

SEPARAÇÃO GRANULOMÉTRICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR CENTRIFUGAÇÃO.

W. F. de SOUSA, C. A. dos SANTOS e M. M. SECKLER

Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica

E-mail para contato: waltersousa88@gmail.com

RESUMO – Nanopartículas de prata (AgNPs) vêm ganhando importância na prevenção contra infecções, principalmente pela sua incorporação em dispositivos médicos, tecidos e outros produtos relacionados. Estudos prévios indicaram que AgNPs de menores tamanhos têm ação biocida mais efetiva (Martínez-Castañón, G. A. *et al.*, 2008). Nesse contexto, 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 pela simplicidade. Um modelo de perfil de concentração de AgNP na cela em função do tempo de centrifugação foi proposto a partir da Equação de Lamm (Behlke, J; Ristau, O., 1997), considerando a difusividade Browniana e o coeficiente Svedberg calculado a partir do balanço de forças. A equação foi resolvida com solução analítica proposta por Fujita (1962). O modelo mostrou que o movimento Browniano retarda a sedimentação, mas não impede a separação. Esta previsão foi comprovada experimentalmente pela separação completa de nanopartículas de prata com dimensões entre 2 e 50 nm.

1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas de prata (AgNPs) têm atraído muita atenção nos últimos anos por suas diversas aplicações, entre elas a ação antimicrobiana. Esta vem ganhando particular importância por ser muito mais efetiva em termos de concentração mínima inibitória do que seus homólogos iônicos (Santos, C. A. *et al.*, 2012), 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 AgNPs em comparação aos antibióticos convencionais, isso ocorre porque metais em escala nanométrica atuam em diversos estágios vitais de bactérias e vírus, requerendo diversas mutações consecutivas para o desenvolvimento de resistência sobre eles (Backer, C. *et al.*, 2005). Estudos recentes apontam que partículas de menores tamanhos tornam o poder antimicrobiano ainda maior. Nesse contexto, AgNPs ainda mais efetivas poderão ser obtidas com o desenvolvimento de processos pós-síntese que controlem melhor a concentração e tamanho das partículas.

Diversos métodos de separação granulométrica têm sido empregados para nanopartículas, cujas principais características são apresentadas na TABELA 1. 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 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 1 - Comparação dos Métodos de Separação.

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

Pode-se observar que na maioria dos casos a escala nanométrica está fora do domínio nos processos de separação convencionais de Engenharia Química. A partir disso, nesse trabalho busca-se estender o conhecimento sobre o mesmo em prol do seu grande potencial de uso na área médica. A centrifugação foi estudada teórica e experimentalmente.

2. MODELO DE SEDIMENTAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SOB AÇÃO DA FORÇA CENTRÍFUGA

A sedimentação de AgNPs em solução aquosa sob ação da força centrífuga foi 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 analítica proposta por Fujita (1962), foi possível estabelecer parâmetros do processo de separação como velocidade de rotação e tempo de centrifugação. O desempenho da centrifugação foi avaliado analisando-se as partículas do sobrenadante em diversos tempos e velocidades de rotação.

2.1. Abordagem e Premissas

Primeiramente foi estimado número Knudsen (relação da dimensão da partícula com livre caminho médio) em função de diferentes dimensões de AgNPs. Este adimensional guia o tipo de abordagem dada ao problema: se podemos considerar o fluido como meio contínuo (mecânica dos meios contínuos, equações de Navier-Stokes, funções contínuas) ou se sua dimensão é tão pequena que ele deve ser tratado de forma discreta, em nível molecular (mecânica estatística, teoria cinética dos gases, funções discretas) (Friedlander, S. K., 2000). A TABELA 2 nos mostra esses resultados para AgNPs em meio aquoso a temperatura ambiente (20°C):

Tabela 2 - Número de Knudsen

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

$$Kn = \frac{2\lambda}{D_p}$$

Kn - Número de Knudsen

D_p - Diâmetro da Partícula

λ - Livre Caminho Médio

Como o número de Knudsen tende a zero mesmo para as menores partículas, o fluido pode ser tratado como meio contínuo. Sendo assim, propõe-se um balanço de forças (FIGURA 1) de uma partícula sob ação de campo externo com algumas premissas importantes: a partícula é considerada esférica e isolada (meio bastante diluído). A figura mostra a secção de uma cela centrífuga que gira conforme indicado pela seta.

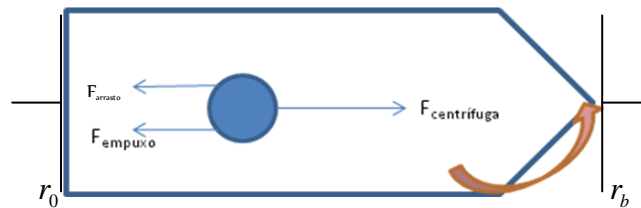


Figura 1 - Balanço de Forças de uma partícula sob ação de força externa.

$$\text{Onde no equilíbrio: } F_{\text{arrasto}} + F_{\text{empuxo}} + F_{\text{centrífuga}} = 0 \quad (1)$$

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

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

$$V = \frac{w^2 r (m - m_0)}{3\pi\mu D_p} \quad (3)$$

m - massa partícula
 m_0 - massa do líquido deslocado
 w - velocidade angular
 r - distancia ao centro da centrífuga
 C_c - fator de escorregamento

2.2. Equação de Lamm

A partir das informações prévias, é possível modelar o perfil de concentração de nanopartículas em função do tempo e do raio da centrífuga, considerando que não há convecção do fluido na cela centrífuga, conforme a equação diferencial (4). A nomenclatura é apresentada no final do trabalho.

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \vec{V} \cdot \vec{\text{grad}} C = \text{div}(D \vec{\text{grad}} C) - \text{div}(\vec{v} C) \quad (4)$$

0 (Fluido parado)

Escrevendo radialmente a equação (4), chega-se à Equação de Lamm:

$$\boxed{\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[rD \frac{\partial C}{\partial r} - sw^2 rC \right]} \quad (5)$$

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

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

Com as seguintes condições de contorno (C.C.):

C.C. inicial: $t = 0$; $C = C_0$; $r_0 < r < r_b$

C.C no menisco: $t > 0$; $D \frac{\partial C}{\partial r} = rw^2 sC$; $r = r_0$

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

3.3. Solução Analítica

Soluções analíticas fechadas para a equação do transporte de Lamm não são disponíveis dentro das condições de contorno requeridas (Behlke, J; Ristau, O., 1997). No entanto, nos anos sessenta, Fujita desenvolveu algumas soluções aproximadas (Fujita 1962), entre as quais a equação (6).

$$C = \frac{C_0}{2} e^{-\tau} \left\{ \begin{aligned} &2 - \operatorname{erfc}\left(\frac{z - \tau\alpha}{2\sqrt{ae\tau}}\right) - \frac{a}{e} \exp\left(\frac{z\alpha}{ae}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{\tau\alpha + z}{2\sqrt{ae\tau}}\right) + \frac{\gamma}{e} \exp\left(\frac{e\tau + z}{e}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{\tau\gamma + z}{2\sqrt{ae\tau}}\right) \\ &- \operatorname{erfc}\left(\frac{1 - z + \alpha\tau}{2\sqrt{ae\tau}}\right) - \frac{a}{e} \exp\left(\frac{-\alpha(1 - z)}{ae}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{1 - z - \alpha\tau}{2\sqrt{ae\tau}}\right) \\ &+ \frac{\gamma}{e} \exp\left(\frac{e\tau - 1 + z}{e}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{1 - z - \gamma\tau}{2\sqrt{ae\tau}}\right) \end{aligned} \right\} \quad (6)$$

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Para síntese das AgNPs, foi utilizado o método de Turkevich adaptado para prata, que se mostrou vantajoso por sua rapidez, custo baixo, reprodutibilidade boa e não ser tóxico ao ser humano nem ao meio ambiente (Oliveira, R., 2013). Neste, o íon de prata é reduzido pelo citrato de sódio.

Basicamente, para a síntese de AgNPs coloca-se 0,5L de água mili-Q em um cristalizador encamisado, liga-se um agitador a 1000 RPM e aquece-se a 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. Após 20 minutos de reação, retira-se a solução do reator e deixa-se resfriar a temperatura ambiente.

Amostras dessa dispersão de 1,5 ml são centrifugadas em variadas rotações, retirando-se alíquotas do sobrenadante de 15 em 15 minutos para caracterização. Essas alíquotas são caracterizadas por DLS e comparadas com a solução antes da centrifugação e também com o modelo proposto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo matemático revela que as partículas de maiores tamanhos sedimentam mais rápido que as menores conforme FIGURA 2 para uma rotação de 5000 RPM. 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 AgNPs onde o efeito da força centrífuga prevalece.

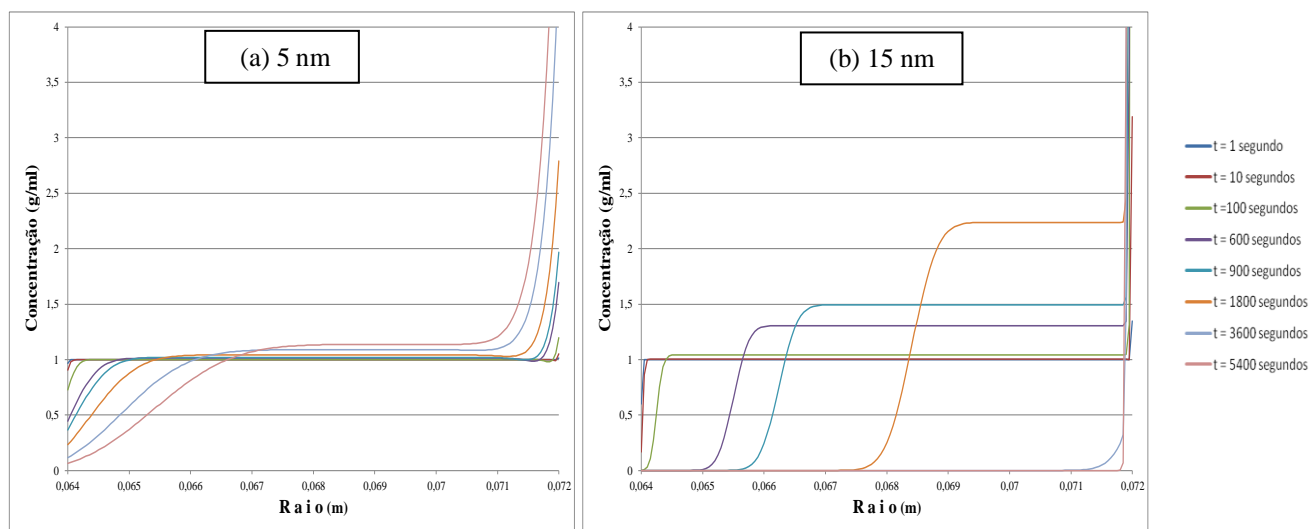


Figura 2- Distribuição da concentração radial calculada pela equação (6) para AgNPs de diferentes tamanhos ((a) 5 e (b) 15 nm) sob rotação de 5000 RPM. A simulação foi obtida para concentrações iniciais $C_0 = 0,998$, $T = 22^\circ\text{C}$, difusividade browniana estimada (a) $D=9,27 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ 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 intensidades de rotação, conforme FIGURA 3. Para partículas de um mesmo tamanho (no exemplo, de 5 nm) observa-se que a sedimentação é mais rápida no mesmo sentido da intensidade de rotação, conforme esperado.

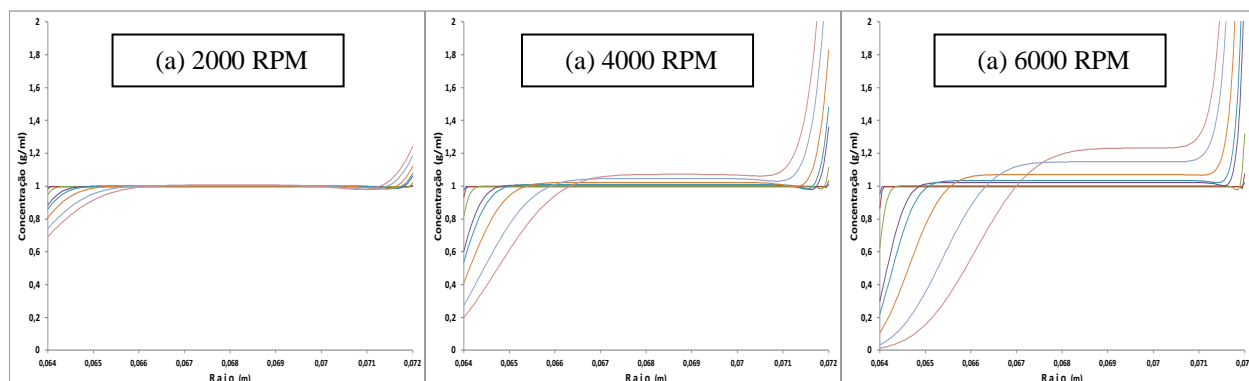


Figura 3 - Distribuição da concentração radial calculada pela equação (6) para AgNPs de tamanho 5 nm sob rotações de (a) 2000, (b) 4000 e (c) 6000 RPM . A simulação foi obtida para concentrações iniciais $C_0 = 0,998$, $T = 22^\circ \text{C}$, difusividade browniana estimada $D=9,27 \text{ E-}11 \text{ m}^2/\text{s}$ e coeficiente de Svedberg $s = 141,5 \text{ S}$.

Com a simulação foi possível quantificar variáveis de separação como taxa e tempo de rotação em uma centrífuga. Nota-se que centrífugas comuns são capazes de sedimentar as AgNPs na faixa de tamanho entre 5 e 15 nm, uma vez que a densidade da prata é bastante superior à do meio aquoso.

Para avaliar o desempenho desse método de separação, AgNPs foram sintetizadas e centrifugadas. Alíquotas de seu sobrenadante analisadas a cada 15 minutos sob centrifuga (EPPENDORF Centrifuge 5415R) a 5000 RPM e temperatura de 22°C . As alíquotas foram posteriormente caracterizadas por DLS (COULTER N4 Plus Submicron Particle Size Analysis).

Conforme TABELA 3, os tamanhos médios das AgNPs diminuíram conforme aumentava o tempo de centrifugação, indicando que menores tamanhos podem ser obtidos com esse processo pós-síntese, conforme previa o modelo.

Tabela 3 - Tamanhos das partículas nos sobrenadantes por DLS para tamanho médio e desvio padrão em diferentes tempos de centrifugação a 5000 RPM e 22°C .

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

6. CONCLUSÕES

A centrifugação de nanopartículas de prata em meio aquoso foi estudada teoricamente. A difusão molecular retarda o processo, mas devido à alta densidade da prata, uma separação granulométrica eficiente é possível com rotações moderadas. Tais previsões do modelo foram confirmadas experimentalmente pela possibilidade de separar completamente nanopartículas com

tamanhos entre 2 e 50 nm. Conclui-se que a centrifugação é um método eficiente, simples e rápido para esse tipo de separação. Os resultados desse estudo não se restringem a nanopartículas de prata, mas estendem-se para a centrifugação de outros tipos de nanopartículas.

7. NOMENCLATURA

C - Concentração de nanopartículas (g/mL)

C_0 - Concentração inicial de nanopartículas (g/mL)

r - Posição da seção da cela centrífuga (m)

r_0 - 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

Adimensionais

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

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

8. REFERÊNCIAS

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

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

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.

OLIVEIRA, R. Síntese de nanopartículas de prata usando citrato de sódio, 2013.

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

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

FRIEDLANDER, S. K. Smoke, Dust and Haze: Fundamentals of Aerosol Dynamics. New York: Oxford University Press, 2000.

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

BAKER, C. *et al.* Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol, 2005.

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.