas para populações monodispersas, longe da realidade das amostras sintetizadas. Dessa maneira, simulações mais elaboradas foram realizadas a partir de desse mesmo modelo com uma diferente abordagem e alguns passos extras. Esses estudos e resultados estarão detalhados a seguir.

6.2. Perfil de concentração do sobrenadante a partir do modelo teórico.

Discretizou-se uma população de nanopartículas de prata em tamanhos de 5 a 235 nm e simulou-se o perfil de concentração em função da posição ceta centrífuga para cada um desses valores de tamanho. Compondo a taxa de decantação das partículas em todas as faixas granulométricas, é possível simular o perfil populacional do sobrenadante em função do tempo e da posição axial.

O resultado da previsão realizada é uma composição de dados gerados a partir dos seguintes passos:

- 1 – Discretização dos tamanhos de uma população de nanopartículas de prata de 5 a 235 nm.
- 2 – Para cada valor de tamanho discretizado, insere-se a concentração inicial, obtido na caracterização da solução inicial sem centrifugação.
- 3 – Dados os tamanhos e concentrações, escolhe-se uma taxa de rotação, temperatura, raio do menisco e de fundo (utilizadas dimensões adequadas para posterior comparação com os dados experimentais).
- 4 – Simula-se, a partir da Equação 8, o perfil de concentração na cela centrífuga para todos os tamanhos discretizados, em tempos de 1 segundo, 1 minuto, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos e 60 minutos de centrifugação.
- 5 – Calcula-se uma média aritmética da concentração da metade superior (metade da cela até o menisco) para cada faixa de tamanho e cada tempo de centrifugação.
- 6 – Plota-se em diagramas esses resultados da concentração média do sobrenadante em função dos tamanhos para diversos tempos de centrifugação citados.

No exemplo a seguir, considera-se uma população e dados iniciais mostrados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Dados iniciais de uma simulação exemplo.

Dados Iniciais		
r_m	0,057	m
r_b	0,084	m
T	21	°C
w	4000	RPM
$\rho_{particula}$	10490	kg/m ³
ρ_{meio}	1000	kg/m ³
μ_{meio}	9,31E-04	Kg/(m.s)

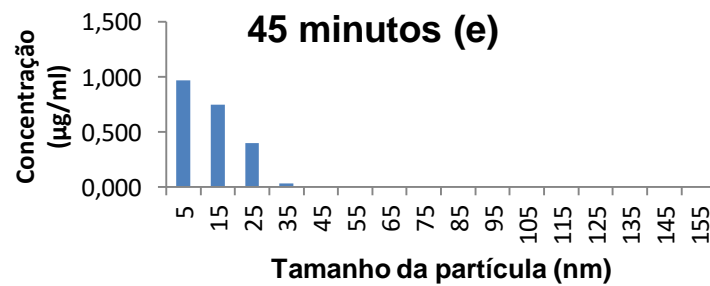
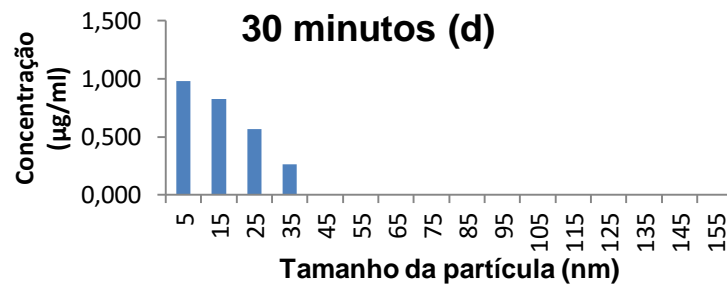
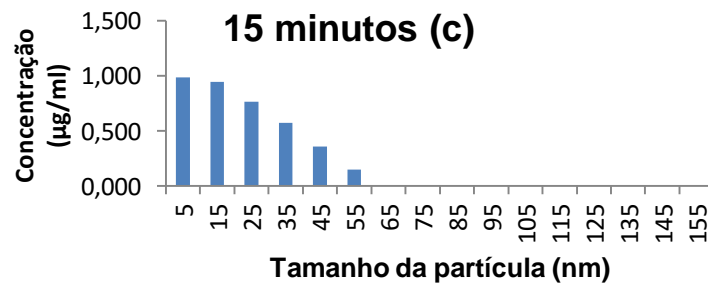
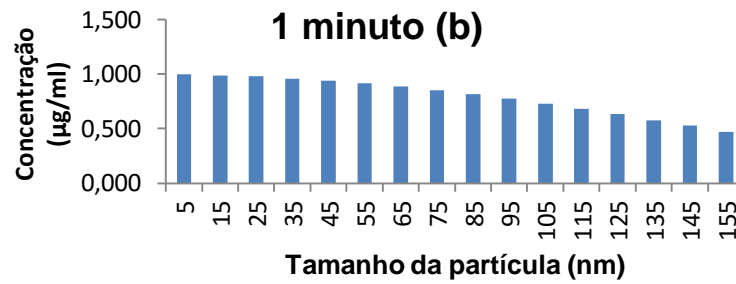
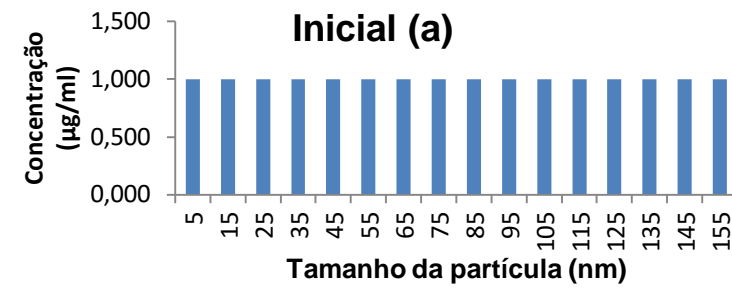
Tabela 6 - Concentração inicial de cada faixa de tamanho. Para o exemplo, supõe-se que todas as faixas de tamanho têm a mesma concentração inicial.

Tamanho da partícula(nm)	Concentração inicial (µg/mL)	Tamanho da partícula(nm)	Concentração inicial (µg/mL)
5	1,000	85	1,000
15	1,000	95	1,000
25	1,000	105	1,000
35	1,000	115	1,000
45	1,000	125	1,000
55	1,000	135	1,000
65	1,000	145	1,000
75	1,000	155	1,000

Seguindo os passos descritos, para essa população inicial de nanopartículas de prata, centrifugadas a 4000 RPM, obtemos os seguintes resultados de concentração média no sobrenadante por faixa de tamanho da tabela 7. Dispondo os resultados da Tabela 7 graficamente, é possível uma visualização da informação apresentada na Figura 14.

Tabela 7 - Concentração média do sobrenadante em cada faixa de tempo de centrifugação.

Tamanho (nm)	Concentração média no sobrenadante nos seguintes tempos (µg/mL)					
	1 seg	1 min	15 min	30 min	45 min	60 min
5	1,000	0,998	0,984	0,969	0,955	0,941
15	0,997	0,985	0,874	0,759	0,651	0,548
25	0,992	1,000	0,673	0,398	0,163	0
35	0,988	0,949	0,408	0	0	0
45	0,987	0,919	0,110	0	0	0
55	0,987	0,884	0	0	0	0
65	0,987	0,845	0	0	0	0
75	0,987	0,796	0	0	0	0
85	0,986	0,744	0	0	0	0
95	0,986	0,687	0	0	0	0
105	0,985	0,621	0	0	0	0
115	0,985	0,557	0	0	0	0
125	0,985	0,483	0	0	0	0
135	0,984	0,415	0	0	0	0
145	0,984	0,336	0	0	0	0
155	0,983	0,260	0	0	0	0



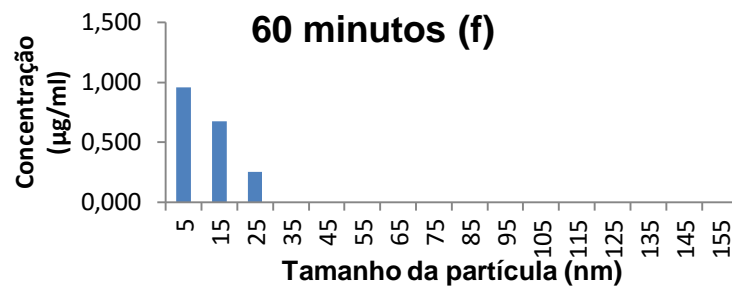


Figura 14 - Concentração média do sobrenadante em função do tamanho para diferentes tempos de centrifugação a 4000 RPM (1480 RCF).

Na Figura 14(a) observa-se a distribuição granulométrica de uma população fictícia de nanopartículas no instante inicial, antes da centrifugação. Uma concentração uniforme de partículas em cada faixa de tamanho foi escolhida. Após centrifugação por um período de 1 minuto, o sobrenadante contém uma menor concentração de partículas, bem perceptível para as maiores faixas de tamanho. Como já visto na seção anterior, a sedimentação promove um decréscimo da concentração de nanopartículas em praticamente toda a extensão da célula, exceto nas proximidades do fundo da célula, onde ela aumenta, bem como do menisco, onde ela decresce abruptamente. Assim sendo, o que se observa após 1 minuto é uma sedimentação mais acentuada das partículas maiores. Após 15 minutos (Figura 14c), partículas com dimensões de 65 nm e superiores já não estão mais presentes no sobrenadante. Caso a centrifugação fosse interrompida neste momento, teríamos separado uma fração com partículas menores que 65 nm no sobrenadante e uma com partículas maiores que 65 nm no fundo da cela. Tempos de centrifugação ainda maiores (Figuras 14 d,e,f) mostram que este processo de separação continua, mas de forma não linear com o tempo. Mesmo após 60 minutos ainda há partículas de até 25 nm no sobrenadante nessa intensidade de rotação.

Assim sendo, as nanopartículas de maiores tamanhos sedimentam com maior velocidade em relação às menores. Como resultado as concentrações dos maiores tamanhos diminuem ao longo do tempo no sobrenadante, acumulando-se com maior velocidade no fundo da cela (não mostrado). Partículas de menores tamanhos sedimentam de forma mais lenta devido à menor massa e a uma maior influência da difusividade browniana, ao contrário das maiores nanopartículas de prata onde o efeito da força centrífuga prevalece.

Conseqüentemente, aumenta no sobrenadante a concentração das menores partículas em relação às maiores, evidenciando a separação granulométrica entre as populações no sobrenadante e no fundo.

Comparações entre o modelo teórico e ensaios experimentais serão estudadas em detalhe nos próximos tópicos. Serão importantes para avaliação do modelo matemático proposto e suas premissas adotadas.

6.3. Resultados das caracterizações experimentais

Conforme procedimento para síntese e centrifugação, foram analisadas alíquotas do sobrenadante para diferentes tempos de centrifugação por DLS (COULTER N4 Plus Submicron Particle Size Analysis). As nanopartículas foram centrifugadas a 5000 RPM e 22°C. Os resultados estão apresentados na Figura 15. Nota-se uma diminuição da intensidade dos picos relativos aos maiores tamanhos conforme o tempo de centrifugação, indicando que as partículas maiores estão sedimentando mais rapidamente. Do outro lado, o aumento da intensidade das partículas entre 1 e 2 nanômetros indica que, proporcionalmente, as partículas menores estão ficando em maior quantidade.

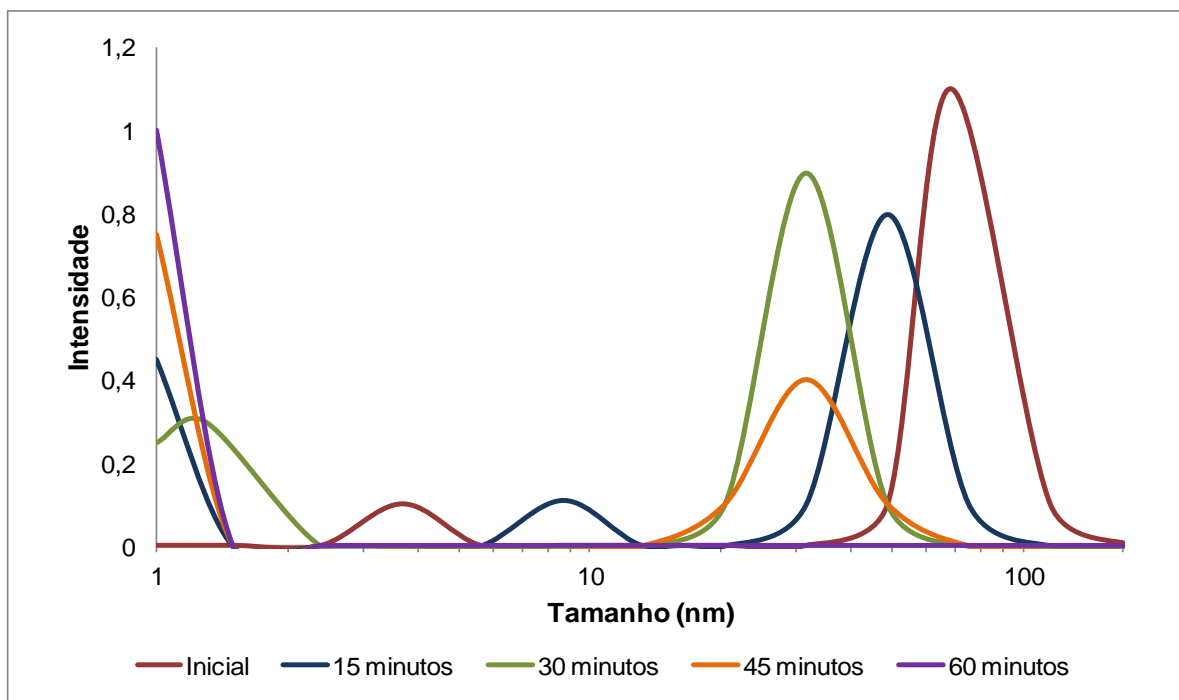


Figura 15 - DLS dos sobrenadantes em diferentes tempos de centrifugação.

A Tabela 4 com os tamanhos médios da população confirma a diminuição granulométrica das nanopartículas de prata no sobrenadante.

Análises por microscopia eletrônica de transmissão indicam a presença de variados tamanhos de nanopartículas de prata na solução inicial de nanopartículas de prata sintetizadas conforme metodologia descrita. Pode-se observar na Figura 16 a presença tanto de partículas com tamanhos próximos a 10 nm (Figura 16 (a)), como outras com tamanhos próximos de 20nm e maiores que 50 nm (Figura 16 (b) e (c)), comprovando a sua polidispersão. O tempo entre a síntese e análise da microscopia foi de aproximadamente 24 horas.

A caracterização por imagem evidenciou que não há indícios de nanopartículas de tamanhos menores que 5 nm, logo o pico de intensidade do DLS numa faixa de tamanho menor do que essa deve ser interpretada como um ruído e desprezada. Se elas estivessem presentes, e na intensidade que aparecem no DLS, essas nanopartículas representariam, em número e volume, praticamente a totalidade populacional e não veríamos decréscimo aparente da concentração em função do tempo do centrifugação, em clara contradição com os resultados de microscopia. Dessa maneira, os picos menores que 5 nm aparentes no DLS serão negligenciados.

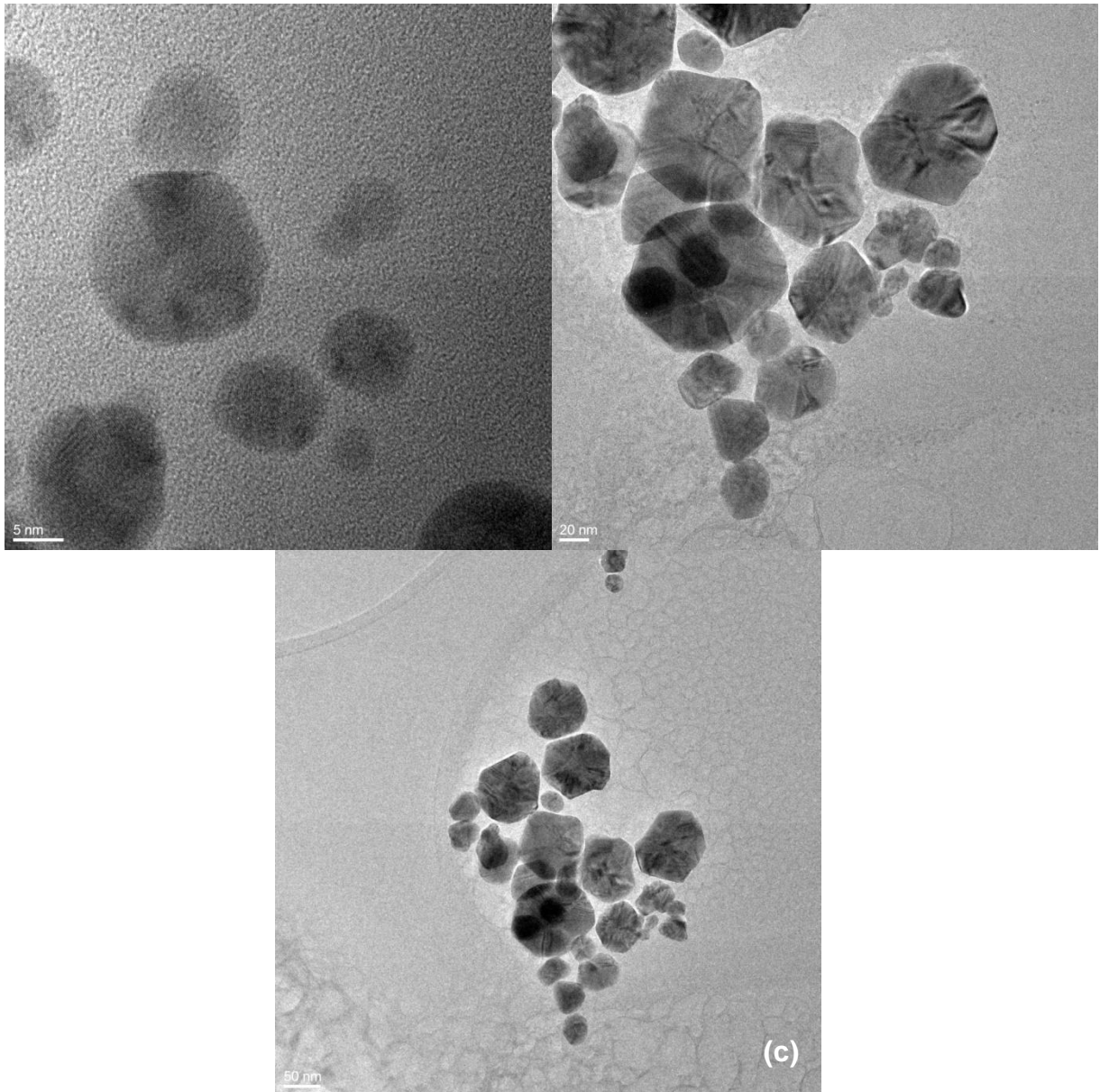


Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão da solução inicial da síntese de nanopartículas de prata.

A Figura 17 mostra a evolução do espectro de absorção UV-Vis para sobrenadantes de diferentes tempos de centrifugação a 5000 RPM (2320 RCF). Pode-se observar que o pico de absorção decai com o tempo, indicando uma diminuição da concentração de partículas dispersas, consistentes com sua deposição no fundo da cela. Nota-se também que as distâncias entre os picos máximos de absorbância vão diminuindo em intervalos iguais de tempo de centrifugação, evidenciando o aumento da resistência das partículas menores à sedimentação, conforme previsto pelo modelo e mostrado na Figura 14. Além disso, as absorbâncias máximas situam-se entre 430 e 460 nm, o que está de acordo com a ressonância plasmon de nanopartículas de prata.

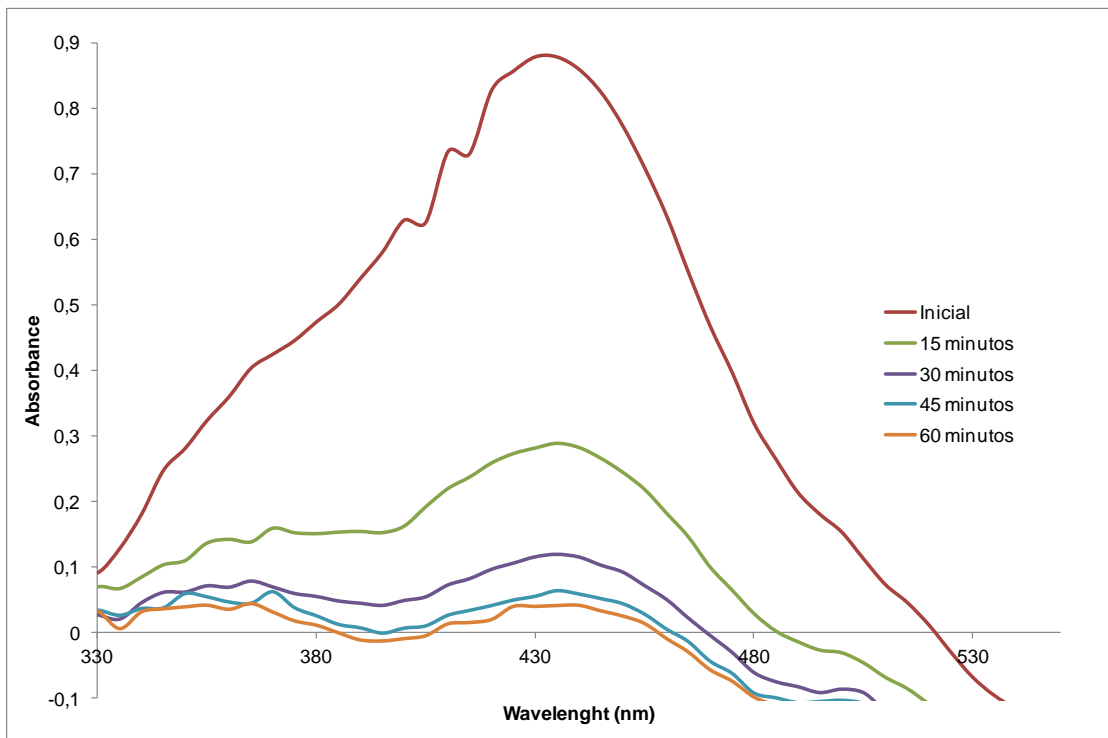


Figura 17 - Espectro de absorção UV-Vis ao longo do sobrenadante em diferentes tempos de centrifugação a 5000 RPM (2320 RCF).

Avaliando tanto o espectro de absorção no UV-Vis (Figura 17), quanto o perfil de contração da Figura 14, notamos que a partir de 30 minutos de centrifugação a taxa de sedimentação das nanopartículas na parte superior da cela é lenta e praticamente fica inalterada nos minutos 45 e 60 minutos. Assim, para melhor avaliação da região da sedimentação, as alíquotas serão coletadas nos minutos 6, 12, 18, 24 e 30 nos próximos experimentos.

Análises por microscopia eletrônica de varredura mostram uma agregação de partículas pequenas em partículas maiores, conforme observado na Figura 18. Essa agregação não havia sido observada anteriormente em amostras não submetidas a centrifugação (não mostrado). Ela, provavelmente, foi proveniente da sedimentação partículas maior num meio no qual partículas menores estavam sedimentando em mais baixa velocidade.

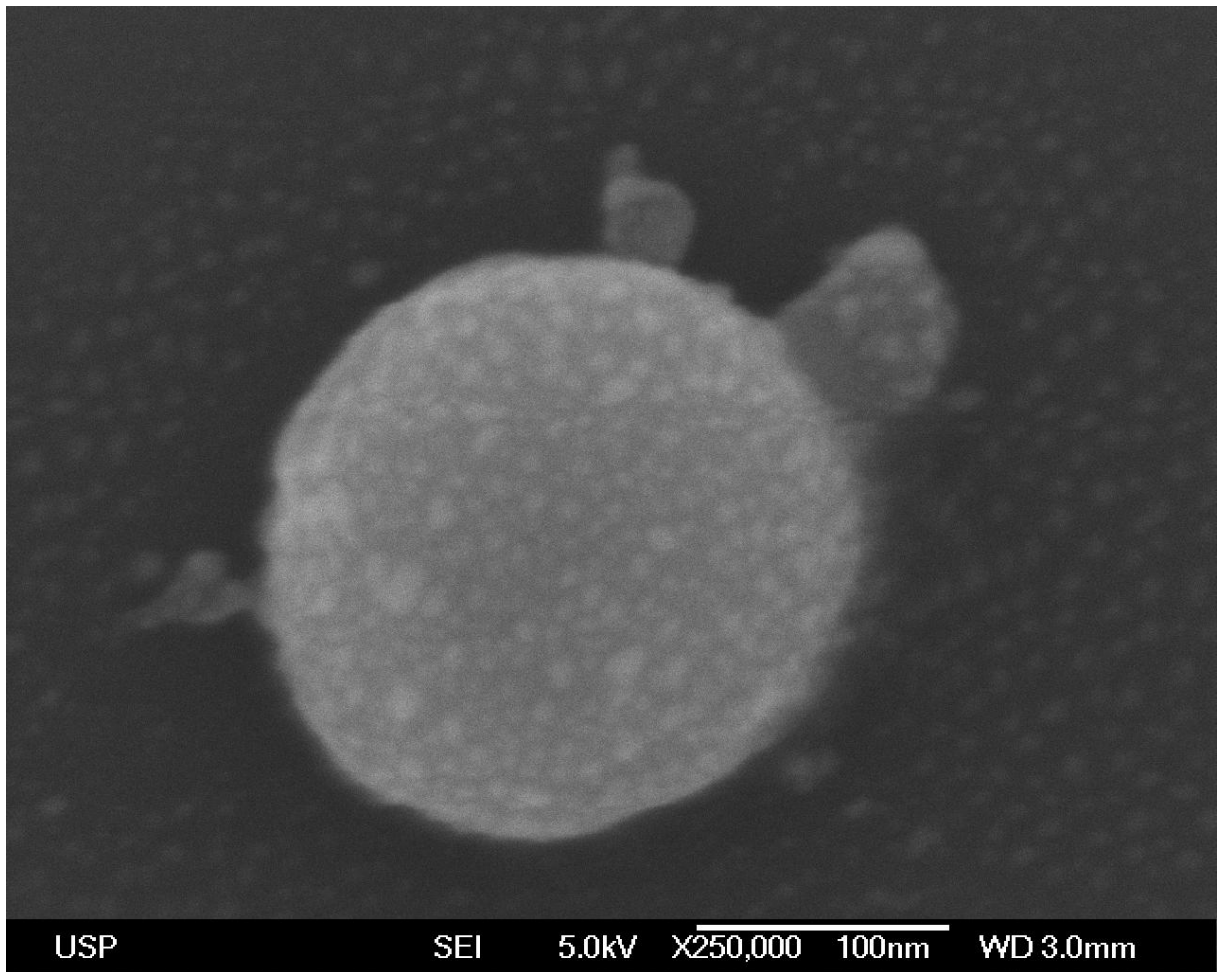


Figura 18 - Nanopartículas de prata do sobrenadante após centrifugação.

6.4. Comparação do modelo frente aos resultados experimentais.

A Tabela 8 apresenta as distribuições granulométricas em base de tamanho às potências 0, 3 e 6 determinados experimentalmente para uma suspensão antes da centrifugação. A concentração de partículas foi estimada em 25 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas de prata, considerando uma conversão aproximada de 20% da reação de 180 mg/L de nitrato de prata adicionados inicialmente (OLIVEIRA, 2013).

Tabela 8 - Momentos m_0 , m_3 e m_6 de uma população inicial de nanopartículas de prata obtidos experimentalmente.

Diâmetro (nm)	m_0 (número de partículas/volume de suspensão)	m_3 ($m_0 \times D^3$)	m_6 ($m_0 \times D^6$)
0,1	0	0	0
0,5	0	0	0
1	0	0	0
10	0	0	0
18,2	3,25E+10	1,95E+14	1,17E+18
21,0	5,91E+10	5,50E+14	5,12E+18
24,3	5,53E+10	8,00E+14	1,16E+19
28,2	3,80E+10	8,53E+14	1,92E+19
32,7	2,14E+10	7,46E+14	2,60E+19
37,8	1,05E+10	5,69E+14	3,08E+19
43,8	4,56E+09	3,84E+14	3,23E+19
50,7	1,77E+09	2,31E+14	3,02E+19
58,8	6,16E+08	1,25E+14	2,54E+19
68,0	1,88E+08	5,93E+13	1,87E+19
78,8	4,84E+07	2,37E+13	1,16E+19
91,3	9,85E+06	7,49E+12	5,70E+18
105,7	1,41E+06	1,67E+12	1,97E+18
122,4	2,81E+05	5,16E+11	9,46E+17
175	0	0	0
200	0	0	0
225	0	0	0
300	0	0	0
500	0	0	0
600	0	0	0

Com a distribuição de tamanhos de partícula inicial ajustada aos dados experimentais, simulam-se os momentos em cada faixa de tamanhos no sobrenadante em diferentes tempos de centrifugação. A simulação foi realizada a 4000 RPM (1480 RCF), raios de menisco e fundo 0,046 e 0,084 metros,

respectivamente, e temperatura 20°C. A Tabela 9 apresenta as concentrações de partículas calculadas a partir do terceiro momento da distribuição. A soma das concentrações em cada faixa granulométrica é mostrada ao final da tabela, elas representam a concentração de prata particulada no reator após intervalos de tempo determinados. A tabela 11 apresenta as distribuições granulométricas expressas em termos da potência 6 do tamanho.

Tabela 9 – Simulações da distribuição granulométrica do sobrenadante em termos de concentrações ($\mu\text{g/ml}$) em diferentes tempos de centrifugação.

Diâmetro (nm)	C0 ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração do sobrenadante em diferentes tempos de centrifugação ($\mu\text{g/ml}$)				
		6 min	12 min	18 min	24 min	30 min
0,1	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
18,2	1,071	1,027	0,986	0,947	0,908	0,870
21,0	3,016	2,856	2,703	2,557	2,416	2,280
24,3	4,379	4,074	3,783	3,507	3,245	2,996
28,2	4,669	4,241	3,835	3,456	3,103	2,774
32,7	4,079	3,585	3,126	2,707	2,327	1,981
37,8	3,107	2,609	2,162	1,767	1,420	1,116
43,8	2,095	1,652	1,272	0,951	0,682	0,458
50,7	1,260	0,914	0,632	0,409	0,233	0,097
58,8	0,682	0,437	0,256	0,124	0,030	0
68,0	1,071	1,027	0,986	0	0	0
78,8	0,130	0,0331	0,0121	0	0	0
91,3	0,041	0,0117	0	0	0	0
105,7	0,009	0,0013	0	0	0	0
122,4	0,003	2,2E-05	0	0	0	0
175	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0
225	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0
Total	25	24,864	21,581	18,779	16,432	14,367

Para determinação experimental dos valores de concentração de partículas, as alíquotas do sobrenadante foram submetidas ao teste de espectroscopia no UV/Vis, conforme mostrado na Figura 19. A absorbância diminui com o tempo, indicando a

diminuição da concentração do sobrenadante. A Figura 20 mostra como o sobrenadante fica cada vez mais claro conforme o tempo de centrifugação, reforçando este aspecto do processo. Tomando as absorbâncias máximas dos picos da Figura 19 e normalizando-as de 0 a 1 (sendo 1 a máxima absorbância do minuto 0) determinamos as concentrações de prata particulada ao longo do tempo. Os valores experimentais assim obtidos são apresentados na Tabela 10.

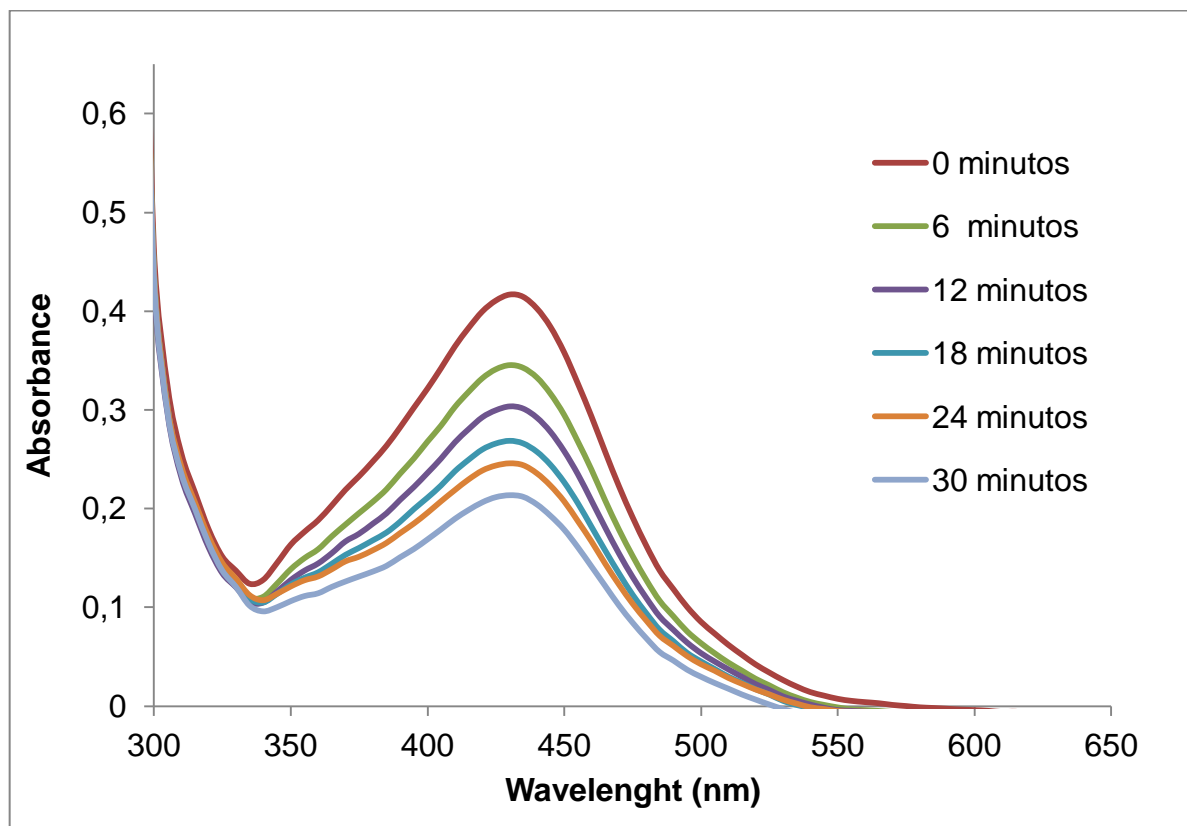


Figura 19 - Espectroscopia do Uv/Vis dos sobrenadantes centrifugados a 4000 RPM (1480RCF).

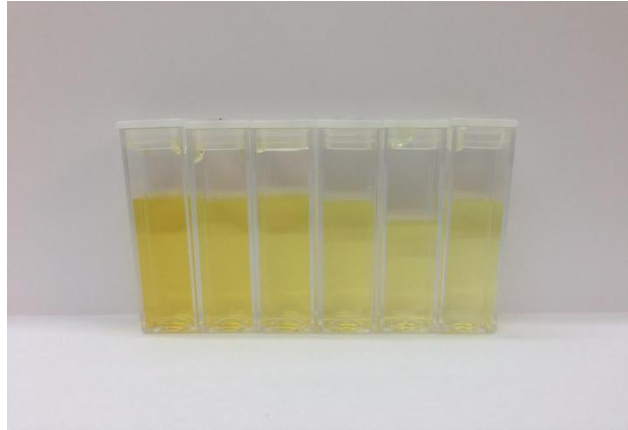


Figura 20 - Da esquerda para direita, as alíquotas dos sobrenadantes após 0, 6, 12, 18, 24 e 30 minutos de centrifugação, respectivamente.

Tabela 10 - Comparativo do decaimento da concentração normalizada experimental e teórica do sobrenadante de alíquotas centrifugadas a 4000 RPM (1480 RCF).

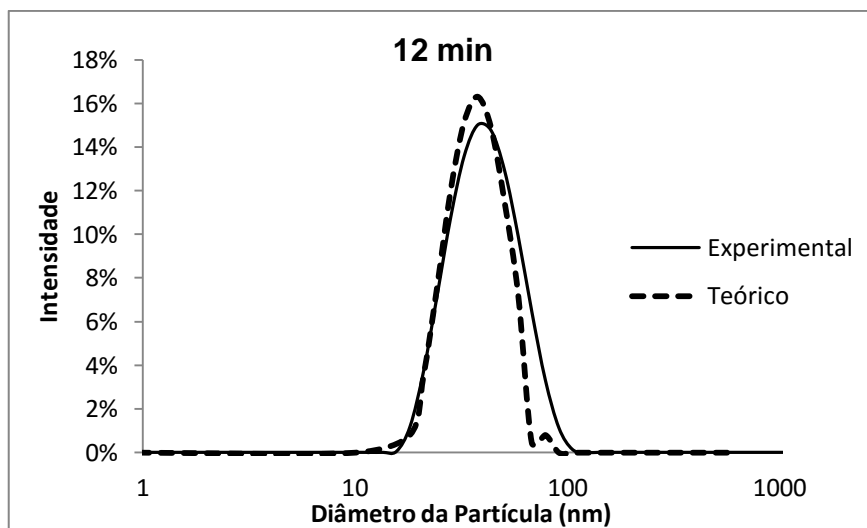
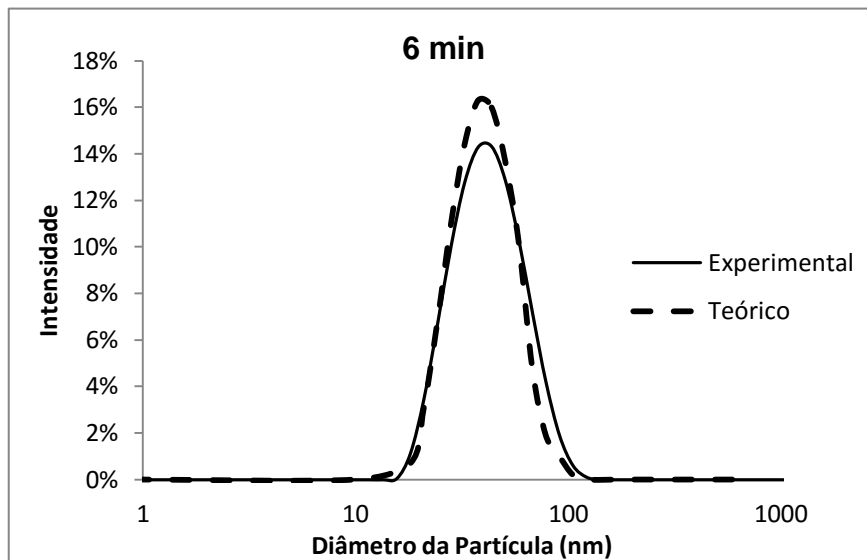
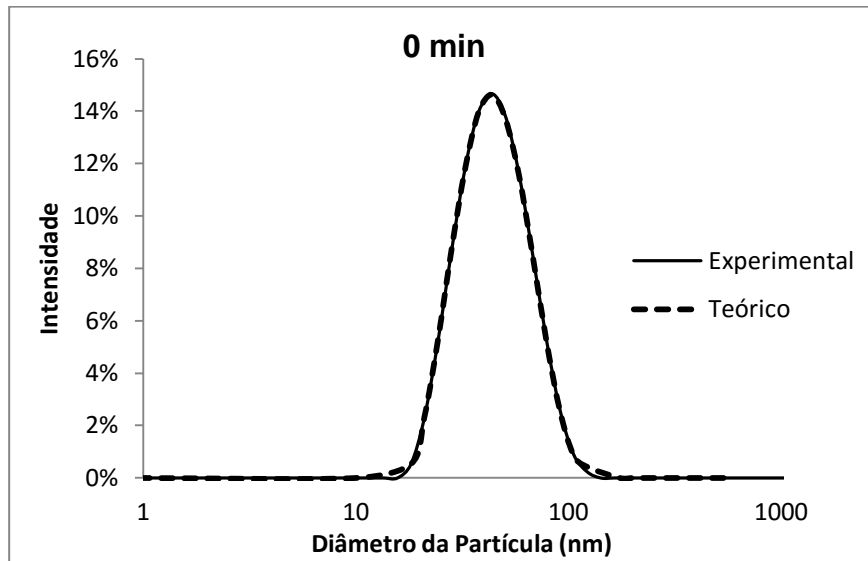
	Concentração normalizada do sobrenadante de alíquotas centrifugadas a 4000 RPM (1480 RCF).					
	0 min	6 min	12 min	18 min	24 min	30 min
Experimental	1	0,828	0,728	0,645	0,590	0,512
Teórico	1	0,863	0,751	0,657	0,574	0,503
Diferença (%)		+3,99	+3,08	+1,77	-2,82	-1,78

A Tabela 10 também apresenta os valores teóricos da concentração de nanopartículas. O comparativo revela boa aderência do modelo aos resultados experimentais em termos da concentração de nanopartículas de prata, revelando que a taxa de sedimentação prevista ficou próxima à medida experimentalmente.

A distribuição granulométrica simulada expressa em termos do 6^o momento da distribuição normalizado é mostrada na Tabela 11. A Figura 21, a seguir, mostra o comparativo desta distribuição com a distribuição da intensidade percentual dos sobrenadantes por DLS. Tanto o experimento, quanto a modelagem seguem exatamente os mesmos parâmetros de separação conforme descrito (4000 RPM (1480 RCF), raios de menisco e fundo 0,046 e 0,084 metros, respectivamente, e temperatura 20°C). As alíquotas do sobrenadante foram analisadas de 6 em 6 minutos.

Tabela 11 – Simulações de m6 normalizados do sobrenadante para cada tempo de centrifugação.

Diâmetro (nm)	0 min	6 min	12 min	18 min	24 min
0,1	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
18,2	0,0053	0,007	0,009	0,011	0,014
21,0	0,0232	0,031	0,039	0,047	0,057
24,3	0,0526	0,068	0,084	0,100	0,118
28,2	0,0870	0,110	0,133	0,153	0,176
32,7	0,1178	0,144	0,168	0,186	0,205
37,8	0,1396	0,163	0,181	0,189	0,194
43,8	0,1463	0,160	0,165	0,158	0,145
50,7	0,1368	0,137	0,127	0,106	0,077
58,8	0,1151	0,102	0,080	0,050	0,015
68,0	0,0847	0,048	0,005	0	0
78,8	0,0526	0,019	0,009	0	0
91,3	0,0258	0,010	0	0	0
105,7	0,0089	0,002	0	0	0
122,4	0,0043	0,000	0	0	0
175	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0
225	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0



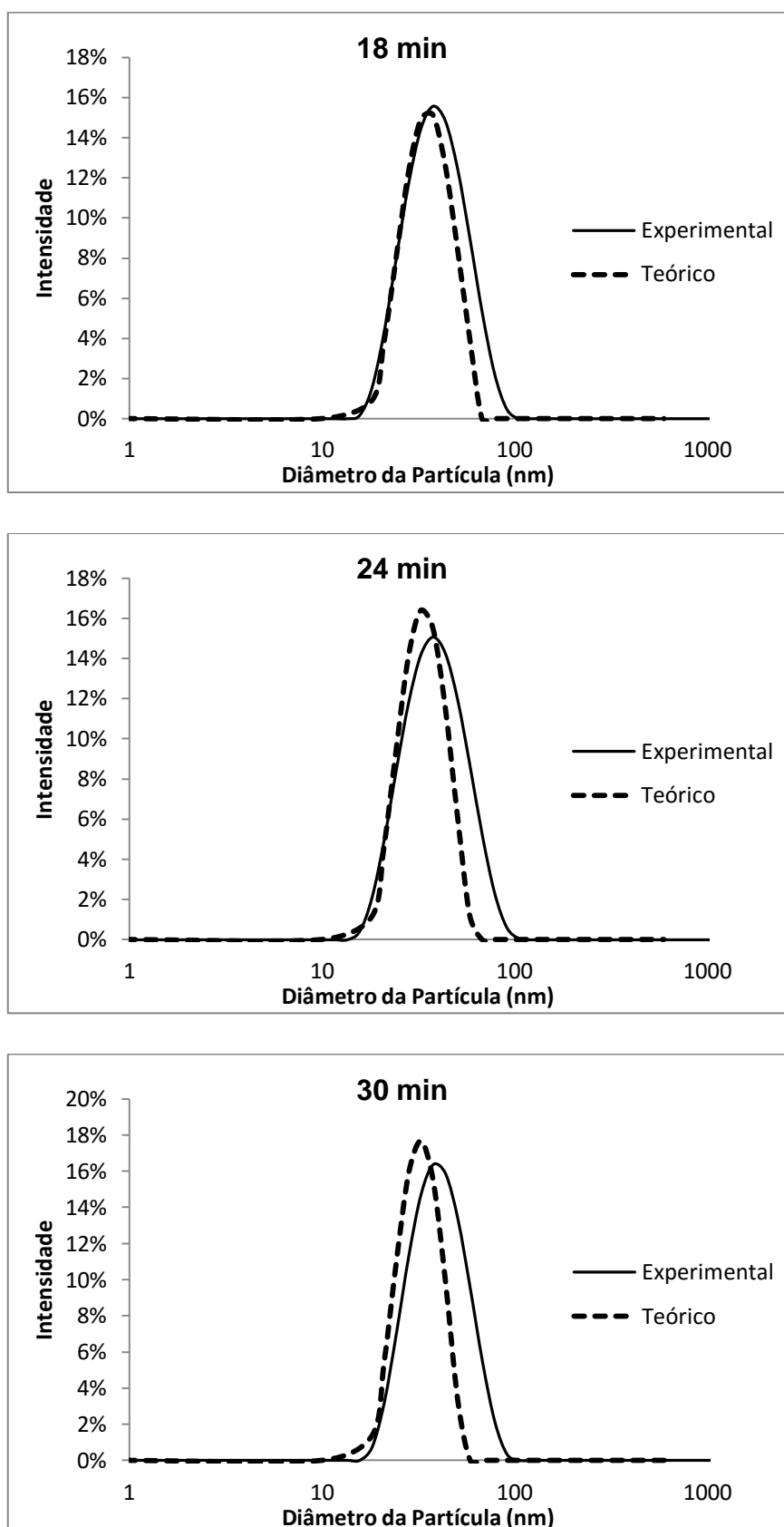


Figura 21 - Comparativo dos resultados de DLS (experimental) com os resultados da Tabela 8 (teórico) a 4000 RPM (1480 RCF).

As curvas experimentais e teóricas do minuto 0 sempre se sobrepõem, pois as simulações teóricas são baseadas na população inicial dessa medição. O comparativo mostra um estreitamento da curva de intensidade teórica conforme o tempo de centrifugação devido à maior taxa de sedimentação das partículas de maiores tamanhos frente às menores. No experimental, esse estreitamento não é observado, uma vez que o DLS realiza medidas indiretas e suas correlações sempre convertem o sinal obtido em uma distribuição gaussiana, não tendo assim a mesma precisão do modelo teórico. Nota-se na Figura 22 que apesar da distribuição experimental não apresentar visível mudança no comparativo acima, ainda sim está ocorrendo discreta separação granulométrica das nanopartículas, com médias diminuindo de 43 nm no minuto 0 para 39 nm no minuto 30 (Tabela 12), porém superiores às previstas pelo modelo teórico (32,5 nm no minuto 30).

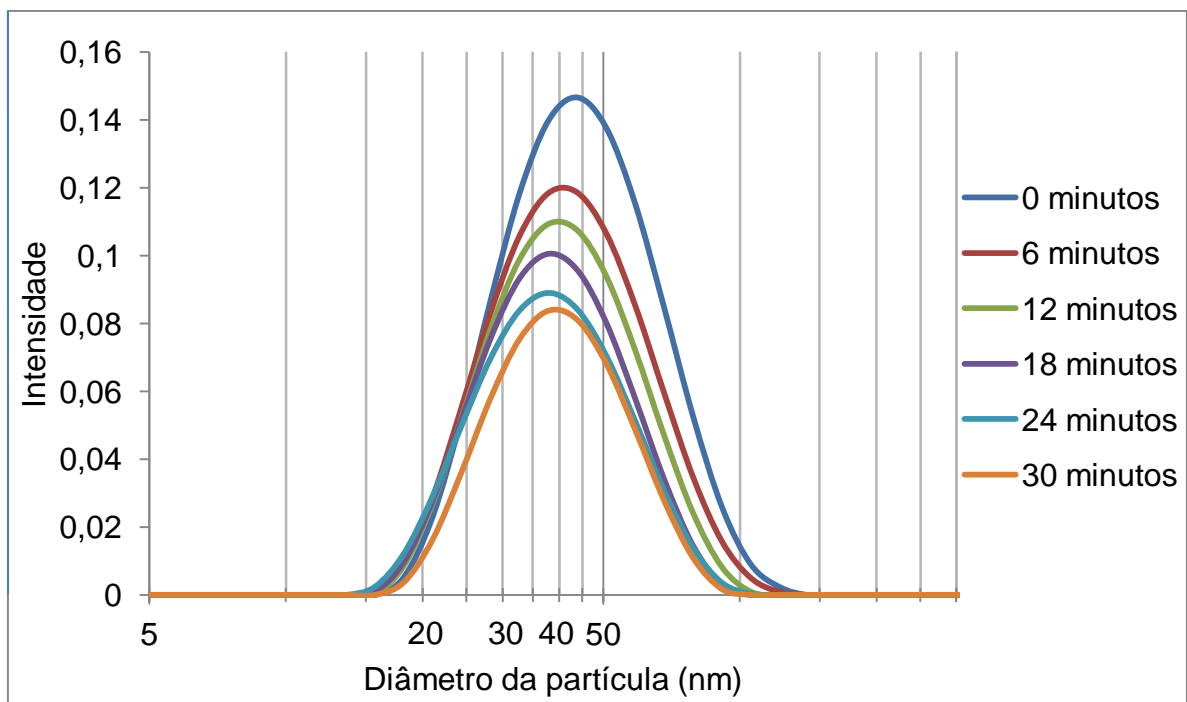
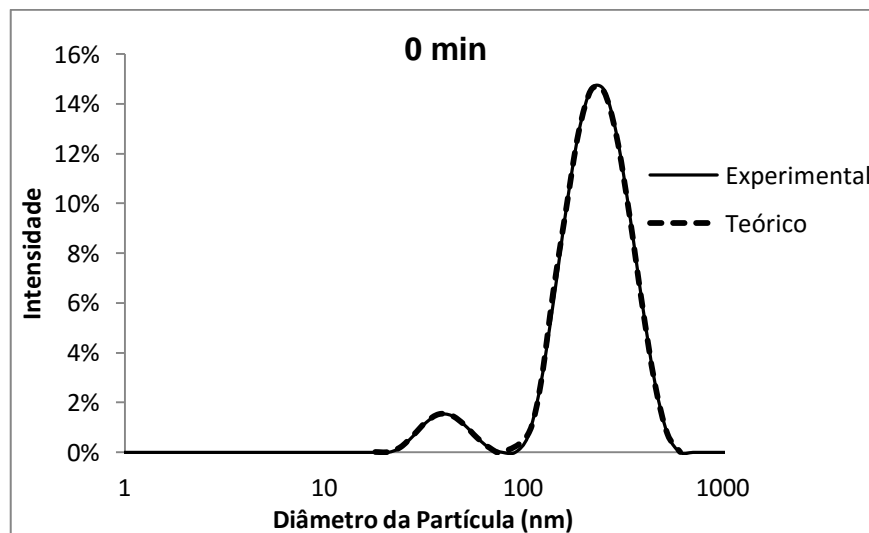


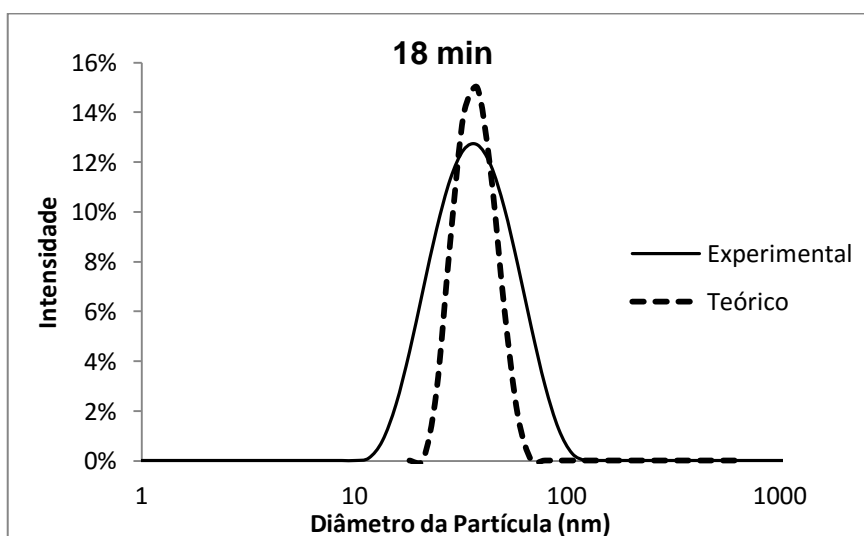
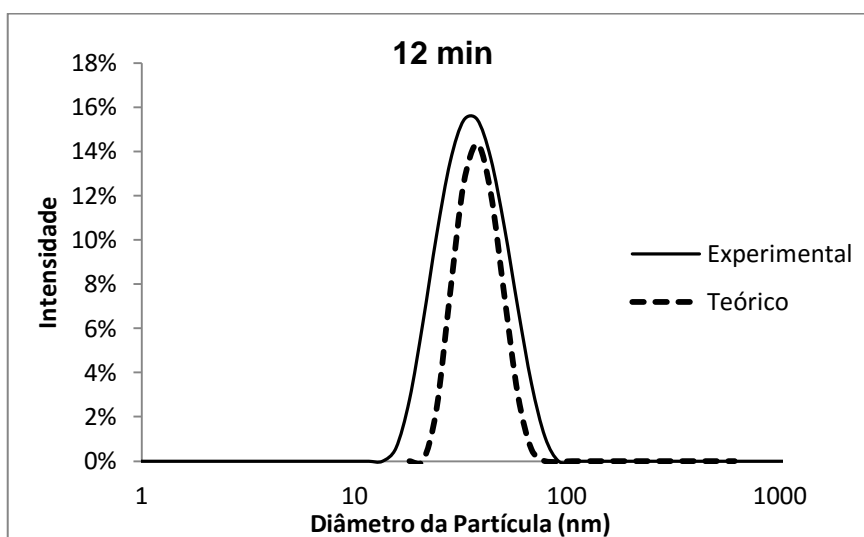
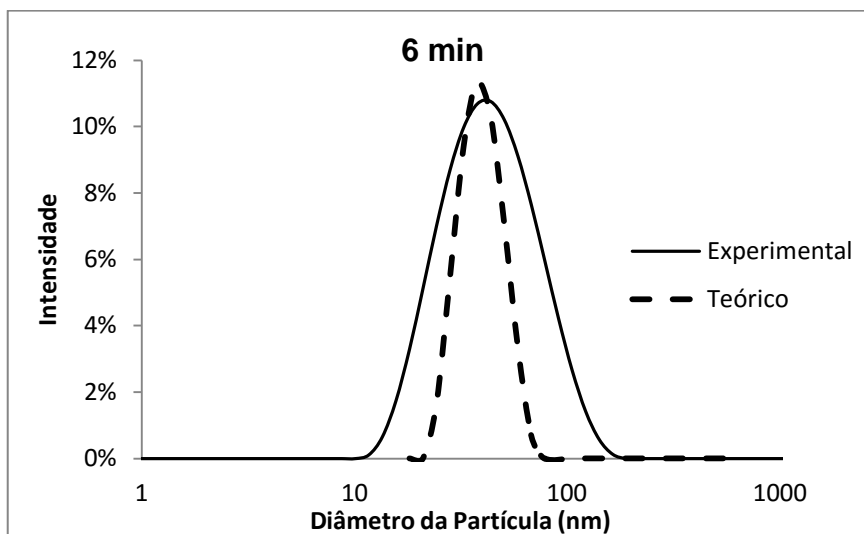
Figura 22 – Evolução dos resultados de DLS experimentais com intensidades proporcionais a sua concentração medida por UV-Vis centrifugadas a 4000 RPM (1480 RCF) em diferentes tempos de centrifugação.

Tabela 12 - Tamanho granulométrico médio experimental e teórico baseados nos resultados de DLS centrifugados a 4000 RPM (1480 RCF).

	Tamanho granulométrico médio (nm)					
	0 min	6 min	12 min	18 min	24 min	30 min
Experimental	43	41	40	38	38	39
Teórico	43	40	37,5	35,5	33,5	32,5
Diferença (%)	-	2,4%	6,3%	6,6%	11,8%	16,7%

Para deixar a separação mais evidente, uma síntese de nanopartículas de prata foi realizada com a mesma metodologia (item 5.2), apenas deixando que a reação transcorresse por mais tempo (35 minutos ao invés de 20), a fim de se obter populações de tamanhos mais dispersos. A Figura 23 seguir mostra que inicialmente temos duas populações: uma na faixa de 40 nm e outra na faixa de 250 nm. Depois de 6 minutos de centrifugação, observa-se que todas as partículas da maior faixa já sedimentaram e não estão mais presentes no sobrenadante. A partir daí, nos demais tempos, a faixa menor fica mais evidente e não apresenta mudanças significativas na forma, conforme as análises das simulações teóricas.





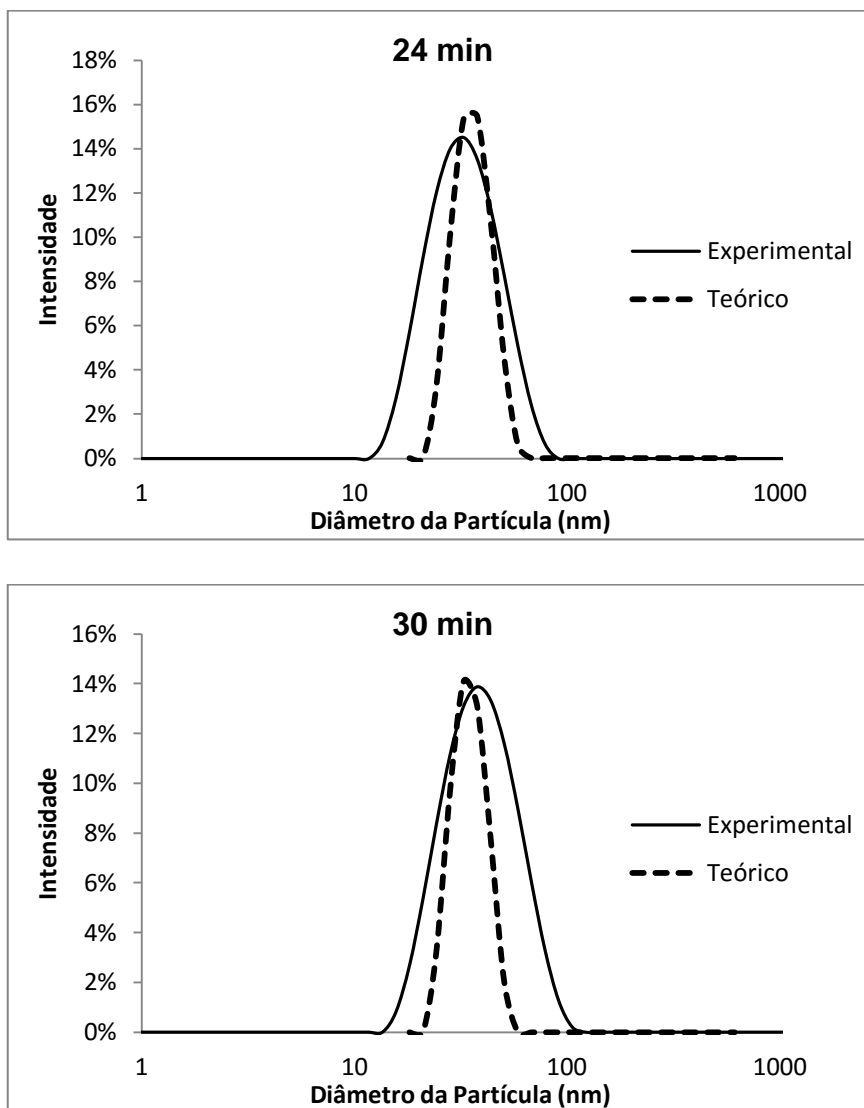
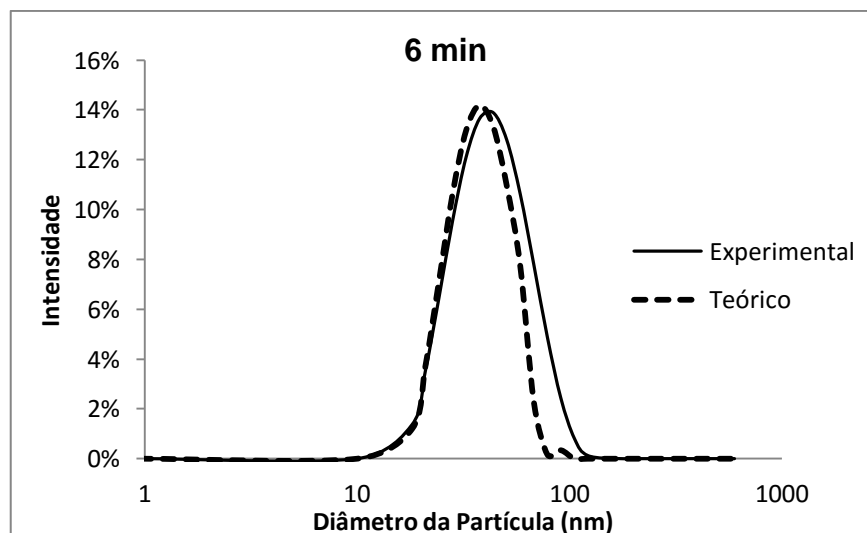
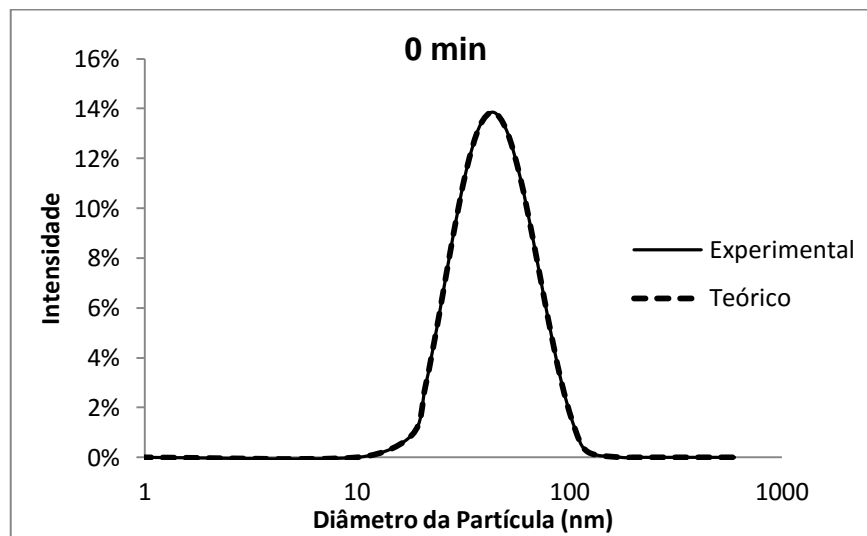


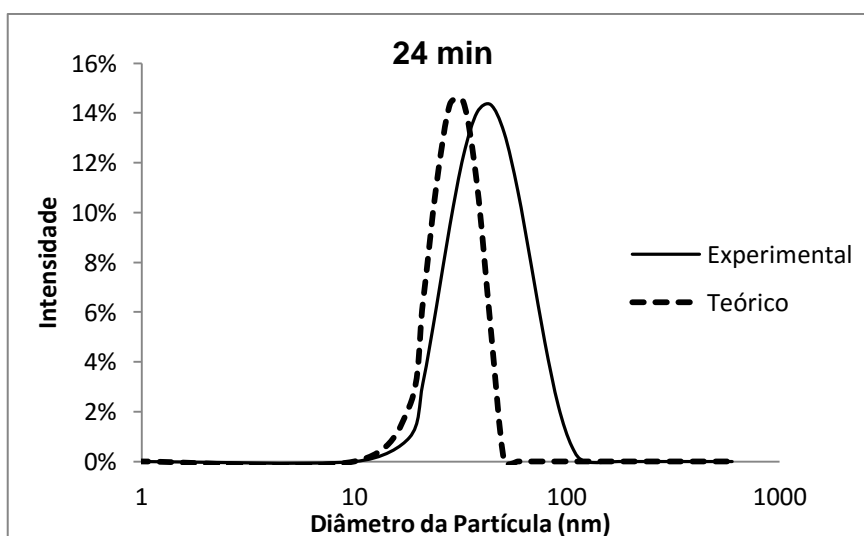
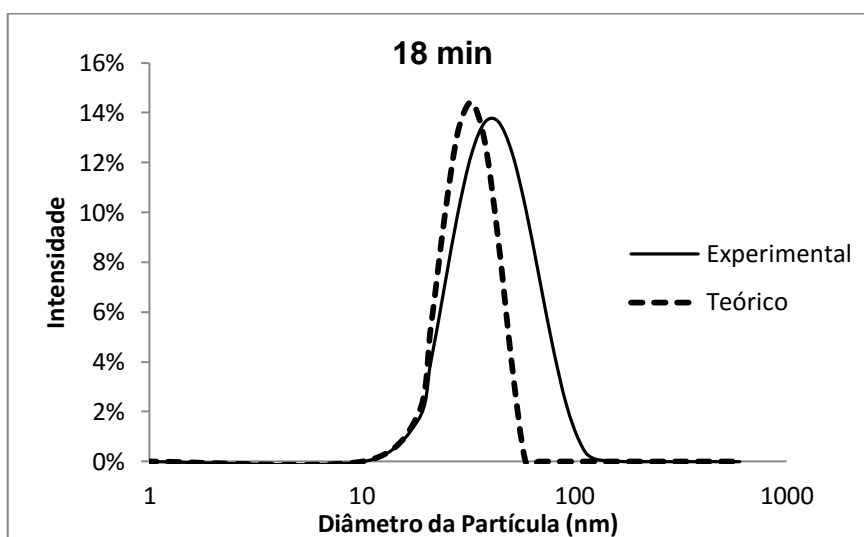
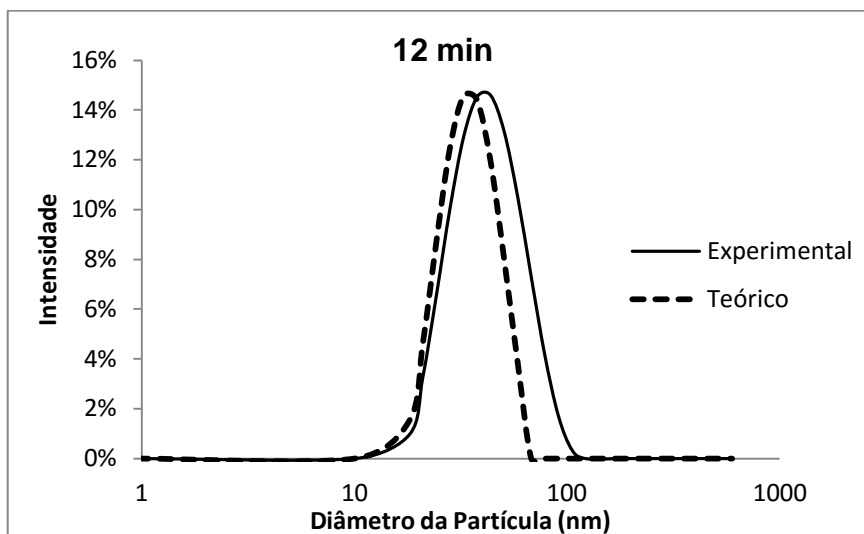
Figura 23 - Comparativo dos resultados de DLS (experimental) com os resultados teóricos a 4000 RPM (1480 RCF).

O modelo teórico também foi testado para diferentes rotações que seguiram a mesma metodologia descrita para 4000 RPM (1480). Sendo assim, as tabelas intermediárias do procedimento serão omitidas e apresentados apenas os comparativos finais para rotações de 5000 e 6000 RPM (2320 e 3000 RCF, respectivamente), conforme mostram as Tabelas 13 a 16 e Figuras 24 e 25.

Tabela 13 - Comparativo do decaimento da concentração normalizada experimental e teórica do sobrenadante de alíquotas centrifugadas a 5000 RPM (2320 RCF).

Concentração normalizada do sobrenadante de alíquotas centrifugadas a 5000 RPM (2320 RCF).						
	0 min	6 min	12 min	18 min	24 min	30 min
Experimental	1	0,753	0,630	0,536	0,469	0,401
Teórico	1	0,810	0,668	0,552	0,457	0,380
Diferença (%)	-	+7,04	+5,69	+2,90	-2,63	-5,53





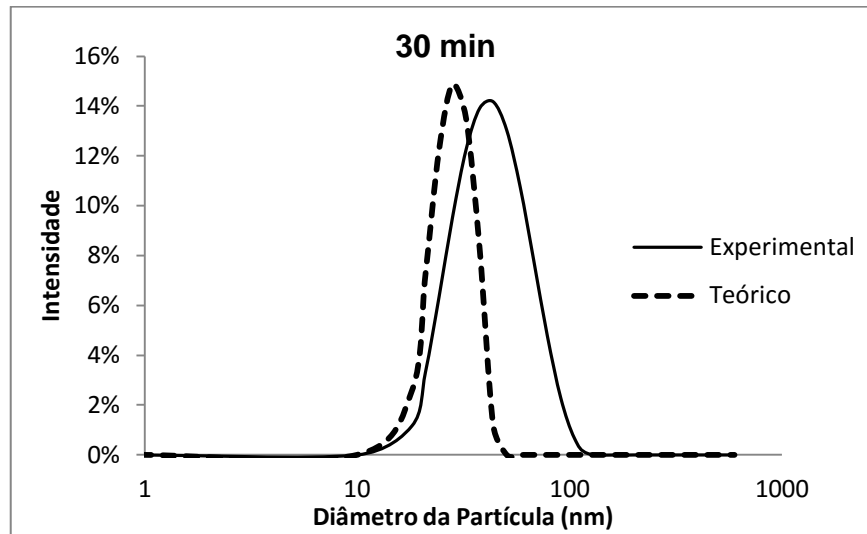


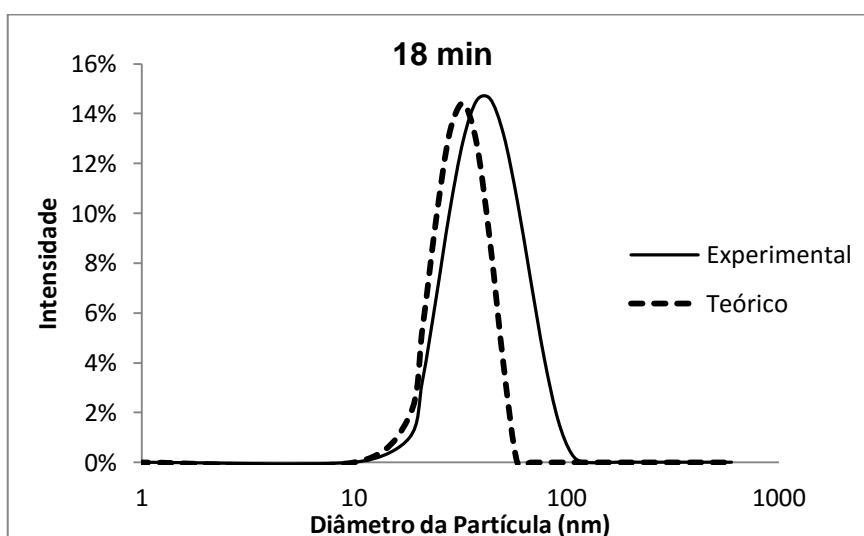
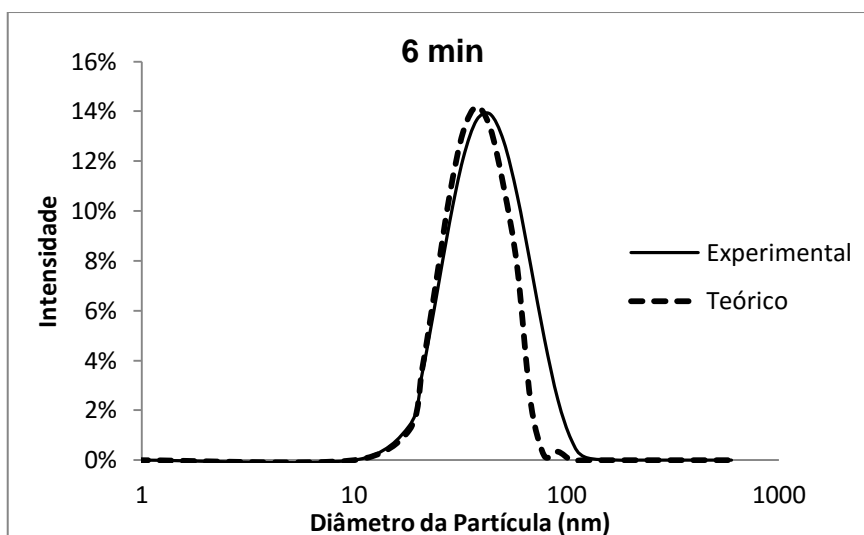
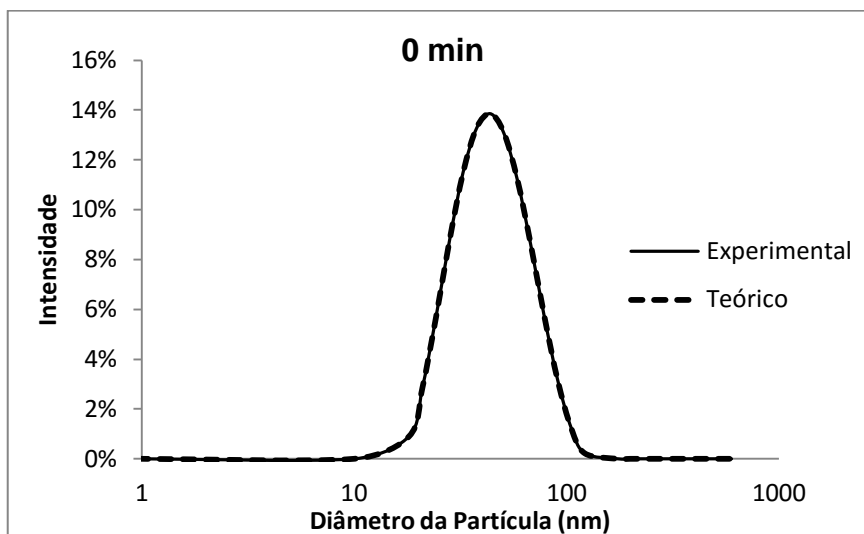
Figura 24 - Comparativo dos resultados de DLS (experimental) com os resultados teóricos a 5000 RPM (2320 RCF).

Tabela 14 - Tamanho granulométrico médio experimental e teórico baseados nos resultados de DLS centrifugados a 5000 RPM (2320 RCF).

	Tamanho granulométrico médio (nm)					
	0 min	6 min	12 min	18 min	24 min	30 min
Experimental	43	42	41	41	41	41
Teórico	43	38	35	32,5	30,5	29
Diferença (%)	-	9,5%	14,6%	20,7%	25,6%	29,3%

Tabela 15- Comparativo do decaimento da concentração normalizada experimental e teórica do sobrenadante de alíquotas centrifugadas a 6000 RPM (3380 RCF).

	Concentração normalizada do sobrenadante de alíquotas centrifugadas a 6000 RPM (3380 RCF).					
	0 min	6 min	12 min	18 min	24 min	30 min
Experimental	1	0,587	0,420	0,308	0,218	0,185
Teórico	1	0,696	0,499	0,360	0,261	0,189
Diferença (%)	-	+15,6	+15,8	+14,4	+16,4	+2,12



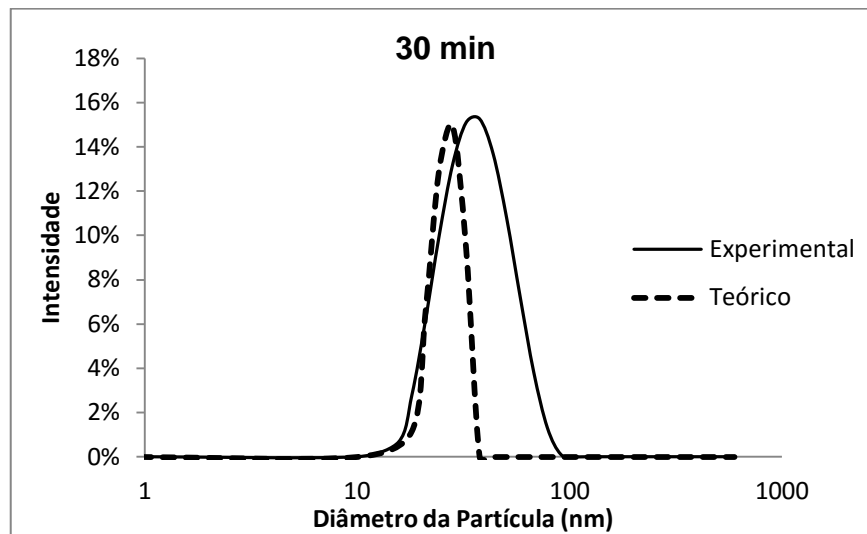


Figura 25 - Comparativo dos resultados de DLS (experimental) com os resultados teóricos a 6000 RPM (3380 RCF).

Tabela 16 - Tamanho granulométrico médio experimental e teórico baseados nos resultados de DLS centrifugados a 6000 RPM (3380 RCF).

	Tamanho granulométrico médio (nm)			
	0 min	6 min	18 min	30 min
Experimental	47	42	38,5	36
Teórico	47	38,5	31,5	28
Diferença (%)	-	8,3%	18,2%	22,2%

Observam-se maiores desvios entre modelo e experimento à medida que a rotação aumenta, em três aspectos. Primeiramente, a concentração de sólidos no sobrenadante cai mais suavemente que o previsto pelo modelo (Tabelas 13 e 15), sendo que na maior rotação a taxa de sedimentação experimental é maior que a prevista. Em segundo lugar, a distribuição de tamanhos do sobrenadante é mais larga que a prevista. Finalmente, os tamanhos médios de partícula do sobrenadante são maiores que os previstos (Tabelas 14 e 16). Em conjunto estes resultados mostram que a centrifugação tem uma eficiência de separação granulométrica inferior à prevista pelo modelo. Tais desvios podem ser atribuídos tanto a interferências relativas à parte experimental, tais como vibrações na centrífuga, manipulação da cela centrífuga e de pipetas, como também a deficiências do modelo matemático, tais como alguma relação do arraste, premissa de partícula isolada ou interação eletrostática.

7. CONCLUSÕES

A centrifugação de nanopartículas de prata em meio aquoso foi estudada teoricamente. Um modelo matemático foi aplicado o qual permite avaliar a taxa e os mecanismos dominantes da sedimentação das nanopartículas em meio diluído, isto é, quando não há interação entre as partículas. Os efeitos de variáveis importantes de separação foram considerados, tais como a densidade da partícula, o tempo de centrifugação e a taxa de rotação.

Uma separação moderada de nanopartículas de prata na faixa de tamanhos entre 30 e 100 nm pode ser alcançada com forças de campo facilmente impostas em equipamentos convencionais de centrifugação (a partir de 1400 RCF). Partículas acima de 100 nm podem ser facilmente separadas de partículas menores. A difusividade browniana retarda o processo, mas devido à alta densidade da prata, o efeito de campo é mais importante.

As previsões do modelo teórico foram confirmadas experimentalmente pela possibilidade de separar as partículas de maiores tamanhos, devido a sua diferença de velocidade de sedimentação. O modelo previu razoavelmente a concentração total de partículas e a sua distribuição de tamanhos em diferentes tempos de centrifugação para forças de campo baixas (1480 RCF). Para maiores forças de campo, houve uma sedimentação mais acelerada que a prevista.

Conclui-se que a centrifugação é um método eficiente, simples e rápido para separação granulométrica de nanopartículas densas com alta dispersividade (partículas entre 30 e 150 nm). Contudo, recomenda-se não trabalhar em altas rotações (superiores a 3380 RCF) para evitar diminuição na eficiência da separação granulométrica. Rotações moderadas (entre 4000 e 5000 RPM (1480 e 2320 RCF)) são suficientes para uma separação efetiva, uma vez que a prata possui densidade bem superior à da água.

Os resultados teóricos desse trabalho não se restringem a nanopartículas de prata, mas estendem-se para a centrifugação de outros tipos de nanopartículas metálicas, que também apresentam densidades muito superiores à da água e usualmente têm dimensões nanométricas similares às aqui estudadas.

8. NOMENCLATURA

C - Concentração de nanopartículas (g/mL)

C_0 - Concentração inicial de nanopartículas (g/mL)

r - Posição da seção da cela centrífuga (m)

r_m - Posição do menisco (m)

r_b - Posição do fundo da cela (m)

s - Coeficiente de Sedimentação Svedberg (s)

D - Coeficiente de Difusividade Browniana

t - Tempo de centrifugação

$$\tau = 2sw^2t ; x = \left(\frac{r}{r_0}\right)^2 ; x_b = \left(\frac{r_b}{r_0}\right)^2 ; \varepsilon = \frac{2D}{sw^2r_0^2} ; z = 2\left(\frac{r}{r_b} - 1\right) ; e = \frac{\varepsilon}{x_b - 1} ; a = \frac{1 + x_b}{2(x_b - 1)}$$

$$\alpha = a - e ; \gamma = a + e$$

$$d = 1 - \frac{\varepsilon b}{2} ; \varepsilon_b = \frac{2D}{sw^2r_b^2} ; w = 2\left(\frac{r}{r_m} - 1\right) ; b = 1 - \frac{\varepsilon}{2}$$

Kn - Knudsen

RCF - Relative Centrifugal Force

9. REFERÊNCIAS

- BAKER, C. et al. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 2005.
- BEHLKE, J; RISTAU, O. An improved approximate solution of the Lamm equation for the simultaneous estimation of sedimentation and diffusion coefficients from sedimentation velocity experiments. *Biophysical Chemistry*, 1997.
- BEHLKE, J; RISTAU, O. A new approximate whole boundary solution of the Lamm differential equation for the analysis of sedimentation velocity experiments. *Biophysical Chemistry*, 2001.
- DAHL, J. A.; et al. Greener Nanosynthesis. *Chemical Reviews*, v. 107, n. 6, p. 2228-2269, Jun 2007.
- ELZEY, S.; GRASSIAN, V. Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. *J Nanopart Res*, 2010.
- FILIPE, V. et al. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research*, Vol. 27, No. 5, Maio 2010.
- FRIEDLANDER, S. K. *Smoke, Dust and Haze: Fundamentals of Aerosol Dynamics*. New York: Oxford University Press, 2000.
- FU-KEN, L. et al. Studying size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1062, 2005.
- FUJITA, H. *Mathematical Theory of Sedimentation Analysis*, Academic Press, New York, 1962.
- FURNO, F. et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?, *J Antimicrob Chemother*, 2004.
- HINDS, C.; *Aerosol Technology: Properties, behavior, and measurement of airborne particles*. John Wiley, 1999.
- HOLT, K.; BARD, A. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study

of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochemistry*, v. 44, n. 39, p. 13214–13223, Oct 2005.

JIANG, X., et al. Role of Citric Acid in the Formation of Silver Nanoplates through a Synergistic Reduction Approach. *Langmuir*, v. 26, n. 6, p. 4400-4408, Mar 2010.

JUNG, W. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, v. 74, n. 7, p. 2171–2178, Apr 2008.

KUMAR, S. et al. *Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 13141.

LEE, P.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 86, n. 17, p. 3391–3395, Aug 1982.

LEOPOLD, N.; LENDL, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 107, n. 24, p. 5723-5727, Jun 2003.

LI, S. et al. Separation of Gold nanorods using gradient ultracentrifugation. *Nano Res.*, 2011.

LI, Z. et al. The measurement system of nanoparticle size distribution from dynamic light scattering data. *Optics and Lasers in Engineering*, Vol. 56, Maio 2014.

LIU, J. et al. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 33, 2012.

MALVERN INSTRUMENTS; Zeta Sizer Nano Series: User Manual. Mano317, Issue 1.1, Feb de 2014.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanoparticles and potential implication for human health and the environment. *J Nanopart Res*, 2010.

MARINI, M., et al. Antibacterial activity of plastics coated with silver-doped organic-inorganic hybrid coatings prepared by sol-gel processes. *Biomacromolecules* 8:1246–1254, 2007.

MARTINÉZ-CASTAÑÓN, G.A. et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J Nanopart Res*, 2008.

McGOWAN et al., *J. Colloid Interface Sci.* 89 (1982) 94.

MERMEL et al. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Infection control and Hospital Epidemiology*, v. 22, n. 4, p. 222-242, Apr 2001.

OLIVEIRA, R. Síntese de nanopartículas de prata usando citrato de sódio, 2013. 68 páginas. Tese de mestrado – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAL, S. et al. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli.*, *Appl Environ Microbiol*, 2007.

PEN (The Project on Emerging Nanotechnologies). Disponível em <<http://www.nanotechproject.org/cpi/>> acessado em agosto de 2014.

REVISTA PESQUISA FAPESP. Disponível em <http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2014/06/012-015_Tecnociencia_22010.pdf> Ed. 220, junho de 2014.

Richards, V. N.; Rath, N. P.; Buhro, W. E. Pathway from a Molecular Precursor to Silver Nanoparticles: The Prominent Role of Aggregative Growth. *Chemistry of Materials*, v. 22, n. 11, p.3556–3567, Maio 2010.

SANTOS, C. A et al. Antimicrobial effectiveness of silver nanoparticles co-stabilized by bioactive copolymer pluronic F68. *Journal of Nanobiotechnology*, 2012,10:13.

SCHUCK, P. Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. *Biophysical Journal*, Volume 78, Março 2000.

SEINFELD, J.; PANDIS, S. *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*, 2006.

SHARMA, V. et al. Shape separation of gold nanorods using centrifugation. PNAS, 2009.

SPELTER, L. et al. Screening of Colloids by Semicontinuous Centrifugation. Chem. Eng. Technol., 35, No. 8, 2012.

WILLIAMS, S. et al, Anal. Chem. 83 (2011) 634.

ZHANG, Y., YANG, M., CUI, D., et al. Zeta potential: A surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. Biomedical Microdevices, 10(2), 321–328, 2008.