

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



1150010441



IQ

T/UNICAMP C823c

" Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por Maria Célia Pires Costa e Aprovado pela Comissão Julgadora".

Campinas, 3 / 4 / 89

Fernando Galembeck



CENTRIFUGAÇÃO E OSMOCENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTES DE DENSIDADE: Aplicação ao Fracionamento e Caracterização de Partículas e Formação de Uma Nova Classe de Estruturas Dissipativas.

MARIA CÉLIA PIRES COSTA

TESE DE DOUTORAMENTO

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO GALEMBECK

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Química  
Biblioteca

À memória dos meus pais, Venâncio e  
Inácia, pelo exemplo de trabalho e  
determinação que me permitiram che-  
gar ate aqui.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck, pelo entusiasmo e dedicação que sempre demonstrou na orientação desta tese.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira, pela discussão estimulante acerca da formação de estruturas dissipativas.

Aos funcionários, professores e amigos do Instituto de Química da UNICAMP pelo ambiente saudável e propício à atividade científica.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Maranhão, pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Antonio Benedito da Silva, chefe do DQ da UFMA, pelo apoio recebido no decorrer deste trabalho.

Ao Carlos Bonafé, pela colaboração nos trabalhos realizados com a eritrocruorina.

A Policarpo, Marcos, Raquel, Esther e Rute cuja solidariedade me foi imprescindível para a execução desta tarefa.

A Eva e Aderbal pelo incentivo constante e grande amizade.

A Valda pelo empenho na datilografia deste texto.

Ao Mário pela execução impecável das fotografias.

À CAPES pela bolsa recebida.

## RESUMO

Esta tese compreende quatro partes. 1. Descrição de uma nova metodologia para o fracionamento e determinação do diâmetro de partículas esféricas, que foi verificada usando-se látex de PS. Zonas de mistura de látexes poliméricos, na faixa de 0,1-0,5  $\mu\text{m}$ , são colocadas sobre gradientes de densidade e centrifugadas, obtendo-se a separação de bandas de látex, das quais o polímero pode ser coletado e analisado posteriormente. As velocidades de migração das bandas nos experimentos de osmocentrifugação zonal são mais rápidas que em centrifugação zonal. 2. Estudo da agregação de partículas de látex de PS. O sobrenadante de um látex (0,109  $\mu\text{m}$ ) coagulado irreversivelmente, foi fracionado em seis bandas correspondentes a singletes, dubletes, até hexapletes. Usando um outro látex (0,460  $\mu\text{m}$ ) em diferentes concentrações de NaCl (abaixo e acima da concentração crítica de coagulação), a centrifugação zonal do látex revelou várias bandas, mesmo a  $[\text{NaCl}] = 5 \times 10^{-5}$  M. Esta técnica permite verificar a existência de espécies agregadas de látex e sua dependência com a concentração de eletrólito e tempo de coagulação. 3. Determinação do coeficiente de sedimentação da eritrocruorina de Glossoscolex paulistus, uma hemoglobina gigante extracelular de anelídeo, utilizando a metodologia desenvolvida na primeira parte da tese. Sobre o gradiente de densidade foram aplicadas amostras da proteína (50  $\mu\text{l}$  cada; concentrações 2,5; 5,0; 6,25 e 12,5 mg/ml), centrifugadas a 4000 rpm, 4°C por 48 h. Foi obtido  $s_{20,w} = 58$  S, que corresponde (para eritrocruorina) à massa molar de  $3,23 \times 10^6$  Daltons. 4. Formação de estruturas dissipativas em células de diálise. Em experimentos de osmocentrifugação zonal com amostras de alta concentra-

ção de eritrocruorina (125 mg/ml) e hemoglobina humana (92,4 mg/ml) é observada a formação de múltiplas bandas (estriamento) em toda a célula de diálise gerando um padrão periódico de concentração. É proposto um modelo para essas estruturas, baseado na formação de gradientes de concentração, nas bandas, seguido de convecção.

ABSTRACT

This thesis has four parts: 1. Description of a new methodology for the fractionation and determination of poly-(styrene) latex particles diameters. Mixed polymer latex zones in the 0.1 - 0.5  $\mu\text{m}$  diameter range were layered over density gradients and centrifuged. Separate latex bands were obtained, from which polymer may be collected and further analysed. The movement of the sedimenting latex zones is faster in osmocentrifugation than in normal sedimentation experiments. 2. Study of poly(styrene) latex particles aggregation. The supernatant of a (nominal) 0.109  $\mu\text{m}$  latex, which coagulated accidentally, was fractionated in size bands corresponded to singlets, dublets up to hexaplets. Using another latex, to which NaCl was added to give various salt concentrations (above and below the critical coagulation concentration), latex zonal centrifugation revealed various bands, even at  $[\text{NaCl}] = 5 \times 10^{-5}$  M. This demonstrates the existence of the aggregate species and their dependence on electrolyte concentration and coagulation time. 3. The determination of the sedimentation coefficient of erythrocrucorin from Glossoscolex paulistus, a extracellular giant hemoglobin by low-speed zonal centrifugation. Erythrocrucorin solutions (50  $\mu\text{l}$ : concentrations, 2.5, 5.0, 6.25 and 12.5 mg/ml) were layered on top of the density gradients and centrifuged at 4000 rpm, 4°C: The value obtained,  $s_{20,w} = 58$  S, corresponds to a MW of  $3.1 \times 10^6$  Daltons. 4. A study on the formation of dissipative structures in zonal osmocentrifugation. In experiments of zonal centrifugation of concentrated erythrocrucorin (125 mg/ml) and human hemoglobin (92.4 mg/ml), many bands, are formed throughout the dialysis cell, producing a

periodic concentration pattern. A model for the formation of these structures is proposed, based on formation of concentration gradients in the sedimenting zone, followed by convection.

## ÍNDICE

	pag.
Resumo .....	i
Abstract .....	iii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1. Moléculas e partículas .....	1
1.2. Métodos de fracionamento e determinação do tamanho de partículas .....	2
1.2.1. Microscopia eletrônica .....	4
1.2.2. Microscopia de campo escuro - ultra- microscópio .....	7
1.2.3. Extinção de luz .....	8
1.2.4. Espalhamento de luz .....	12
1.2.5. Centrifugação em gradiente de den- sidade .....	15
1.2.5.1. Formação de gradientes de densidade por osmocentri- fugação .....	16
1.2.5.2. Formação de gradientes de densidade por ultrafil- tração centrífuga .....	21
1.2.5.3. Fracionamento de partículas ....	22
1.3. Fundamentos teóricos: cálculo do coefi- ciente de sedimentação de partículas em gradiente de densidade .....	23
1.4. Objetivos .....	28
2. FRACIONAMENTO DE PARTÍCULAS DE LÁTEX DE POLIES- TIRENO (PS) .....	30

	pag.
2.1. Introdução: sistemas coloidais .....	30
2.1.1. Látex de PS .....	30
2.1.1.1. Obtenção de látex de poli- estireno via mecanismo de polimerização em emulsão .....	32
2.1.1.2. Obtenção de látex de poli- estireno via mecanismo de polimerização por dispersão ....	34
2.1.1.3. Características das partícu- las de látex .....	35
2.1.1.4. Estudo do látex de PS por centrifugação em gradiente de densidade .....	38
2.2. Parte experimental e resultados .....	39
2.2.1. Materiais e equipamentos .....	39
2.2.2. Curvas de calibração .....	40
2.2.3. Preparação das membranas .....	44
2.2.4. Células de osmocentrifugação .....	44
2.2.5. Obtenção de gradientes de densidade auto-gerados por osmocentrifugação e ultrafiltração centrífuga .....	48
2.2.6. Fracionamento de látex de poliesti- reno em gradiente de densidade de Ficoll .....	53
2.2.7. Estabilidade do gradiente de densi- dade em célula de osmocentrifugação .....	58
2.2.8. Velocidade de migração da banda de látex em osmocentrifugação e em cen- trifugação normal .....	59

2.2.9. Fracionamento de partículas de látex de alta resolução .....	60
2.3. Discussão .....	64
3. ESTUDOS DE AGREGAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO TA- MANHO DE PARTÍCULAS DE PS .....	66
3.1. Introdução: agregação de partículas de látex PS .....	66
3.1.1. Tipos de agregação .....	71
3.1.2. Determinação experimental da ccc .....	71
3.1.3. Estabilidade coloidal .....	74
3.1.4. Agregação no mínimo primário: coagulação .....	76
3.1.5. Agregação do mínimo secundário: floculação .....	78
3.2. Parte experimental e resultados .....	81
3.2.1. Materiais e equipamentos .....	81
3.2.2. Tipos de experimentos .....	82
3.2.3. Estabilidade dos gradientes de densidade de Ficoll .....	83
3.2.4. Agregação e determinação do tamanho de partículas de látex .....	85
3.2.4.1. Amostra I .....	85
3.2.4.2. Amostra II .....	88
3.3. Discussão .....	92
4. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE SEDIMENTAÇÃO E PESO MOLECULAR DA ERITROCRUORINA.....	95
4.1. Introdução: eritrocrucorina .....	95

	pag.
4.2. Parte experimental e resultados .....	96
4.2.1. Materiais e equipamentos .....	96
4.2.2. Obtenção de gradientes de densi- dade auto-gerados por osmocen- trifugação .....	97
4.2.3. Experimentos de centrifugação zonal .....	99
4.3. Discussão .....	100
5. FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS DISSIPATIVAS EM CÉLU- LAS DE DIÁLISE .....	106
5.1. Introdução .....	106
5.1.1. Características termodinâmicas dos sistemas encontrados na natureza .....	107
5.1.2. Fundamentos da teoria de esta- bilidade termodinâmica e a pro- dução de entropia .....	109
5.1.3. Aplicação a fenômenos macros- côpicos .....	119
5.1.3.1. Reação de Belousov- Zhabotinsky .....	119
5.1.3.2. Células de Bénard .....	125
5.2. Parte experimental e resultados .....	129
5.2.1. Materiais e equipamentos .....	129
5.2.2. Obtenção de gradientes de densi- dade auto-gerados por osmocentri- fugação .....	130
5.2.3. Centrifugação zonal com amostras de alta concentração de proteína .....	131

5.2.4. Osmocentrifugação zonal com amostras de alta concentração de proteína .....	133
5.2.4.1. Experimentos realizados .....	135
5.3. Resultados .....	137
5.3.1. Efeito da concentração .....	137
5.3.2. Efeito do tipo de material .....	139
5.3.3. Efeito do tipo de gradiente .....	139
5.3.4. Efeito de geometria da célula .....	
5.3.5. Efeito de fluxo do solvente .....	140
5.4. Discussão .....	143
6. CONCLUSÃO GERAL .....	146
7. PERSPECTIVAS .....	147
8. REFERÊNCIAS .....	148

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Esta tese ilustra a utilização de uma mesma metodologia, a sedimentação em gradientes de densidade gerados por osmocentrifugação, para resolver problemas diversos (separar e determinar o tamanho de partículas de látex em escala preparativa e analítica, separar e caracterizar agregados de partículas de látex, determinar o coeficiente de sedimentação e massa molar de uma hemoglobina gigante). Nesta tese é também apresentado um novo tipo de estrutura dissipativa formada em experimentos de osmocentrifugação zonal.

A organização da tese compreende uma introdução geral (capítulo 1) onde são descritos: (i) moléculas e partículas, (ii) métodos de fracionamento e determinação do tamanho de partículas, (iii) fundamentos teóricos do cálculo do coeficiente de sedimentação de partículas em gradientes de densidade e (iv) objetivos. Cada um dos capítulos de 2 a 5 compreende uma introdução, parte experimental, resultados e discussão relativos a cada um dos objetivos desta tese. O capítulo 6 destina-se à conclusão geral e o capítulo 7 à discussão das perspectivas deste trabalho. As referências estão no capítulo 8.

### 1.1. Moléculas e Partículas

Muitos químicos e biólogos consideram o mundo como sendo composto de moléculas, e em particular eles consideram o mundo biológico como sendo composto de moléculas orgânicas. Price (1) considera esse ponto de vista como uma abstração bem sucedida, entre outras possíveis abstrações (forças, campos, sistemas, popula-

ções, potenciais e muitas outras). Apesar disso, propõe a noção de partícula como uma abstração alternativa e complementar à noção de molécula.

Desde este ponto de vista, macromoléculas, micromoléculas, multimoléculas, células, proteínas e assim por diante, são consideradas como partículas.

A beleza das "partículas", e sua vantagem sobre moléculas, é que partículas têm propriedades físicas que são mensuráveis e exploráveis, mesmo quando a sua composição química não é suficientemente conhecida. Assim, a idéia de partícula proporciona a oportunidade para a realização de um tratamento quantitativo e denominação sem ambiguidade de agregados desconhecidos; ela também provê uma estratégia útil para trabalhos de separação e caracterização.

Quatro principais propriedades, de partículas químicas e biológicas, têm sido utilizadas na sua separação e caracterização. Centrifugação dá crédito, principalmente, a tamanho e densidade. Eletroforese usa carga e massa. Finalmente, técnicas de separação de fase racionalizadas e exploradas por Albertsson (2), usam propriedades de superfície.

Neste trabalho, osmocentrifugação (3) é usada tanto como técnica de separação como para produzir gradientes de densidade úteis em experimentos de centrifugação zonal. Esta técnica tem por objetivo a separação e/ou caracterização de partículas, usando como propriedades tamanho e densidade.

## 1.2. Métodos de Fracionamento e de Determinação do Tamanho de Partículas

O fracionamento e/ou a caracterização de partículas, tanto em dispersão como em solução, requer a avaliação de muitas propriedades importantes como a distribuição de tamanhos e de densidades das partículas (4). Na literatura são encontradas várias técnicas que atendem a esse objetivo, tais como: microscopia eletrônica (5-7), turbidimetria (8-11), espalhamento de luz (6,12-17), ultramicroscopia de fluxo (15,18-19), ultracentrifugação (13,20-21), "soap titration" (22), espalhamento de raio-X a baixo e intermediário ângulos (23), contadores tipo "Coulter" (24), fracionamento em campo de fluxo (25), eletroforese (26), cromatografia de permeação em gel (27). Cada uma destas técnicas tem vantagens e desvantagens. Por exemplo, experimentos de ultracentrifugação são relativamente rápidos, podendo ser completados em poucas horas; é um método absoluto que requer, como dados auxiliares, a viscosidade e a densidade do meio, além da densidade das partículas, que pode ser determinada na própria ultracentrífuga. O equipamento necessário é bastante caro, assim como os reagentes utilizados; o método exige ainda operadores altamente especializados. Das técnicas citadas, nenhuma é adequada para o controle de rotina, o que torna necessário buscar um método que determine rapidamente o tamanho das partículas de látex, de modo a que os resultados obtidos possam ser usados para controle do processo de polimerização por emulsão.

De modo geral, a escolha do método para a análise, do tamanho de partículas depende, primeiro, da própria faixa de tamanho de partículas, e em segundo da combinação de fases do sistema (28). Nas tabelas 1.1 e 1.2 são apresentados, respectivamente, uma lista de combinações de fases e dos métodos mais usuais.

Tabela 1.1. Combinação de fases em sistemas coloidais.

Fase dispersa	Fase contínua	Exemplo
1. gás	líquido	espuma
2. gás	sólido	material poroso
3. líquido	gás	névoa
4. líquido	líquido	emulsão
5. líquido	sólido	emulsão sólida
6. sólido	gás	poeira, fumaça
7. sólido	líquido	suspensão, sol*
8. sólido	sólido	solução sólida

\* O termo sol é usado para distinguir suspensões coloidais de suspensões macroscópicas.

Nesta introdução é apresentado um resumo dos principais métodos (microscopia eletrônica, ultramicroscopia, absorção de luz, espalhamento de luz, centrifugação em gradiente de densidade), utilizados para o fracionamento e/ou caracterização de partículas poliméricas, baseados principalmente na determinação do tamanho de partículas agregadas e não agregadas.

### 1.2.1. Microscopia Eletrônica

Microscopia eletrônica é usada como um método absoluto na análise do tamanho de partículas, visto que, é o único método onde as partículas individuais são observadas e medidas diretamente. Ele também permite o exame da forma e composição das partículas com uma grande sensibilidade. A qualidade da amostra analisada é um fator limitante ao uso do microscópio eletrônico para sistemas coloidais. A necessidade de alto vácuo para permitir um mo-

Tabela 1.2. Métodos para a determinação do tamanho de partículas.

Método	Combinação de fase (*)	Intervalo de tamanho ( $\mu\text{m}$ )
Microscopia	1,3,4,6,7,(5),(8)	0,4 - 100
Ultramicroscopia	3,4,6,7,(5),(8)	0,01 - 2
Microscopia eletrônica	6,7,(8)	0,0005 - 5
Espalhamento de luz	3,4,6,7,(5),(8)	0,1 - 30
Análise de raios-X	6	0,005 - 1
Classificação com peneira	6,7	acima de 40
Ultrafiltração	7	acima de 0,002
Sedimentação	3,6,7	1 - 50
Centrifugação	7	0,01 - 1
Ultracentrifugação	7	0,0005 - 0,01
Frac. por sedim. em campo de fluxo	7	0,01 - 1,0
Elutriação	6,7	1 - 100
Difusimetria	7	até 0,1
Osmometria	7	até 0,1
Cromatografia de permeação em gel		até 0,1
Viscosimetria	4,7	duas dimensões menores que 0,0001
Permeamtria	2,6	0,5 - 100
Adsorção	2,6,7	0,002 - 50
Condutometria	7	em torno de 0,2
Radiometria	3,4,6,7	em torno de 0,002

(\*) As combinações de fase dadas em parênteses somente podem ser estudadas se o meio for transparente.

vimento desimpedido dos elétrons exige, de qualquer sistema que apresente uma pressão de vapor apreciável, uma secagem cuidadosa antes de ser observado. Esse tratamento prévio pode danificar a amostra em observação. Também a instabilidade da amostra frente a feixes de elétrons pode causar a sua deformação (5-7).

### Poder de resolução

O cálculo da resolução de um microscópio eletrônico (isto é, a menor distância de separação entre dois objetos distinguíveis) depende do comprimento de onda dos elétrons, que é função da sua velocidade de deslocamento. No microscópio, esta velocidade é função da tensão sob a qual os elétrons são acelerados.

A relação entre o comprimento de onda (em Å) e a voltagem da aceleração E (em Volts), é

$$\lambda = \left( \frac{h^2}{2em_e E} \right)^{1/2} = \left( \frac{150}{E} \right)^{1/2} \quad [1.1]$$

onde  $h$  é a constante de Planck,  $e$  a carga de um elétron e  $m_e$  a massa do elétron.

Pode-se produzir feixes de elétrons com comprimentos de onda da ordem de 0,01 nm; esses feixes podem ser focalizados por campos elétricos ou magnéticos, gerados por lentes.

### O microscópio eletrônico

Uma pequena fração do material é depositada como um filme transparente aos elétrons, apoiado em uma fina rede de cobre. A amostra provoca o espalhamento dos elétrons para fora do campo, e a imagem final pode ser visualizada numa tela fluorescente. Materiais orgânicos são relativamente transparentes a elétrons e mostram pouco contraste em relação ao suporte.

Para acentuar o contraste e obter efeitos tridimensionais, é empregada geralmente a técnica de sombreamento. Um metal

pesado como o ouro é evaporado a vácuo sobre o objeto em análise, e segundo um ângulo conhecido, permitirá o surgimento de um efeito de iluminação lateral. A partir das dimensões das sombras projetadas e do ângulo segundo o qual elas são formadas, é possível construir um modelo tridimensional dos objetos estudados. Um resultado ainda melhor é obtido projetando-se sombras segundo duas direções ortogonais.

Uma técnica muito útil para o estudo de estruturas nas superfícies de objetos é a formação de réplicas. Um desses métodos consiste em depositar a amostra numa superfície recém-clivada de mica e evaporar sobre ela, a vácuo, carbono (ou, se desejado, em metal pesado). A fina película resultante na qual estão localizadas as partículas da amostra, é removida da mica por ação da água. A cópia assim obtida é fixada sobre o retículo de cobre para estudo.

### 1.2.2 Microscopia de campo escuro - ultramicroscópio

A iluminação em campo escuro é uma técnica muito útil para o estudo de dispersões coloidais, fornecendo informações sobre: a presença de partículas em suspensão, a determinação do seu número e investigação do seu movimento. Para isso, dispõe-se de um sistema de iluminação de um microscópio comum, de modo que a luz só penetre pela objetiva depois de espalhada pela amostra em estudo.

O ultramicroscópio oferece uma informação limitada do número de partículas. Uma pequena partícula que espalha a luz é vista indiretamente como uma mancha fraca. Apesar das dificuldades

existem na literatura trabalhos recentes sobre a formação de agregados usando ultramicroscopia em fluxo (18-19).

### O ultramicroscópio

Se as partículas tiverem índice de refração bastante diferente do meio que as circunda, e se utilizarmos um feixe de luz bastante intenso, ocorre deflexão de luz suficiente para a objetiva, permitindo assim observar as partículas como manchas claras sobre um fundo escuro. Por causa da solvatação o índice de refração de partículas liofílicas é apenas ligeiramente diferente do índice de refração do meio circundante, e não haverá espalhamento de luz suficiente para permitir uma detecção por essa técnica de campo escuro. Assim, o método é mais utilizado por partículas liófbas.

As duas técnicas principais de iluminação de campo escuro são os métodos de fenda de Siedentopf e Zsigmondy (que datam de 1903) e o do cardióide. No microscópio de fenda a amostra é iluminada lateralmente por um feixe estreito e intenso de luz proveniente de um arco voltaico. O condensador cardióide (um acessório comum dos microscópios) é um dispositivo ótico capaz de produzir um cone oco de luz; a amostra é colocada no vértice do cone, onde a intensidade da luz é elevada.

#### 1.2.3. Extinção de luz

A extinção pode ser medida pela razão entre a intensidade do feixe de luz incidente ( $I_0$ ) e a intensidade de luz transmi-

tida ( $I_t$ ):

$$\frac{I_t}{I_0} = \exp [-kl] \quad [1.2]$$

na qual  $l$  é a espessura do meio absorvente e  $k$  é uma constante de proporcionalidade, a qual pode ter várias interpretações. No caso da teoria de Lambert-Beer, a equação acima torna-se:

$$\frac{I_t}{I_0} = \exp [-ECl] \quad [1.3]$$

onde  $C$  é a concentração da solução e  $E$  é o coeficiente de absorção molar.

Quando se estuda um látex é necessário considerar um sistema óticamente heterogêneo, onde as entidades discretas são partículas poliméricas e o contínuo é o solvente. Nestas condições, se ocorrem absorção e espalhamento, o logaritmo da razão entre a radiação incidente e a transmitida é conhecido como turbidez ( $\tau$ ). Para soluções diluídas a turbidez é dada por (29-31):

$$\tau = \ln \frac{I_0}{I_t} = N \gamma l \quad [1.4]$$

onde  $N$  é o número de partículas/cm<sup>3</sup> e  $\gamma$  representa a extinção devida à absorção e ao espalhamento.

Em experimentos típicos de espectrofotometria de transmissão, existem três fontes de perda de intensidade: absorção pelo solvente, absorção pelas partículas poliméricas e espalhamento por essas partículas. A contribuição da absorção e espalhamento para o espectro total, pode ser quantificada em princípio pela teoria de

Mie, a qual relaciona medidas de turbidez com: número, tamanho e constantes óticas de partículas esféricas isotrópicas através da equação:

$$\tau(\lambda) = N l \int_0^{\infty} \frac{\pi}{4} D^2 Q(\alpha, m) f(D) dD \quad [1.5]$$

ou

$$\tau(\lambda) = \frac{3Cl}{2\rho} \frac{\int_0^{\infty} D^2 Q(\alpha, m) f(D) dD}{\int_0^{\infty} D^3 f(D) dD} \quad [1.6]$$

$$\alpha = \pi D / \lambda$$

$$m = (n_1 + ik_1) / n_0 = n + ik$$

onde  $\tau(\lambda)$  é a turbidez a um dado comprimento de onda  $\lambda$ ;  $C$  é a concentração em  $g/cm^3$ ;  $D$  é o diâmetro da partícula;  $f(D)$  é a função de distribuição do tamanho das partículas;  $\rho$  é a densidade das partículas poliméricas e  $m$  é a razão complexa do índice de refração. Os parâmetros  $n_1$  e  $k_1$  representam, respectivamente, a parte real e a imaginária do índice de refração complexo para as partículas poliméricas, e  $n_0$  representa o índice de refração do meio.  $Q(\alpha, m)$  representa a eficiência de extinção total e trata-se de uma função bem conhecida de extinção,  $\gamma$ , na equação [1.4] é agora uma função do tamanho e das propriedades óticas das partículas poliméricas e do meio.

A análise direta da equação [1.5] ou [1.6], isto é, a obtenção do número de partículas/ $cm^3$  ( $N$ ) e da distribuição do tamanho de partículas, é particularmente difícil se a função  $f(D)$  é desconhecida. Uma solução possível é encontrar uma distribuição normal-logarítmica para essa função (8), o que exige uma rotina de cálculo numérico.

Outra alternativa para investigar o efeito do tamanho da partícula é encontrada na literatura (9), partindo de algumas aproximações, abordadas a seguir. Os efeitos de espalhamento são eliminados considerando que as partículas possuem o mesmo índice de refração do meio (isto é,  $m = 1 + ik(\lambda)$ ). Uma simplificação adicional é assumir para  $k_1$  no  $\lambda_{\max}$ , o valor de  $10^{-4}$ , na região de interesse (230-400 nm).

Nestas condições a equação [1.4] torna-se

$$\tau(\lambda) = \frac{Cl\varepsilon(\lambda)}{\rho} [1 - (\pi/3\lambda)^2\varepsilon(\lambda)D^3 - \dots] \quad [1.7]$$

onde  $\varepsilon(\lambda) = 4\pi k/\lambda$ .

A equação [1.7] descreve o espectro de uma suspensão de partículas esféricas isotrópicas com diâmetro  $D$  em um meio iso-refrativo. No limite, quando  $D \rightarrow 0$ , o coeficiente de absorção na equação [1.7] é idêntico ao coeficiente de absorção na equação [1.3] (isto é,  $E = \varepsilon(\lambda)$ ). Desse modo, a equação de Lambert-Beer é um caso particular da teoria de Mie.

A equação [1.7] também indica que, para uma mesma concentração, se o estado de agregação muda (decorrente de uma alteração no tamanho do diâmetro da partícula), haverá uma mudança concomitante na turbidez observada, mesmo na ausência de espalhamento. Por exemplo, para uma solução iso-refrativa a turbidez observada será uma função monotonamente decrescente com o diâmetro do agregado.

Para um sistema polidesperso,  $Q(\alpha, m)$  na equação [1.5] é substituída por uma expansão em séries de potência. Obtém-se a expansão de turbidez em termos dos momentos da distribuição do tama-

nho de partículas (9)

$$\tau(\lambda) = \frac{3C_1}{2\rho\bar{D}^3} (\Gamma_1\bar{D}^3 + \Gamma_3\bar{D}^5 + \Gamma_4\bar{D}^6 + \Gamma_5\bar{D}^7 + \dots) \quad [1.8]$$

onde:  $\bar{D}_i$  representa o i-ésimo momento da distribuição do tamanho de partículas. Os diâmetros maiores causarão impacto mais dramático no espectro, devido a eles possuírem uma maior influência nos momentos de mais alta ordem da distribuição.

O limite superior do diâmetro da partícula para a aplicação da equação [1.7] é aproximadamente de 50-200 nm (isto significa,  $\alpha \leq 0,8$ ) com a parte real do índice de refração complexo restrita a valores menores que 2 (9). O limite de aplicabilidade da equação [1.8] é ditado pela grandeza dos momentos  $\bar{D}_1, \bar{D}_2, \dots$ . Para ampliar a aplicação das equações [1.7] e [1.8], termos de mais alta ordem de potência da eficiência de extinção podem ser adicionados e a eficiência de extinção pode ser expandida, usando-se aproximação de Pade (9) ou, alternativamente, utilizando-se cálculos numéricos.

A literatura menciona o uso do método turbidimétrico na análise de látexes polidispersos e sugere que este método é mais proveitoso que técnicas de espalhamento de luz na determinação do tamanho médio de partículas (32).

#### 1.2.4. Espalhamento de luz

A intensidade da luz espalhada por um meio de baixa turbidez pode ser medida diretamente. Uma fotocélula detetora é usualmente montada sobre um braço giratório para medir a luz espa-

lhada segundo diferentes ângulos e acoplada a um polarizador para poder observar a polarização da luz dispersada.

A primeira teoria de espalhamento de luz por pequenas partículas foi desenvolvida por Lord Rayleigh (29-31). O espalhamento de Rayleigh é restrito a valores de  $\alpha \leq 0,4$  para qualquer valor de  $m$ . A extensão do espalhamento é proporcional à polarizabilidade da partícula (isto é, ao número de elétrons) ou, basicamente, ao volume da partícula. Essa teoria não se aplica à determinação do tamanho de partículas de látexes poliméricos, pois estes compreendem, de modo geral, partículas com tamanhos da ordem do comprimento de onda da luz incidente.

A teoria de Rayleigh, no decorrer dos anos, sofreu vários aperfeiçoamentos.

A única teoria corrente que é, geralmente, útil para látexes poliméricos é a teoria de Mie. Este tratamento não coloca nenhuma restrição sobre os valores de  $m$  e  $\alpha$ . Contudo, os cálculos envolvidos são extremamente complexos. Algumas soluções para o uso desta teoria são disponíveis na forma de tabelas de funções de espalhamento preparadas pelo National Bureau of Standards (31).

Soluções aproximadas da teoria de Mie são discutidas por van de Hulst (29), para partículas esféricas coloidais monodispersas no intervalo  $0,1 < D < 4,00 \mu\text{m}$  e  $m$  permanecendo entre os valores de 1 e 2. Aplicações destas equações foram revisadas por Kerker (30).

Uma revisão abrangente da literatura sobre o uso de espalhamento de luz em sistemas coloidais com 1000 referências foi feita por Kerker (30).

O uso da teoria de Mie para látexes poliméricos

A distribuição de tamanhos de partículas poliméricas é baseada na medida do padrão de espalhamento angular pela razão de polarização, definida por:

$$p_{\theta} = (i_2)_{\theta} / (i_1)_{\theta} = H_{h,\theta} / V_{v,\theta} \quad [1.9]$$

onde  $V_{v,\theta}$  é a razão de Rayleigh, para o componente verticalmente polarizado da radiação espalhada por unidade de ângulo sólido, devido a um feixe de radiação incidente monocromática, verticalmente polarizada (índice v). A definição para a luz polarizada horizontalmente,  $H_{h,\theta}$ , segue aquela de  $V_{v,\theta}$ .

A função de intensidade angular de Mie (29-31) para  $(i_1)_{\theta}$ , de um sistema polidisperso finito é dado por

$$(i_1)_{\theta} = \int_0^{\infty} (i_1')_{\theta} p(\alpha) d\alpha \quad [1.10]$$

onde  $(i_1')_{\theta}$  é a função de intensidade de Mie a um ângulo  $\theta$  para uma única esfera de tamanho ótico  $\alpha$ , e  $p(\alpha)$  é uma função frequência para a distribuição logarítmica de ordem zero (33). Portanto,  $p(\alpha)d\alpha$  dá a fração de partículas entre  $\alpha$  e  $d+\alpha$ . Uma expressão similar existe para a componente  $(i_2)_{\theta}$ . A função de distribuição, possuindo uma ligeira assimetria, é expressa por

$$p(\alpha) = K \exp\{- (\ln \alpha - \ln \alpha_m)^2 / (2\sigma_0)^2\}$$

onde  $K$  é uma constante de normalização,  $\alpha_m$  é o caminho ótico modal

e  $\sigma_0$  é o parâmetro de largura da distribuição, o qual é relacionado ao desvio padrão,  $\sigma$ , por

$$\sigma = \sigma_m \sigma_0 \left[ 1 + \frac{7\sigma_0^2}{2f} + \frac{37\sigma_0^2}{3!} + \dots \right] \quad [1.11]$$

As razões experimentais de polarização podem ser avaliadas pelo método de cálculo numérico (34) ou pelo método extremo (12), para determinar os parâmetros  $\alpha_m$  e  $\sigma_0$  e, assim, encontrar a distribuição de tamanhos  $p(\alpha)$  (13).

#### Outros métodos de espalhamento

Espalhamento dinâmico da luz, entre outros termos (espalhamento de luz laser, espectroscopia laser, espectroscopia de pulso-ótico, espectroscopia de fóton), é aplicado para uma variedade de métodos que, geralmente, envolvem medidas de intensidade da luz espalhada a partir de partículas individuais, quando estas passam por um volume iluminado por laser (14-17). Nestes métodos, o espectro da luz espalhada (picos secundários, larguras de banda, etc.) é determinado por ambos os métodos: estático e dinâmico, permitindo a análise de partículas agregadas.

#### 1.2.5. Centrifugação em gradiente de densidade

A técnica de centrifugação em gradiente de densidade usada largamente nestes últimos trinta anos, tem tido um papel primordial na bioquímica e biologia celular, em experimentos de separação e caracterização (por densidade e tamanho) de partículas

biológicas em ultracentrífuga (35-42). Os mesmos métodos também são aplicados ao estudo de partículas não biológicas: na separação e caracterização de polímeros por densidade em ultracentrífuga (43-47) e na separação de argilas e particulados inorgânicos do solo (48-53).

Os métodos clássicos para a formação de gradientes de densidade são a mistura mecânica e a centrifugação ou ultracentrifugação. Recentemente foi mostrado que a sedimentação osmoticamente acoplada (osmocentrifugação e ultrafiltração centrífuga), é um processo útil na formação de gradientes de densidade usando centrífugas de baixa velocidade (54-55).

#### 1.2.5.1. Formação de gradientes de densidade por osmocentrifugação

Se uma solução (mais densa que o solvente) é separada do solvente por uma membrana semipermeável, solvente pode fluir para a solução ou fluir da solução, dependendo da altura na coluna, do líquido (Figura 1.1). O fluxo do solvente para a solução é obviamente esperado, devido a forças osmóticas; solvente fluir da solução, ocorre somente em pontos abaixo da superfície líquida nos quais uma pressão maior dentro da coluna do líquido conduz a osmose-reversa (56).

A altura da célula de diálise necessária para gerar osmose-reversa por centrifugação, pode ser facilmente calculada usando-se um módulo tal como aquele da Figura 1.1, contendo uma solução binária de composição uniforme, onde o fluxo do solvente ( $H_2O$ ) através da membrana é dado por:

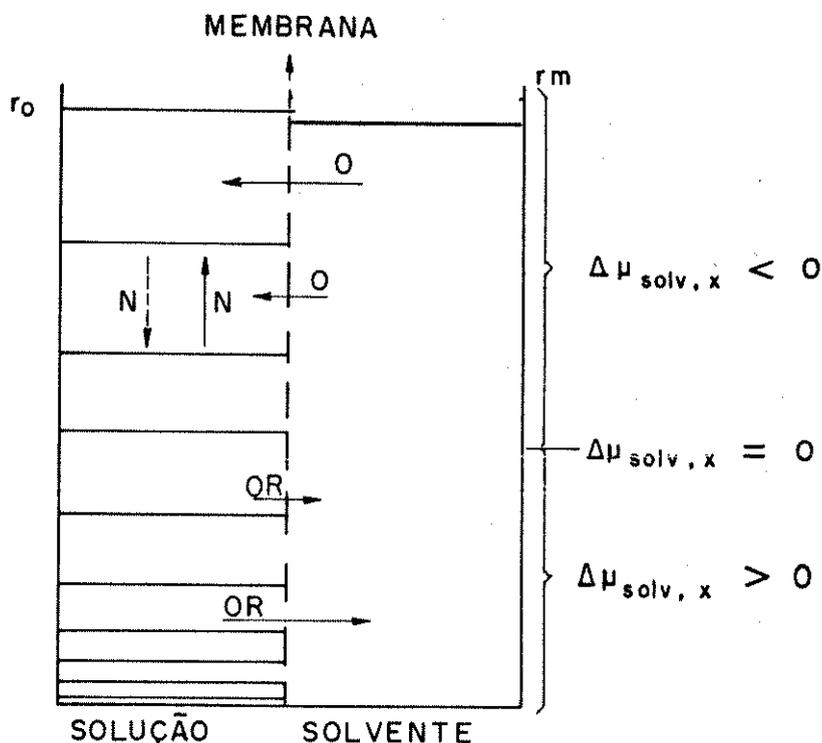


Figura 1.1. Representação esquemática da formação de um gradiente de densidade em uma célula de osmocentrifugação. Correntes de massa osmótica (O) e osmótica-reversa (OR). N é a corrente de sedimentação normal do componente mais leve (—) ou do componente mais pesado (---).

$$J_{\text{H}_2\text{O},x} = -K\Delta\mu_{\text{H}_2\text{O},x}(r_i) \quad [1.12]$$

onde: K é a permeabilidade da membrana ao solvente, e  $\Delta\mu_{\text{H}_2\text{O},x}(r_i)$  é a diferença de potencial químico do solvente, relativo aos dois lados da membrana, expresso pela seguinte equação:

$$\Delta\mu_{\text{H}_2\text{O},x}(r_i) = RT \ln x_{\text{H}_2\text{O}} + \frac{1}{2} \bar{v}_{\text{H}_2\text{O}} \omega^2 \Delta\rho (r_i^2 - r_0^2) + \frac{1}{2} \bar{v}_{\text{H}_2\text{O}} \omega^2 \rho_{\text{H}_2\text{O}} (r_0^2 - r_m^2) \quad [1.13]$$

onde:  $x$  é a fração molar,  $\bar{V}$  é o volume parcial molar,  $\Delta\rho$  é a diferença de densidade entre a solução e o solvente,  $\omega$  é a velocidade angular do rotor e  $r_0$ ,  $r_i$  são as distâncias do eixo do rotor, respectivamente, ao topo e à  $i$ -ésima altura da coluna da solução dentro da célula. Por sua vez,  $r_m$  é a distância do eixo do rotor ao topo da coluna do solvente dentro da célula.

O fluxo horizontal (perpendicular à membrana) do solvente,  $J_{H_2O,x}$  contém três termos (ver equações 1.15 e 1.16), o primeiro que depende somente de  $x_{H_2O}$  e é independente do campo, levando a diluição da solução. O segundo varia do topo até o fundo da coluna da solução e contribui para a concentração da solução. O terceiro, que também contribui para a concentração da solução, é função do desnível entre o topo da solução ( $r_0$ ) e o topo do solvente ( $r_m$ ).

Desse modo, se a coluna de líquido for suficientemente longa, teremos:

1) osmose: o solvente fluirá para dentro do compartimento em posições  $r_i$ , tais que, na equação [1.13] resulte

$\Delta\mu_{H_2O,x}(r_i) < 0$ , a solução do topo será mais diluída; essa diluição torna-se cada vez menor, a medida que  $r_i$  aumenta;

2) ponto de fluxo zero: o fluxo do solvente será nulo quando, na equação [1.13]  $\Delta\mu_{H_2O,x}(r_i) = 0$ ;

3) osmose-reversa: o solvente fluirá para fora do compartimento da solução para posições  $r_i$  em que, na equação [1.13]  $\Delta\mu_{H_2O,x}(r_i) > 0$ . Nesse caso, a partir do ponto de fluxo zero, a solução ficará cada vez mais concentrada, a medida que se aproximar do fundo da solução.

Além do mecanismo acima apresentado de transferência do

solvente (perpendicular à membrana) que resulta em um gradiente vertical de concentração, um outro tipo de mecanismo de transferência de massa existe dentro do compartimento da solução, quando esta consistir de um sistema polidisperso ou com muitos solutos. Esse mecanismo consiste na formação de gradientes horizontais de concentração dentro da cela de diálise, como resultado das correntes de osmose e osmose-reversa do solvente. Surgem, então, gradientes de densidade que podem conduzir a instabilidades convectivas e, a um novo mecanismo de transferência de massa: uma solução menos densa (ou mais diluída) move-se para cima, e uma solução mais concentrada move-se para baixo. Esse mecanismo é ilustrado na Figura 1.2. A expectativa é que as camadas menos densas sejam ricas em partículas menores por serem mais rapidamente difundidas. Isso explicaria o fracionamento do soluto em osmocentrifugação (3).

Admitindo para a osmocentrifugação, a mesma análise feita para osmossedimentação (sedimentação osmoticamente acoplada, sob gravidade), este efeito pode ser visto por duas diferentes aproximações baseadas no formalismo da termodinâmica irreversível. Para tanto, a velocidade de aproximação ao estado de equilíbrio em um sistema com reservatórios em contato, a determinadas  $T$  e  $p$ , na ausência de reações químicas, é dada por:

$$\frac{dG}{dt} = \sum_i \sum_{\alpha A} \psi_{i, \alpha A} \Delta \mu_{i, \alpha A} \cong \sum_i \sum_{\alpha A} K \Delta \mu_{i, \alpha A}^2 \quad [1.14]$$

A velocidade de diminuição de  $G$  crescerá, portanto, quando crescerem os dois fatores: (1) o número de  $i$ -componentes e (2) o número de fases  $\alpha$ . Quando isso acontecer em um experimento de osmocentrifugação existirão mais caminhos para transferência de massa

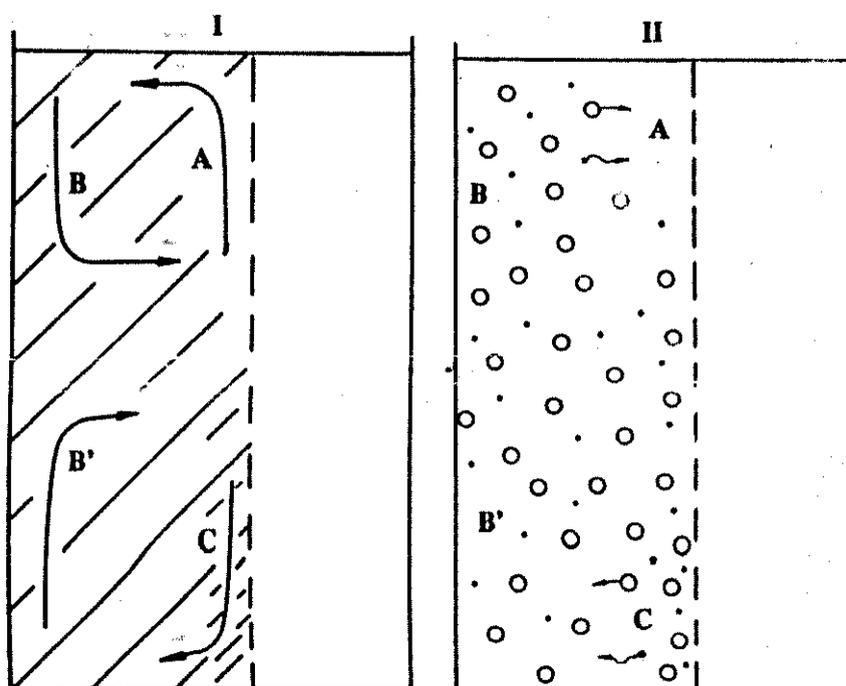


Figura 1.2. I) Correntes de convecção dentro do compartimento da solução em uma célula de diálise. A solução em A é diluída pelo fluxo osmótico do solvente, enquanto a solução em C é concentrada pelo fluxo osmótico-reverso. Fluidos mais densos movem-se para baixo, enquanto os mais leves deslocam-se para cima. II) Partículas menores (.) difundem da região mais concentrada para a mais diluída dentro da solução, isto é, de B para A e de C para B'. Partículas maiores (o) também difundem em sentido inverso. Como resultado, a solução mais densa é enriquecida com partículas maiores que migram para baixo. A solução menos densa (como em A) é enriquecida com partículas menores que movem-se para cima.

conduzindo a uma transferência de massa mais rápida. A equação [1.14] permitiu prever que velocidade de transferência de massa em osmossedimentação é  $10^5$  vezes maior que em sedimentação normal (57).

### 1.2.5.2. Formação de gradientes de densidade por ultrafiltração centrífuga

Um método similar ao utilizado para gerar gradientes de densidade em osmocentrifugação, é aqui utilizado para gerar gradientes de densidade com a técnica de ultrafiltração centrífuga (Figura 1.3).

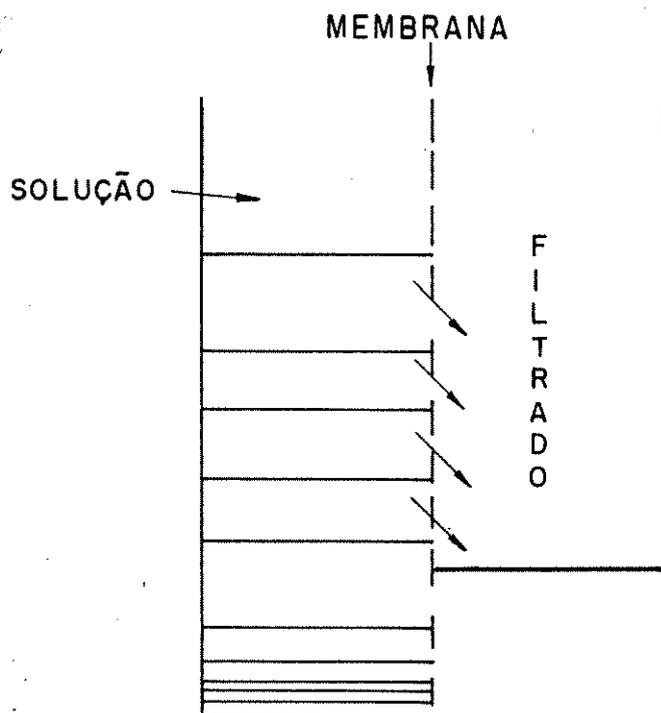


Figura 1.3. Esquema da formação de um gradiente de densidade em uma célula de ultrafiltração centrífuga com a membrana paralela ao campo. As setas indicam o fluxo de líquido através da membrana.

Nos experimentos realizados usando essa metodologia, os módulos são carregados unicamente com a solução no compartimento a ela destinado, e em seguida centrifugados. O solvente flui para o

outro lado da membrana e, por caminhos de transferência de massa em parte semelhantes aos da osmocentrifugação, é autogerado um gradiente de densidade (58).

#### 1.2.5.3. Fracionamento de partículas

A separação de partículas por centrifugação em gradiente de densidade ocorre basicamente por três métodos: (i) por velocidade, (ii) por equilíbrio de sedimentação-difusão (isopícnica) e (iii) por aproximação ao estado de equilíbrio (pseudo-isopícnica). Esses três métodos são comumente agrupados em dois tipos de separação:

##### A) Por tamanho

A separação por tamanho (ou por velocidade de sedimentação) pode seguir o procedimento da centrifugação zonal.

Na centrifugação zonal, ilustrada na Figura 1.4, a amostra é colocada no topo de um meio, no qual foi previamente formado um gradiente de densidade. Durante a centrifugação as partículas sedimentam com velocidades diferentes formando zonas discretas.

##### B) Por densidade

Na centrifugação isopícnica, a separação se dá devido a diferenças de densidade das partículas. O processo é ilustrado na Figura 1.4. Cada partícula sedimenta até uma posição de equilíbrio no gradiente onde a densidade do meio é igual à densidade da partícula (posição isopícnica).

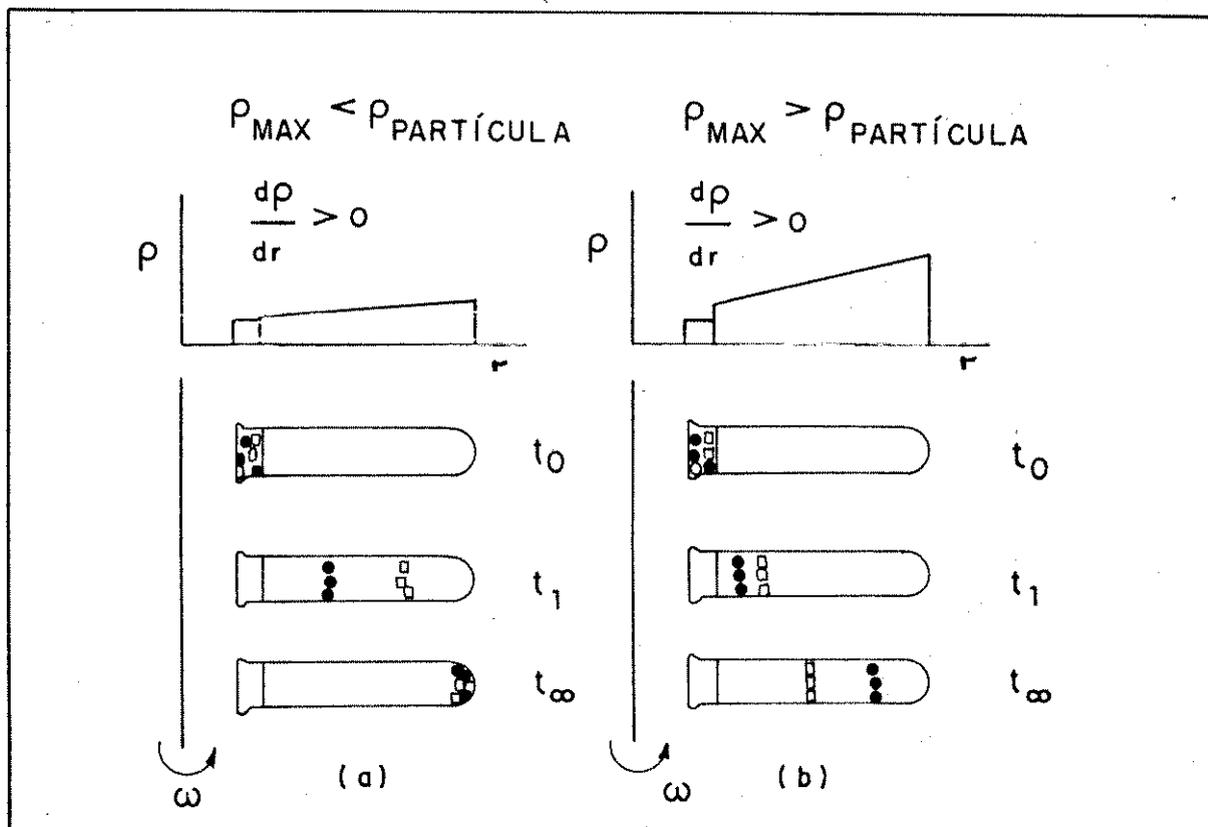


Figura 1.4. Esquemas de separação de uma mistura de partículas por centrifugação zonal em gradiente de densidade: (a) por tamanho e (b) por densidade.

### 1.3. Fundamentos Teóricos: Cálculo do Coeficiente de Sedimentação de Partículas em Gradiente de Densidade

#### Velocidade de sedimentação

Considere-se uma partícula dissolvida em um meio líquido homogêneo  $m$  (à temperatura  $T$ ), mantido num rotor que gira a uma velocidade  $\omega$  (radianos por segundo). Abstraindo-se as suas vizinhanças é possível dizer que há três forças atuando sobre ela (Fi-

*Luças*

gura 1.5): Em primeiro lugar a partícula será submetida a uma força centrífuga proporcional ao produto de sua massa pela distância (R) ao centro da rotação:  $F_c = \omega^2 R m$ ; sua massa é dada pelo produto da densidade vezes o volume ( $m = \rho_p \pi d^3 / 6$ ). Ao mesmo tempo a partícula desloca uma certa quantidade do meio; esse fato dá origem a um empuxo igual em módulo ao peso do meio deslocado:  $F_b = \omega^2 R m_o = \omega^2 R (\rho_m \pi d^3 / 6)$ .

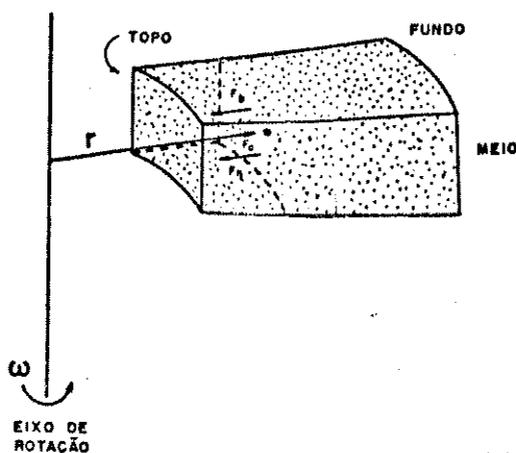


Figura 1.5. Diagrama de uma experiência de sedimentação.

Se, como resultado dessas forças, a partícula for acelerada em relação ao campo, essa aceleração terá uma duração extremamente curta, da ordem de  $10^{-9}$  seg (59) pois, à medida que sua velocidade aumenta, a partícula sofrerá o atrito com o meio devido ao movimento através do meio. Essa força de atrito, pela Lei de Stokes será dada por  $F_\eta = -3\pi\eta_m dv$ , onde  $\eta_m$  é a viscosidade do meio,  $d$  o diâmetro da partícula e  $v$  a velocidade. Uma velocidade constante será atingida quando a força total atuante sobre a par-

tícula for nula:

$$F_c + F_b + F_\eta = 0 \quad [1.15]$$

Combinando

$$3\pi\eta_m dv = (\rho_p - \rho_m) \pi d^3 \omega^2 R / 6 \quad [1.16]$$

$$v = (\rho_p - \rho_m) d^2 R \omega^2 / 18\eta_m \quad [1.17]$$

A velocidade de sedimentação de uma partícula esférica, em um meio homogêneo  $m$ , cuja densidade e viscosidade são conhecidas, pode ser predita pela equação [1.17]. O inverso também é verdadeiro: pode-se prever o diâmetro de uma dada partícula a partir de medidas de velocidade e densidade. Rearranjando a equação [1.17], obtém-se o coeficiente de sedimentação:

$$s_{T,m} = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{(dR/dt)}{\omega^2 r} = \frac{(\rho_p - \rho_m) d^2}{18\eta_m} \quad [1.18]$$

correspondentemente:

$$d = \left( \frac{18\eta_m s_{T,m}}{\rho_p - \rho_m} \right)^{1/2} \quad [1.19]$$

O coeficiente de sedimentação,  $s$ , observado experimentalmente, é usualmente convertido a um estado padrão definido em termos da velocidade da partícula em água a 20°C (60):

$$s_{20,w} = \frac{\eta_{T,m} (\rho_p - \rho_{20,w})}{\eta_{20,w} (\rho_p - \rho_{T,m})} \cdot s_{T,m} \quad [1.20]$$

onde  $\eta_{T,m}$  é a viscosidade (em Poise) do meio à temperatura T;  $\eta_{20,w}$  é a viscosidade da água a 20°C;  $\rho_p$  é a densidade da partícula em solução;  $\rho_{T,m}$  é a densidade do meio e  $\rho_{20,w}$  é a densidade da água a 20°C.

As equações [1.18] e [1.20] podem ser combinadas para produzir:

$$s_{20,w} = \frac{(dR/dt) \eta_{T,m} (\rho_p - \rho_{20,w})}{\omega^2 R \eta_{20,w} (\rho_p - \rho_m)} \quad [1.21]$$

Quando um campo centrífugo é aplicado a uma amostra (zona) no topo de um gradiente de densidade ( $d\rho/dR$ ) as partículas, que de início estavam distribuídas uniformemente na zona começam a se mover (se a amostra for polidispersa formam-se várias zonas).

A partir do movimento da(s) zona(s) podemos calcular o coeficiente de sedimentação. A equação [1.21] pode ser reescrita como:

$$\omega^2 s_{20,w} dt = \frac{(\rho_p - \rho_{20,w}) \eta_{T,m}}{(\rho_p - \rho_{T,m}) \eta_{20,w}} \cdot \frac{1}{R} dR \quad [1.22]$$

Integrando o lado esquerdo da equação [1.22], temos:

$$\int_0^t s_{20,w} \omega^2 dt = s_{20,w} \omega^2 t$$

O lado direito da equação [1.22] pode ser aproximado para (61):

$$\frac{(\rho_p - \rho_{20,w})}{\eta_{20,w}} \int_{R_s}^{R_i} F(R) dR = \frac{(\rho_p - \rho_{20,w})}{\eta_{20,w}} \sum_{R_s}^{R_i} F(R_i) R_i^{-R_i-1} \quad [1.23]$$

$$F(R) = \frac{\eta_{T,m,f_i}}{(\rho_p - \rho_{T,m,f_i}) (R_i + R_{i-1})/2} \quad [1.24]$$

onde:  $i$  indica uma fração específica;  $R_i$  o raio no fundo da fração; e  $R_s$  o raio do centro de massa da banda da amostra.

Centrifugação em gradiente de densidade tanto em rotor "swinging-bucket" como em rotor "zonal", tem sido usada para avaliar coeficientes de sedimentação e diâmetro de partículas (35,38-49,61). Neste trabalho, para o cálculo de  $s$ , foi usada (61) a equação:

$$s_{20,w} = \frac{\rho_p - \rho_{20,w}}{\omega^2 t \eta_{20,w}} \frac{R_s}{R_i} \frac{\eta_{T,m,f_i}}{(\rho_p - \rho_{T,m,f_i}) (R_i + R_{i-1})/2} (R_i - R_{i-1}) \quad [1.25]$$

onde  $i$  representa uma dada fração.

Para o cálculo do coeficiente de sedimentação, os seguintes parâmetros devem ser conhecidos:

$R_i$ , o raio (em cm) medido do centro do rotor à parte inferior de cada fração, se o tubo é perfeitamente cilíndrico (35);

$R_s$ , o raio (em cm) medido do centro do rotor ao centro de massa da zona da amostra; neste trabalho foi monitorado visualmente e medido com uma régua;

$\omega$ , a velocidade angular em  $\text{seg}^{-1}$  (nos períodos de aceleração, "steady" e desaceleração);

$T$ , temperatura da centrífuga em graus centígrados;

$\eta_{T,m,f_i}$  e  $\rho_{T,m,f_i}$ , se referem a viscosidade média (em Poise) e densidade média ( $\text{g/cm}^3$ ) do meio onde a fração foi coletada, isto porque cada fração individualmente foi homogeneizada antes destas medidas

serem realizadas;

$\rho_p$ , a densidade da partícula em solução, determinada experimentalmente em g/cm<sup>3</sup>;

$\rho_{20,w}$ , a densidade da água a 20°C, em g/cm<sup>3</sup>;

$\eta_{20,w}$ , a viscosidade da água a 20°C, em Poise;

$t$ , pode ser aproximado com  $(P + (A + D)/3)$  (39) onde A é o tempo de aceleração, D é o tempo de desaceleração e P é o tempo de rotação, em segundos.

Para partículas esféricas, o cálculo do diâmetro (62) pode ser feito com a equação:

$$s_{20,w} = \frac{1}{18} \frac{\rho_p - \rho_{T,w}}{\eta_{T,w}} d^2 \quad [1.26]$$

Quando partículas de tamanhos diferentes possuem a mesma densidade, a razão de massa entre elas pode ser dada por (35,62):

$$\frac{m_i}{m_1} = \left(\frac{s_i}{s_1}\right)^{3/2} \quad [1.27]$$

onde  $s_i$  e  $s_1$  são coeficientes de sedimentação em Svedberg (1S = 10<sup>-13</sup> seg).

#### 1.4. Objetivos

Os objetivos desta tese podem ser resumidos nos seguintes itens que serão desenvolvidos nos capítulos subsequentes:

1. Estabelecimento de uma metodologia para o fracionamento (capítulo 2) e determinação do tamanho de partículas de

látex de PS (capítulo 3), na faixa de 0,1 a 1  $\mu\text{m}$ ; esta metodologia é fundamentada em experimentos de osmocentrifugação e de centrifugação em gradiente de densidade.

2. Uso da metodologia estabelecida segundo o ítem 1 no estudo da agregação de partículas de látex de PS (capítulo 3), incluindo: i) indução da existência de agregados em uma dispersão de látex, pela adição de eletrólito a diversas concentrações; ii) separação e caracterização de agregados de PS sem modificar as suas estruturas; iii) exame morfológico dos agregados por microscopia eletrônica.

3. Determinação do coeficiente de sedimentação e massa molar da eritrocruorina de Glossoscolex paulistus (capítulo 4).

4. Estudo da formação de estruturas dissipativas em células de diálise, por osmocentrifugação zonal (capítulo 5).

## 2. FRACIONAMENTO DE PARTÍCULAS DE LÁTEX DE POLIESTIRENO (PS)

### 2.1. Introdução: Sistemas Coloidais

Sistemas coloidais são aqueles nos quais um ou mais componentes apresentam pelo menos uma de suas dimensões dentro do intervalo de 1 nm a 1  $\mu$ m (63). Tal definição operacional permite diferenciar os sistemas coloidais, tanto das soluções ordinárias - nas quais as partículas do soluto e solvente têm aproximadamente as mesmas dimensões - como também das suspensões, nas quais os componentes são separados facilmente por meios mecânicos (filtração, decantação, etc.).

Podem-se agrupar os sistemas coloidais em duas grandes classes, com respeito à separação de fases: sistemas reversíveis e sistemas irreversíveis.

Pertencem à classe dos sistemas reversíveis, as soluções verdadeiras de substâncias macromoleculares (naturais ou sintéticas). Estas são termodinamicamente estáveis, e também reversíveis, pois podem ser reconstituídas facilmente após a separação de fases.

Na classe dos sistemas irreversíveis, estão incluídas as dispersões coloidais. Estas, por sua vez, são termodinamicamente instáveis, por causa de sua elevada energia livre de superfície, e constituem sistemas irreversíveis, que não podem ser reconstituídos facilmente após a separação de fases. Os látexes poliméricos estão incluídos neste tipo de sistema.

#### 2.1.1. Látex de PS

Uma dispersão coloidal de partículas poliméricas em um líquido é chamada de látex.

Látexes poliméricos, preparados em condições nas quais os raios finais das partículas podem variar desde 50 nm até alguns microns, são chamados na literatura de colóides poliméricos (64).

Esses sistemas são muito convenientes em várias situações (65), tais como:

a) calibração de vários instrumentos, por exemplo, ultracentrífuga, fotômetro de espalhamento de luz e microscópio eletrônico;

b) a determinação de tamanhos de poros de membranas biológicas e filtros;

c) concentração e purificação de anti-corpos;

d) sistemas-modelo em Química Coloidal;

e) componentes de produtos de uso final na indústria de tintas e revestimentos;

f) intermediários úteis nas indústrias de papel, têxtil, plásticos e borrachas.

Muitas destas aplicações requerem um cuidadoso controle do tamanho de partículas do látex; contudo, a complexidade do processo de polimerização por emulsão ou dispersão utilizado para a síntese das partículas, torna frequentemente difícil esse controle (26).

Látexes aquosos de PS são geralmente preparados por polimerização de estireno, em emulsão ou dispersão. A polimerização ocorre por um mecanismo de radical livre com as seguintes etapas: formação de um radical do monômero estireno, crescimento da cadeia polimérica e transferência da cadeia para diferentes componentes

do sistema, término da polimerização (63).

#### 2.1.1.1. Obtenção de látex de poliestireno via mecanismo de polimerização por emulsão

As bases da teoria da polimerização por emulsão, foram postuladas por Harkins em 1947 (66) e posteriormente, avaliadas quantitativamente por Smith e Ewart em 1948 (67). Continuam válidas embora alguns aspectos (68) tenham sido questionados em estudos subsequentes (Roe e Brass, 1957; van der Hoff, 1967 e Roe, 1968). De acordo com esse mecanismo, em uma mistura, sob agitação, contendo o monômero estireno e um emulsificante, o agente emulsificante está simultaneamente distribuído no sistema em três diferentes estados: (i) agregado em micelas; (ii) dissolvido na fase aquosa e (iii) adsorvido na interface água-estireno. O monômero estireno também está distribuído em três estados, como: (i) gotículas estabilizadas de uma emulsão, (ii) dissolvido na fase aquosa e (iii) solubilizado no interior apolar das micelas do emulsificante.

A maior parte do emulsificante e monômero está presente como micelas e gotículas, respectivamente. O número de gotículas do monômero é de muitas ordens de grandeza inferior ao número de micelas do sistema, de modo que a área das interfaces monômero/água é desprezível quando comparada à das interfaces água-micela. A adição de um iniciador solúvel em água conduz à formação de radicais livres na fase aquosa, geralmente por decomposição. A velocidade de decomposição é aumentada pela elevação da temperatura do sistema. Estes radicais não tendem a serem adsorvidos pelas gotí-

culas do monômero nem tampouco penetrar nas micelas do emulsionante. Isto se aplica especialmente se os radicais são carregados negativamente e as micelas são de um emulsionante aniônico. Alguns desses radicais reagem com os monômeros dissolvidos na água para formarem radicais monoméricos, e a polimerização tem início na fase aquosa até que os radicais oligoestireno possuam uma superfície suficientemente ativa para penetrarem nas micelas (isto é, quando os radicais oligoméricos estão orientados preferencialmente com o grupo polar terminal na direção da água e o grupo hidrofóbico terminal orientado para o interior da micela). É aqui que a reação se propaga com a subsequente adição de monômero. Assim, estas micelas contendo um radical oligômero tornam-se partículas poliméricas crescentes, estabilizadas por grupos terminais polares e pelo agente emulsionante, agora adsorvido na superfície da partícula. Dessa forma, a polimerização não ocorre nas gotículas emulsionadas do monômero, mas nas micelas do emulsionante. As gotículas funcionam como reservatórios, para fornecerem o monômero, por um mecanismo de difusão através da fase aquosa, aos locais em que se processa a polimerização. As micelas que não capturam radicais desaparecem, por fornecerem emulsionante para as partículas poliméricas crescentes. O término das micelas, seja por tornarem-se partículas poliméricas ou por desaparecerem, corresponde ao final do estágio de nucleação. As partículas continuam a crescer até que o suprimento do monômero e/ou radical seja exaurido. Para a obtenção de um látex monodisperso, o estágio de nucleação deve ser suficientemente curto para minimizar a superposição do estágio de nucleação com o estágio de crescimento. Ainda assim, é obtida uma distribuição de tamanho de partículas, mesmo que estreita.

Após o término da polimerização, a fase aquosa do látex pode conter resíduos do iniciador, do monômero estireno, do emulsionante e algum tampão. Emulsionante e estireno não-polimerizado são esperados estarem também adsorvidos na superfície das partículas. Dependendo do uso final do látex, estas impurezas devem ser removidas das partículas para a obtenção final de uma superfície limpa e bem definida.

#### 2.1.1.2. Obtenção de látex de poliestireno via mecanismo de polimerização por dispersão

Embora tenha sido usual no passado o uso de emulsionantes na polimerização por emulsão, sua presença não é indispensável para a formação de partículas poliméricas. Quando a polimerização ocorre na ausência de emulsionante, é chamada de polimerização por dispersão. Nesse caso, o monômero está presente em dois estados: (i) dissolvido na fase aquosa e (ii) em gotículas. Os radicais oligoméricos formados na fase aquosa, a uma concentração e comprimento de cadeia críticos, formarão agregados de forma análoga às aquelas micelas formadas por moléculas do emulsionante. Núcleos são então formados nos quais a polimerização procede, de modo similar ao descrito acima. Devido a falta da adição de emulsionante, as partículas crescentes de polímeros são unicamente estabilizadas por grupos iônicos terminais originados do iniciador.

Uma das etapas mais importantes nesse tipo de processo é a etapa de coagulação. De acordo com os trabalhos de Goodwin em 1978 e Fitch em 1980 (69), as primeiras partículas formadas tem um pequeno número de cadeias e, portanto, somente poucos grupos-ter-

minais estão presentes. Consequentemente, a densidade de carga das partículas é baixa, o sistema torna-se instável e ocorre a coagulação, até que as novas partículas formadas tenham densidade de carga e raio de suficiente magnitude para garantir a estabilidade coloidal. Uma menor velocidade de polimerização é encontrada, quando se compara esse processo com aquele realizado na presença de emulsionante, o que pode ser explicado pela ocorrência de coalescência, segundo Dunn, 1971 (70a). Embora, tenha sido mostrado por Harkins em 1952 (70b) que na ausência de emulsionante o látex teria um alto grau de polidispersidade, Kotera em 1970 (70c) descreveu um procedimento para preparar látexes de poliestireno monodisperso na faixa de 350-1400 nm, sem adicionar qualquer agente emulsionante. Obviamente, tais látexes "limpos" são particularmente atraentes como substâncias-modelo.

Em látexes preparados por este processo, oligômeros podem ser fisicamente adsorvidos na superfície das partículas. Desde que não há, em princípio, nenhuma diferença na constituição química de um oligômero e um polímero de estireno, tais oligômeros não são considerados material "estranho". Em outras palavras, sua presença na superfície do poliestireno não é considerada contaminação.

#### 2.1.1.3. Características das partículas de látex

Partículas de látexes poliméricos, na sua grande maioria, são compostas de um grande número de cadeias do polímero, possuindo cadeias individuais na faixa de pesos moleculares de  $10^5$ - $10^7$ . Dependendo do arranjo das cadeias no interior das partículas, elas podem ser amorfas (borrachosas ou vítreas) ou cristais

linas.

Látexes de PS possuem partículas de forma esférica e uma  $T_g$  (temperatura de transição vítrea) bem definida. O estado físico das partículas é muito importante nas interações de curto-alcance; por exemplo, com partículas moles, a coalescência das partículas pode ocorrer mais facilmente, enquanto nas partículas duras sua individualidade é mantida (71).

O comportamento coloidal de uma dispersão de partículas de látex é diretamente relacionado com as propriedades de superfície das partículas, e estas por sua vez dependem dos processos empregados para a síntese de suas partículas. A superfície das partículas pode, então, apresentar-se dentro de um dos casos abaixo:

1. possuir grupos (por exemplo:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OSO}_3^-$ ,  $-\text{OH}$ ) residuais do iniciador usado na reação;
2. ser anfótera, quando são usados iniciadores mistos na reação;
3. possuir emulsificante adsorvido ou diretamente enxertado na superfície da partícula;
4. possuir polímeros não-iônicos ou polieletrólitos adsorvidos ou enxertados diretamente na superfície das partículas.
5. possuir grupos básicos ou ácidos na forma ionizada, quando as partículas são dispersas em um meio de alta permitividade, por exemplo água; a extensão da ionização depende dos valores de  $pK_a$  e  $pK_b$  dos grupos da superfície e do valor de pH do meio de dispersão.

Dessa forma é possível produzir uma grande variedade de partículas de látex e uma ilustração esquemática de alguns tipos é dada na Figura 2.1.

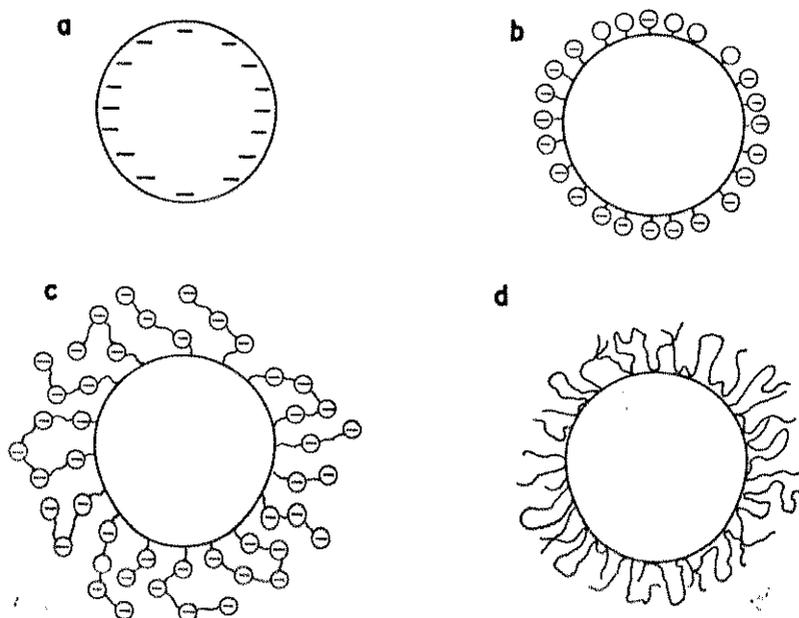


Figura 2.1. Ilustração esquemática de alguns possíveis tipos de partículas de látex: (a) suave, (b) cadeias iônicas curtas, (c) cadeias iônicas longas e (d) cadeias não iônicas longas.

A partir dessa descrição qualitativa de partículas de látex é possível identificar a origem das forças entre as partículas, que influirão sobre a estabilidade coloidal das dispersões. Estas podem ser resumidas como:

a. Efeitos eletrostáticos: surgem de grupos ionizados na superfície, geralmente repulsivos; partículas tendo cargas opostas podem sofrer atração eletrostática, cuja intensidade depende da concentração de eletrólito no meio;

b. Efeitos estéricos: surgem da geometria e conformação de moléculas adsorvidas ou enxertadas na superfície - podem também incluir efeitos de carga quando as moléculas são polieletrólitos. Os efeitos podem ser atrativos ou repulsivos e são sempre depen-

dentes da temperatura e podem também depender da concentração de eletrólito.

c. Efeitos de atração por forças de dispersão: são devidas às forças de dispersão de longo alcance, essencialmente, quando a densidade e polarisabilidade das moléculas que formam as partículas são diferentes daquelas do meio. Geralmente independem do eletrólito e da temperatura.

d. Efeitos de solvatação: surgem da organização das moléculas do solvente próximas a macromoléculas, diferente da organização do solvente no restante da dispersão.

#### 2.1.1.4. Estudos de látexes de PS por centrifugação em gradiente de densidade

Látexes poliméricos com dimensões coloidais, têm sido estudados por centrifugação em gradiente de densidade. A metodologia (20) consiste em por um líquido de baixa densidade sobre um líquido de alta densidade (que contém a amostra a ser estudada), em uma cela de fronteira sintética, em ultracentrífuga analítica. Dessa forma, o gradiente é formado por difusão, e o equilíbrio de sedimentação é alcançado em tempos curtos. Este método permite a separação de uma mistura de látexes poliméricos e sua caracterização química. Outra técnica (21) usa gradientes dinâmicos formados por ultracentrifugação de Percoll em  $H_2O$ ,  $D_2O$  ou MeOH. Esta técnica foi bem sucedida no estudo de partículas finas (látexes poliméricos, microcristais e células) com diâmetro inferior a 300 nm.

Neste capítulo é examinada a aplicação de osmocentrifugação (ou centrifugação em células de diálise) nos seguintes estudos:

1. Obtenção de gradientes de densidade úteis em fracionamento por velocidade de sedimentação;

2. Fracionamento de partículas de látex de PS, por tamanho, usando experimentos de: (i) osmocentrifugação zonal em gradientes de densidade, (ii) centrifugação zonal em gradientes de densidade autogerados por osmocentrifugação.

## 2.2. Parte Experimental e Resultados

### 2.2.1. Materiais e Equipamentos

#### Materiais:

Ficoll, Pharmacia Fine Chemicals (Lot nº HC 24638, Code nº 17 0400-01).

Sacarose P.A. Reagen.

Density Marker Beads, Pharmacia Fine Chemicals.

Látex de poliestireno, Sigma, nos diâmetros: 0,109; 0,305; 0,460  $\mu\text{m}$ .

Acetato de celulose, Carlo Erba (53% de ácido acético combinado).

Ácido acético glacial, Mallinckrodt e Quimis.

Acetona PA-ACS Carlo Erba.

#### Equipamentos:

Centrífuga refrigerada, de caçapas basculantes, RC-3B Sorvall Instruments.

Bomba peristáltica com controle de velocidade, Buchler Instruments serial no. 42561.

Densímetro PAAR-DMA 60/602.

Refratômetro Abbe Bausch & Lomb.

Espectrofotômetro UV-visível Micronal B382.

Registrador, Instrumentos Científicos CG Ltda.

Viscosímetro de Ostwald.

### 2.2.2. Curvas de Calibração

Índice de refração ( $n$ ) x densidade ( $\rho$ ): as densidades das soluções aquosas de Ficoll e Ficoll-sacarose, de diferentes concentrações, foram determinadas a  $25,0^{\circ}\text{C}$  em densímetro PAAR-DMA 60/602. Os índices de refração das mesmas soluções foram medidos na mesma temperatura em refratômetro Abbe. Os resultados são apresentados na Tabela 2.1 e as curvas de calibração na Figura 2.2.

Viscosidade ( $\eta$ ) x densidade ( $\rho$ ): as densidades das soluções aquosas de Ficoll foram medidas a  $20,0$  e  $25,0^{\circ}\text{C}$  em densímetro PAAR-DMA 60/602. As viscosidades das mesmas soluções foram medidas nas mesmas temperaturas, em viscosímetro capilar. Os resultados são apresentados na Tabela 2.2. e as curvas de calibração na Figura 2.3A.

Também foram construídas curvas de calibração de densidade ( $\rho$ ) x concentração (% (m/m)) para soluções aquosas de Ficoll a  $20,0$  e  $25,0^{\circ}\text{C}$  (Figura 2.3B).

Tabela 2.1. Índices de refração e densidades de soluções aquosas de Ficoll e Ficoll-sacarose a 25,0°C.

Ficoll		Ficoll-sacarose		Ficoll-sacarose		Ficoll-sacarose	
$n_D^{25} \pm 0,0001$		4% (m/m)		8% (m/m)		14% (m/m)	
$\rho \pm 0,00001$		$n_D^{25} \pm 0,0001$		$n_D^{25} \pm 0,0001$		$n_D^{25} \pm 0,0001$	
$(\text{gcm}^{-3})$		$\rho \pm 0,00001$		$\rho \pm 0,00001$		$\rho \pm 0,00001$	
		$(\text{gcm}^{-3})$		$(\text{gcm}^{-3})$		$(\text{gcm}^{-3})$	
1,3378	1,00973	1,3435	1,02540	1,3476	1,03685	1,3568	1,06144
1,3438	1,02383	1,3470	1,30453	1,3502	1,04325	1,3602	1,06902
1,3504	1,03894	1,3515	1,04353	1,3532	1,04999	1,3632	1,07675
1,3525	1,04426	1,3530	1,04760	1,3568	1,05796	1,3665	1,08417
1,3540	1,04754	1,3545	1,04954	1,3594	1,06503	1,3702	1,09269

Tabela 2.2. Viscosidades e densidades de soluções aquosas de Ficoll a 20,0 e 25,0°C.

20,0°C		25,0°C	
$\eta \pm 0,0001$	$\rho \pm 0,00001$	$\eta \pm 0,0001$	$\rho \pm 0,00001$
(cP)	$(\text{gcm}^{-3})$	(cP)	$(\text{gcm}^{-3})$
1,3402	1,00371	1,1758	1,0025
2,7296	1,01843	2,1329	1,0175
5,4054	1,03260	4,4492	1,0300
10,0222	1,04679		1,0425

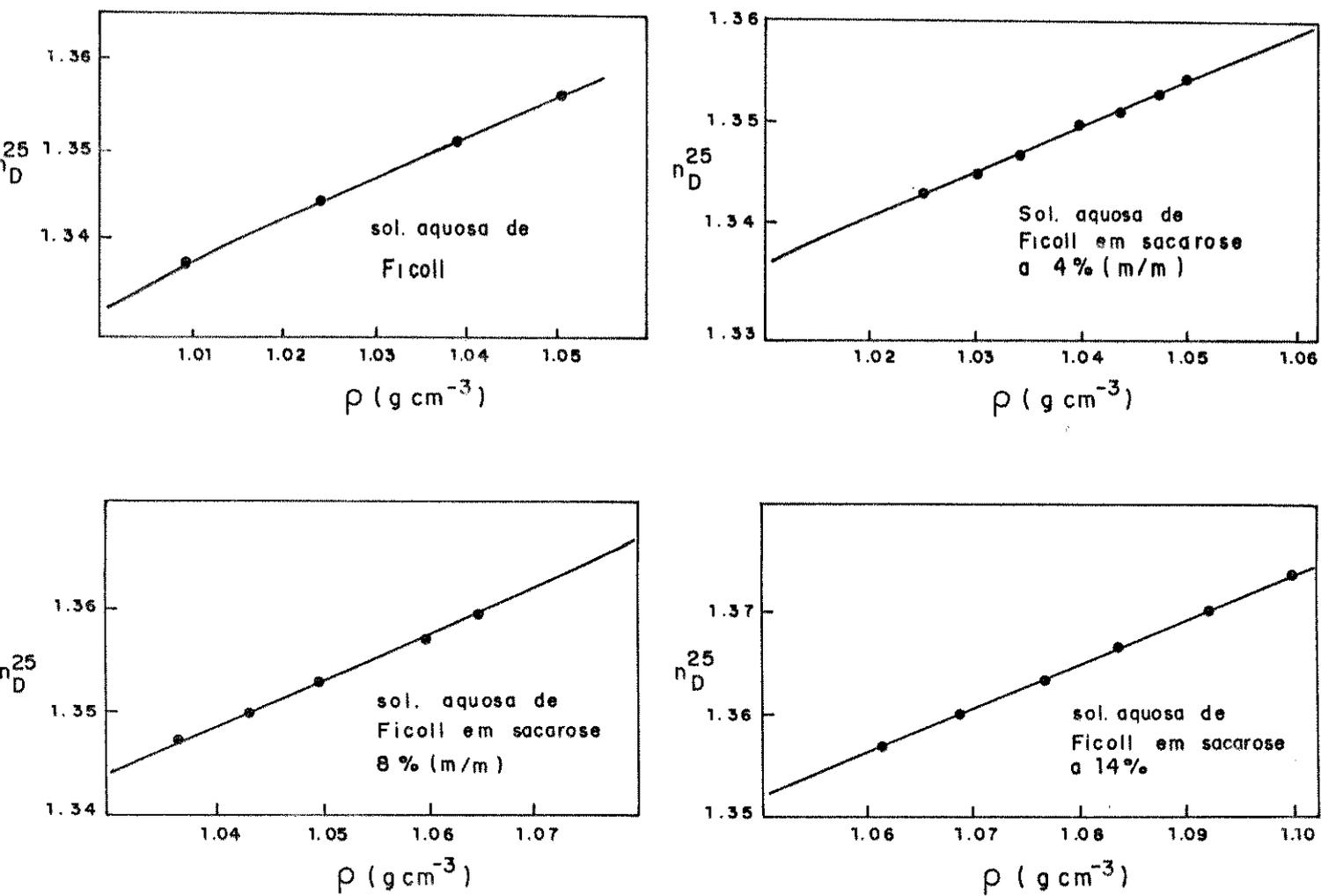


Figura 2.2. Curvas de calibração de índice de refração ( $n_D^{25}$ ) x densidade ( $\rho$ ) para soluções aquosas de Ficoll e Ficoll-sacarose a 25,0°C.

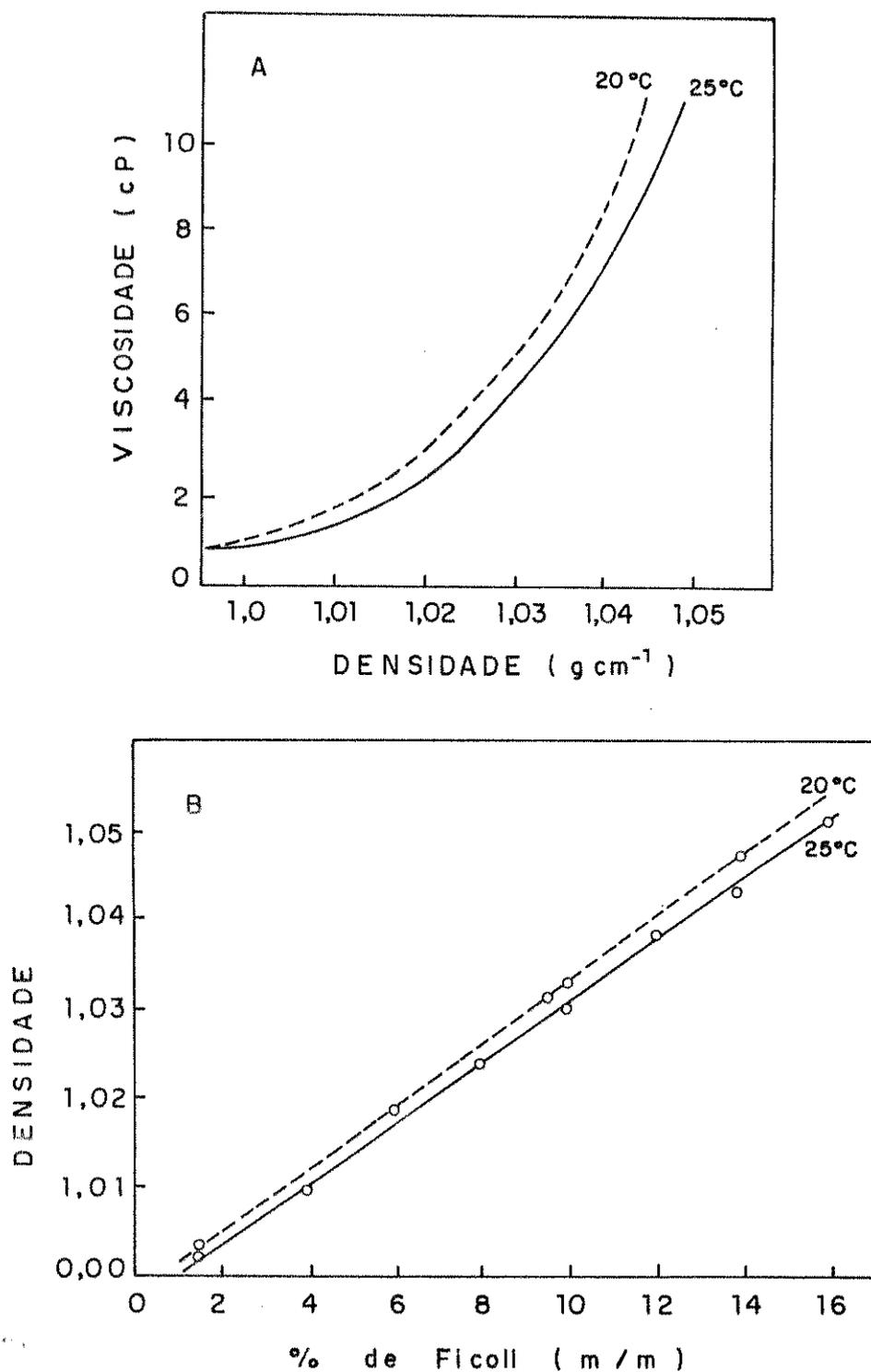


Figura 2.3. Curvas de calibração de soluções aquosa de Ficoll: A) viscosidade x densidade; B) densidade x concentração de Ficoll.

### 2.2.3. Preparação das Membranas

As membranas utilizadas nos experimentos de osmocentrifugação são membranas assimétricas de acetato de celulose preparadas segundo o procedimento já publicado por este laboratório (72-73), a partir de solução contendo 10 g de acetato de celulose, 38 ml de acetona, 35 ml de ácido acético e 21 ml de água.

Para a preparação das membranas, as soluções foram espalhadas sobre placas de vidro, munidas de dois fios de níquel-cromo de 0,4 mm de espessura (fio nº26), esticados para permitir o controle de uniformidade da espessura do filme. Para espalhar as soluções, foi utilizado um bastão de vidro, que corria sobre os fios. O solvente foi deixado evaporar por 10 minutos, introduzindo-se, então, a placa em um recipiente com água filtrada, para que o polímero coagulasse, a T ambiente.

### 2.2.4. Células de osmocentrifugação

As células de osmocentrifugação usadas nos experimentos foram construídas com chapas de acrílico ou de poliéster reforçado com fibra de vidro (Figuras 2.4 e 2.5). Cada módulo era composto por placas rígidas de acrílico ou poliéster, justapostas e parafusadas, de maneira a formar dois compartimentos separados entre si por uma membrana semipermeável. As membranas foram ajustadas, no módulo, sobre um suporte de níquel perfurado por eletroerosão. Este suporte contém 1444 furos por  $\text{cm}^2$ , sendo o diâmetro dos furos igual a 0,02 mm.

Nos experimentos iniciais para a obtenção de gradientes

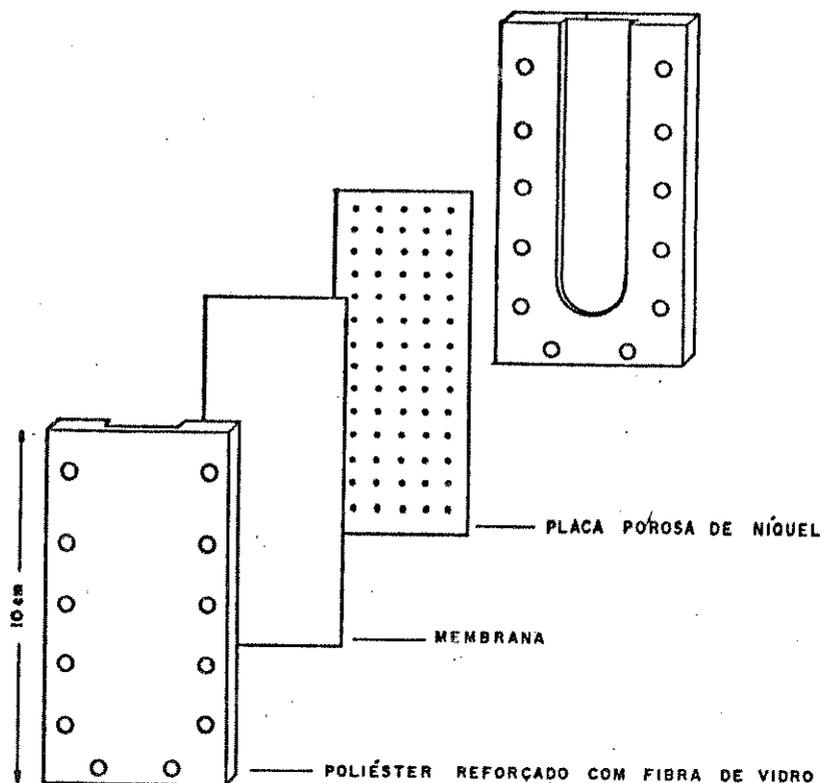


Figura 2.4. Células de osmocentrifugação construídas com chapas de poliéster reforçado com fibra de vidro.

de densidade foram utilizadas células feitas de poliéster reforçado com fibra de vidro (Figura 2.4), com compartimentos de  $4,5 \text{ cm}^3$  cada um, separados por  $15 \text{ cm}^2$  de membrana. Nos experimentos de fracionamento de uma mistura de látexes foi utilizada a célula de acrílico, para permitir o acompanhamento visual do deslocamento das zonas de látexes. Nas células de acrílico (Figura 2.5), cada compartimento tem  $16 \text{ cm}^3$ ; os compartimentos são separados por  $23,8 \text{ cm}^2$  de membrana.

Foram construídas células de múltiplo estágio destinadas à separação numa única etapa de soluções e dispersões em laborató-

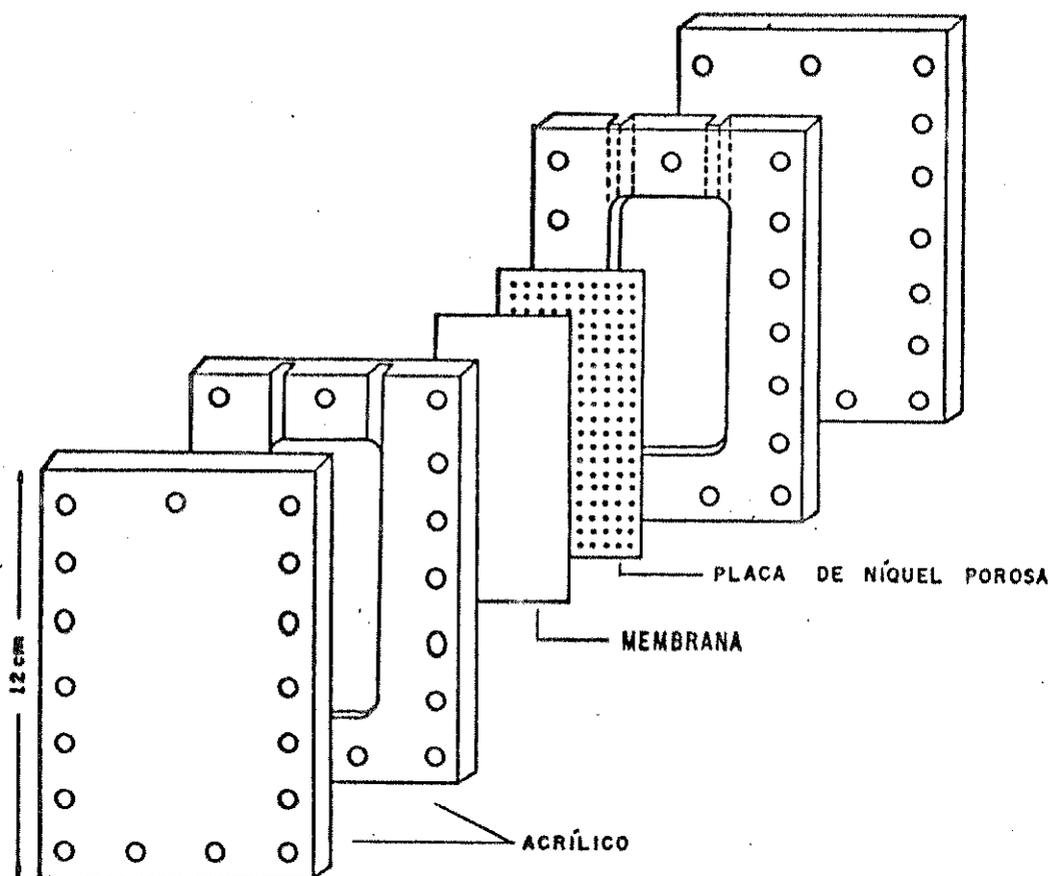


Figura 2.5. Células de diálise construídas com folhas de acrílico.

rios químicos, biológicos e farmacêuticos, em processos industriais ou pesquisas com a finalidade de reduzir custos, tempo e riscos de contaminação por consistir o aparelho ou ultrafiltro num módulo de quatro compartimentos intercalados por membranas semi-permeáveis fabricadas com material disponível no mercado nacional (Figura 2.6). Foi apresentado o pedido de prioridade desse módulo junto ao Instituto Nacional de Prioridade Industrial (74). O referido módulo foi utilizado por M.C. Gonçalves para o fracionamento das proteínas de soro bovino (75-76).

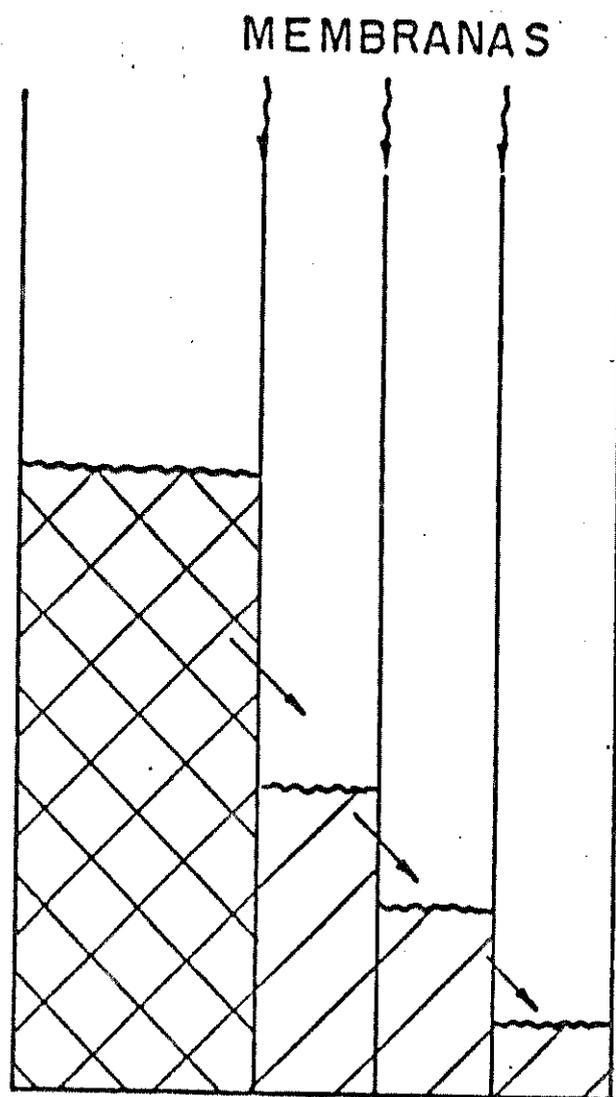


Figura 2.6. Representação esquemática de uma célula de ultrafiltração centrífuga de três estágios; as membranas possuem poros mais estreitos da esquerda para a direita.

### 2.2.5. Obtenção de gradientes de densidade auto-gerados por osmocentrifugação e ultrafiltração centrífuga

Gradientes de densidade foram obtidos por osmocentrifugação e ultrafiltração centrífuga utilizando as membranas e células descritas, respectivamente, nos itens 2.2.2 e 2.2.3.

Na osmocentrifugação, um dos compartimentos é cheio com a solução formadora do gradiente de densidade (Ficoll ou Ficoll-sacarose), enquanto o outro compartimento contém o solvente, seja água pura ou solução aquosa de sacarose.

Na ultrafiltração centrífuga, um dos compartimentos é cheio com a solução formadora do gradiente de densidade (Ficoll ou Ficoll-sacarose), enquanto o outro compartimento fica vazio para permitir a filtração do solvente.

Após um determinado tempo de centrifugação, o conteúdo dos dois compartimentos é retirado, simultaneamente, com o auxílio de uma seringa de vidro. Em seguida, as densidades das alíquotas são determinadas, medindo-se o seu índice de refração.

Soluções de Ficoll e Ficoll-sacarose foram centrifugadas, nas seguintes condições:

1. solução aquosa de partida: Ficoll 8% e sacarose 14% (m/m) a 1 h, 20°C nas velocidades de rotação: 1000, 2000 e 3000 rpm (Tabela 2.3 e Figura 2.7); 2000 rpm, 2 h nas temperaturas 4 e 20°C (Tabela 2.4 e Figura 2.7); 2000 rpm, 20°C nos tempos 1 e 2 h (Figura 2.7); em célula de poliéster reforçado;

2. solução aquosa de partida: Ficoll 8% (m/m), 3000 rpm, 145 min, 20°C em célula de acrílico (Tabela 2.5 e Figura 2.8), em célula de acrílico.



Tabela 2.4. Gradientes de densidade de Ficoll-sacarose (solução aquosa de partida: Ficoll 8% e sacarose 14% (m/m);  $\rho_0 = 1,08 \text{ g cm}^{-3}$ ) obtidos por osmocentrifugação e ultrafiltração centrífuga durante 2 h a 2000 rpm, e temperaturas diferentes.

Temperatura (°C)	Densidade ( $\text{g cm}^{-3}$ )					
	Osmocentrifugação			Ultrafiltração centrífuga		
	20	4		20	4	
0,4	1,0570	1,0590				
1,2	1,0620	1,0620	1,0690			
2,0	1,0670	1,0670	1,0690			
2,8	1,0690	1,0675	1,0725	1,0750	1,0750	
3,6	1,0725	1,0735	1,0760	1,0795	1,0780	1,0820
4,4	1,0760	1,0760	1,0795	1,0820	1,0840	1,0860
5,2	1,0780	1,0780	1,0810	1,0860	1,0870	1,0910
6,0	1,0795	1,0780	1,0820	1,0905	1,0890	1,0975
6,8	1,0820	1,0800	1,0860	1,0905	1,0970	1,0975
7,4	1,0860	1,0820	1,0860	1,0975	1,1000	1,1000

Tabela 2.5. Gradientes de densidade de Ficoll (solução aquosa de partida: Ficoll 8% (m/m);  $\rho_0 = 1,04 \text{ g cm}^{-3}$ ) obtidos por osmocentrifugação a 3000 rpm, 20°C e 145 min.

Altura média da célula (cm)	Densidade ( $\text{g cm}^{-3}$ )		Viscosidade (cP)	
0,5	1,0070	1,0080	0,012	0,012
1,1	1,0100	1,0110	0,014	0,016
1,6	1,0125	1,0125	0,017	0,017
2,1	1,0160	1,0160	0,020	0,020
2,7	1,0175	1,0175	0,022	0,022
3,2	1,0180	1,0180	0,023	0,023
3,7	1,0200	1,0190	0,026	0,024
4,3	1,0215	1,0200	0,028	0,026
4,8	1,0250	1,0225	0,035	0,030
5,4	1,0290	1,0260	0,042	0,036
5,9	1,0325	1,0290	0,051	0,042
6,4	1,0350	1,0300	0,057	0,046
7,0	1,0360	1,0310	0,060	0,048

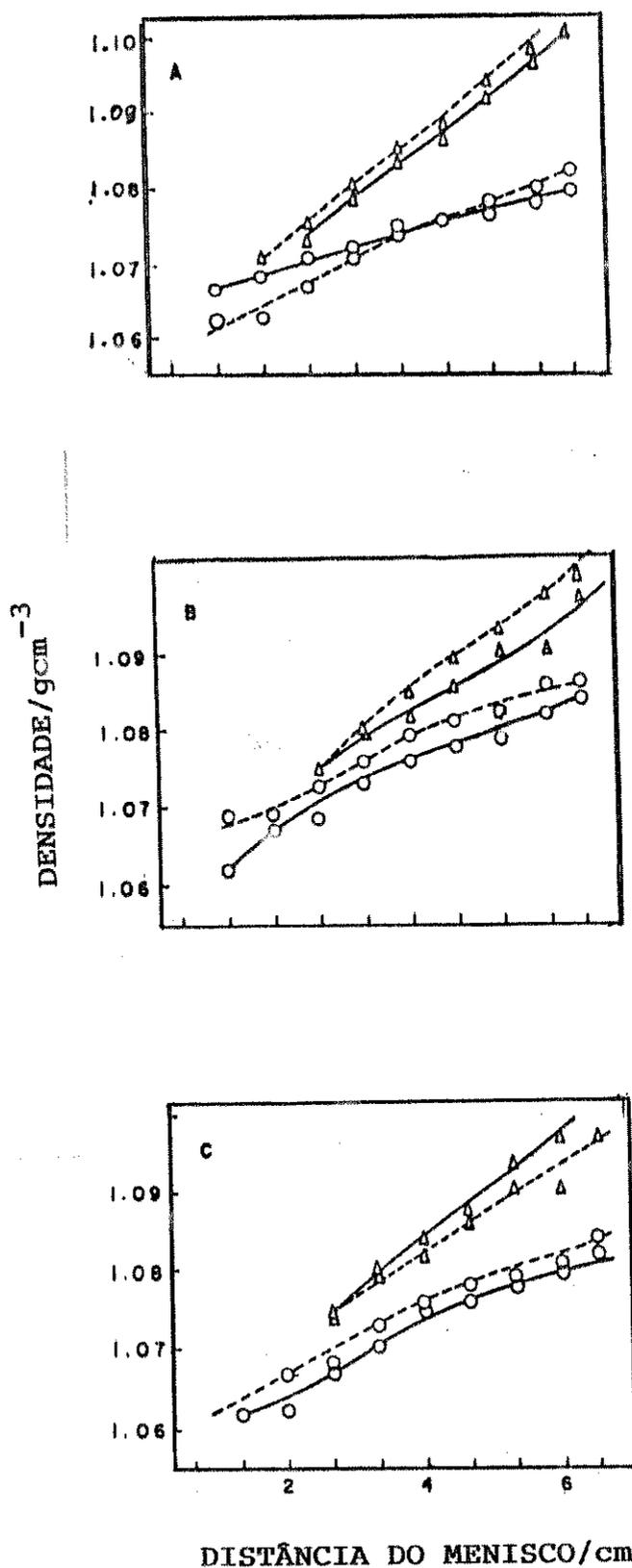


Figura 2.7. Gradientes de densidade de Ficoll obtidos por osmocentrifugação (o) e ultrafiltração centrífuga ( $\Delta$ ): densidade de partida  $1,08 \text{ g cm}^{-3}$ . Condições de centrifugação: (A) 1 h,  $20^{\circ}\text{C}$ , (—) 1000 rpm; (-.-) 2000 rpm; (B) 2 h, 2000 rpm (—)  $20^{\circ}\text{C}$ , (-.-)  $4^{\circ}\text{C}$ ; (C) 2000 rpm,  $20^{\circ}\text{C}$ , (—) 1 h, (-.-) 2 h.

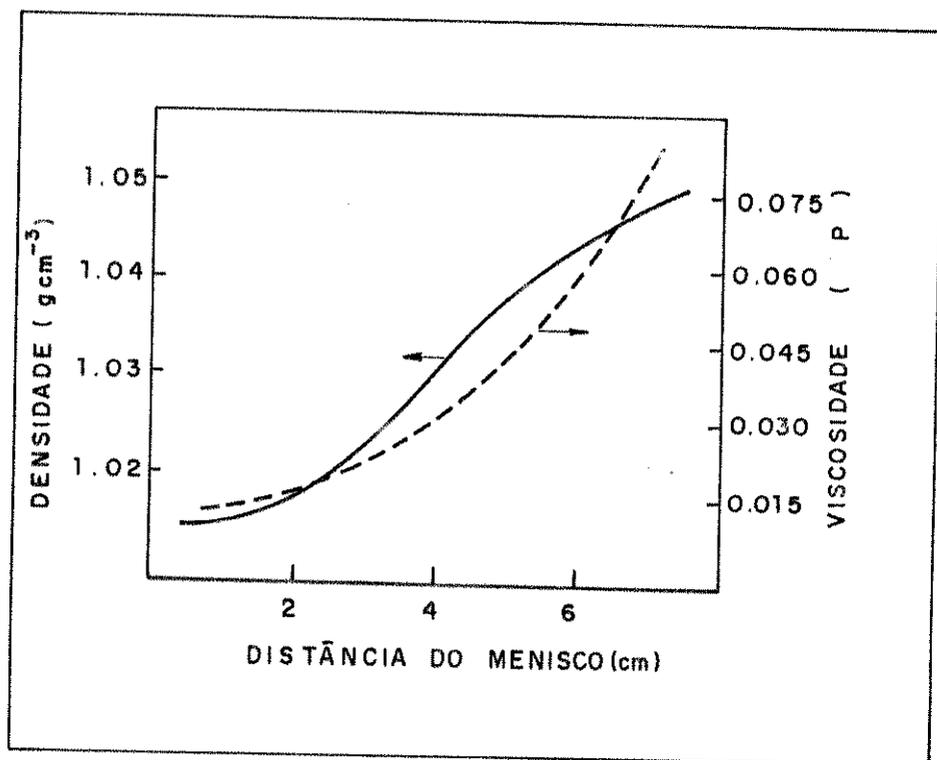


Figura 2.8. Gradientes de densidade e viscosidade de Ficoll obtidos em célula de osmocentrifugação a 3000 rpm, 145 h e  $20^{\circ}\text{C}$ ; solução aquosa de partida Ficoll 8% (m/m).

#### 2.2.6. Fracionamento de látex de poliestireno em gradiente de densidade de Ficoll

Para testar a possibilidade de fracionar uma mistura de látexes contendo partículas agregadas e não agregadas, foram inicialmente preparados os seguintes gradientes de densidade auto-generados por osmocentrifugação a 3000 rpm, 2 h,  $20^{\circ}\text{C}$ :

(i) solução aquosa de partida: Ficoll 8% (m/m) e sacarose 8% (m/m),  $\rho_0 = 1,06 \text{ g cm}^{-3}$ ;

(ii) solução aquosa de partida: Ficoll 8% (m/m) e sacarose 2% (m/m),  $\rho_0 = 1,04 \text{ g cm}^{-3}$ ;

(iii) solução aquosa de partida: Ficoll 8% (m/m),  $\rho_0 = 1,02 \text{ g cm}^{-3}$ .

Em seguida uma amostra de 0,4 ml, contendo 0,2 ml de uma mistura de partículas de látexes monodispersos com diâmetros nominais de 0,305 e 0,460  $\mu\text{m}$  e 0,2 ml de uma amostra de látex polidisperso, foi igualmente posta sobre os três gradientes de densidade obtidos no item 2.2.2, na própria célula em que foram gerados e, em seguida, levados à centrífuga por mais 4 h, 3000 rpm, 20°C.

Os experimentos realizados indicaram o gradiente de Ficoll a 8% (m/m) em meio aquoso (3000 rpm, 145 min 20°C) como o mais apropriado para esse tipo de fracionamento (Figura 2.9).

A partir desse resultado, gradientes de densidade foram auto-gerados por osmocentrifugação de uma solução aquosa de Ficoll 8% (m/m) (densidade de partida 1,024 g/ml) a 3000 rpm, 20°C, por 145 min. Uma banda de látex de PS (0,2 ml, 2% m/m) foi colocada sobre uma coluna de gradiente e a cela foi centrifugada por mais 4 h. As frações do conteúdo da célula foram tomadas a várias alturas da célula, quando então foram medidos os índices de refração e a turbidez. Os resultados são apresentados nas Figuras 2.9 e 2.10. A formação de bandas de látex bem resolvidas é observada na Figura 2.10 em centrifugação com amostras de látex monodisperso ((A) e (B)), com mistura de látexes monodispersos (C) e com mistura contendo dois látexes monodispersos e um látex polidisperso (D). Cada curva apresentada na Figura 2.10 é resultado da média de dois experimentos. As fotos apresentadas na Figura 2.11, registram: Fotos (B) e (C), experimentos com amostras de látexes monodispersos; Foto (D), experimento com amostra de látex polidisperso.

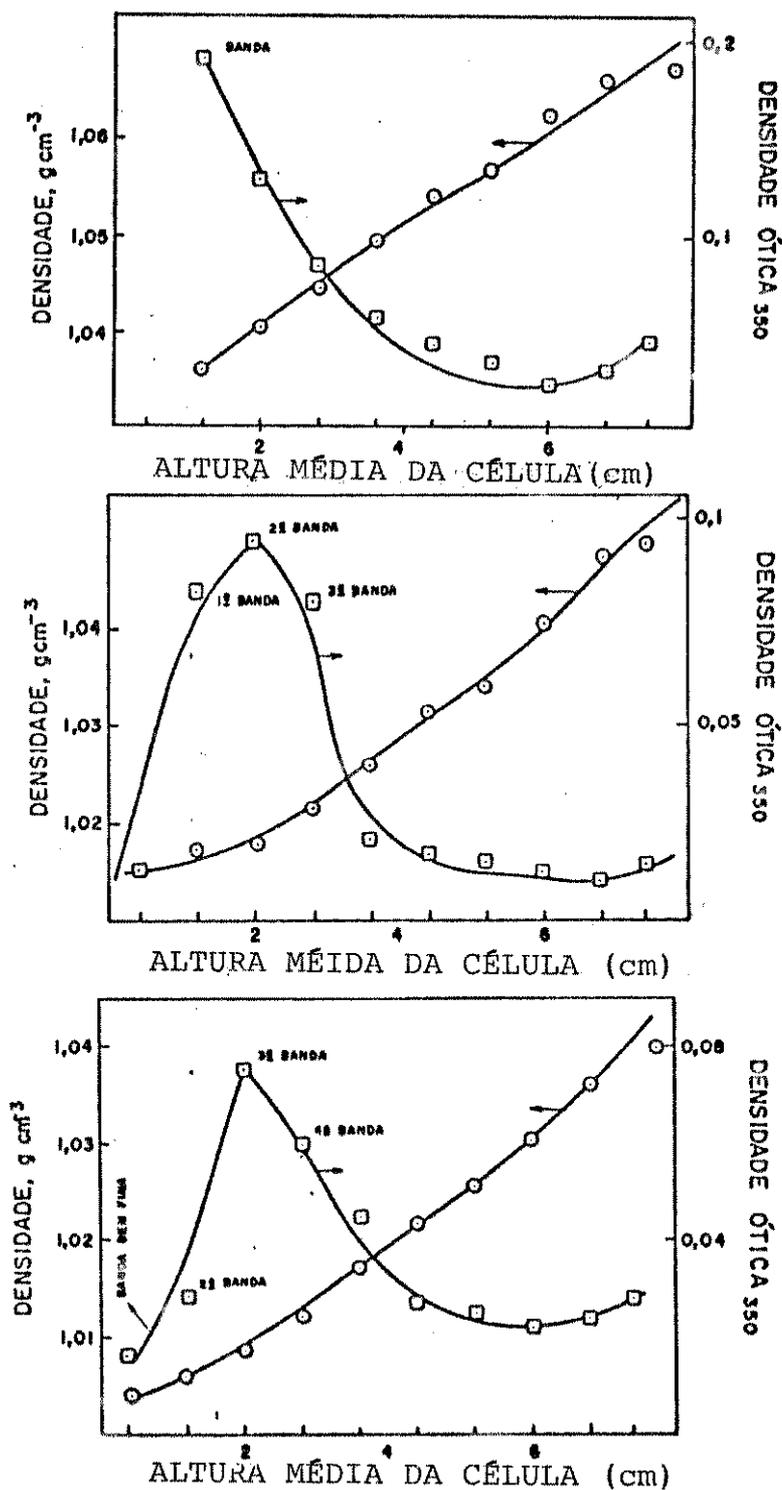


Figura 2.9. Fracionamento de partículas de látex em experimentos de osmocentrifugação zonal em gradientes de densidade: (A) Ficoll 8% e sacarose 8% (m/m); (B) Ficoll 8% e sacarose 2% (m/m); (C) Ficoll 8% (m/m); todos em meio aquoso. Amostra dos experimentos A, B e C: partículas de látex monodisperso (0,305 e 0,460  $\mu\text{m}$ ) e polidisperso.

Condições de centrifugação: (i) 3000 rpm, 2 h, 20<sup>o</sup>C (obtenção dos gradientes) e (ii) 3000 rpm, 4 h, 20<sup>o</sup>C (fracionamento das partículas).

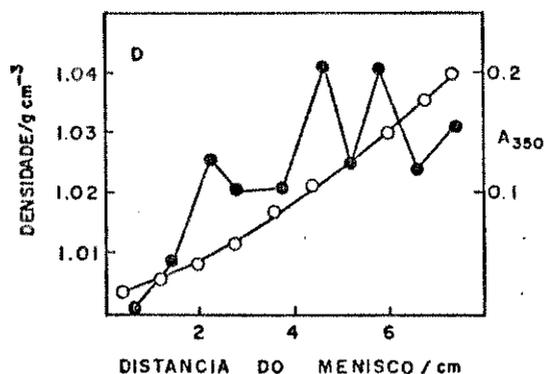
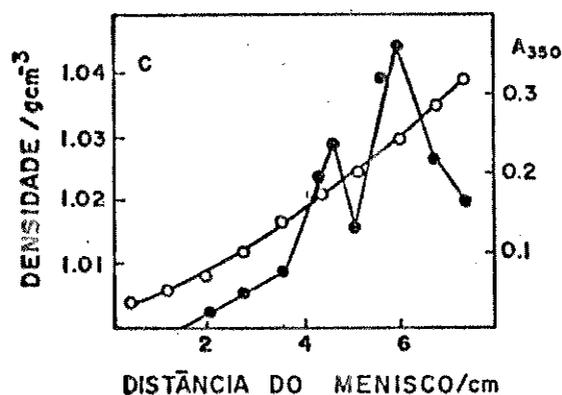
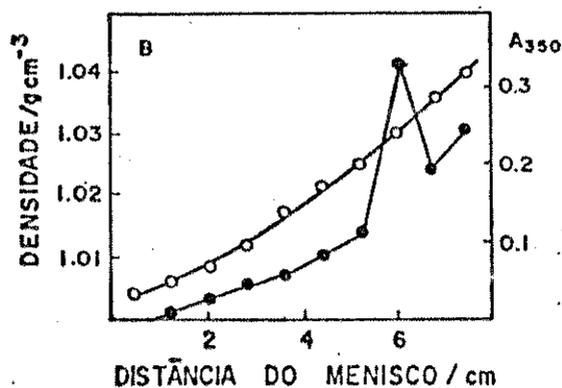
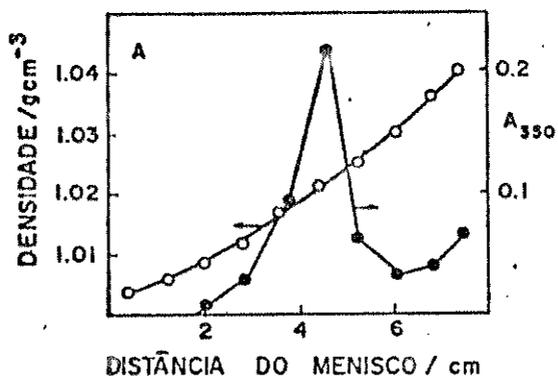


Figura 2.10. Formação e fracionamento de bandas de látex de PS em célula de osmocentrifugação. Diâmetro das partículas de látex: (A) 0,305 μm; (B) 0,460 μm; (C) 0,305 e 0,460 μm; (D) 0,109 (amostra polidispersa), 0,305 e 0,460 μm. Centrifugações a 3000 rpm, 20°C. Gradientes de Ficoll foram pré-formados durante 2 horas; zonas de amostras foram adicionadas e centrifugadas por outras 4 h.

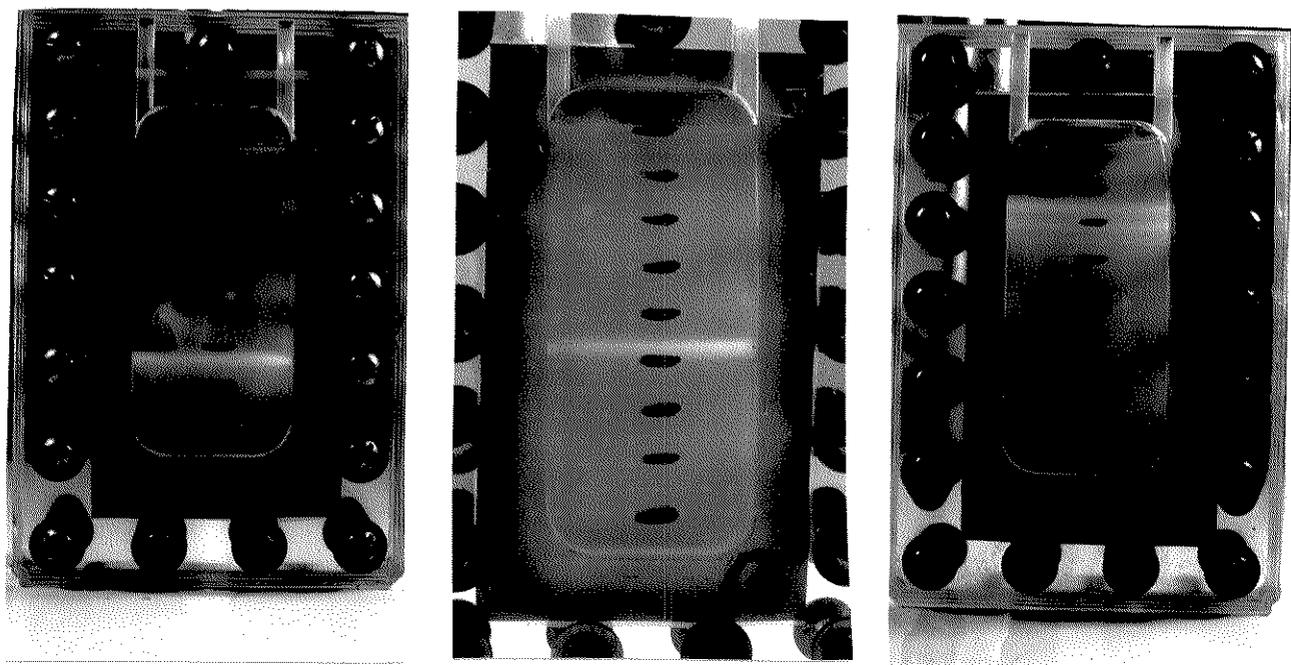


Figura 2.11. Fotos da formação e fracionamento de bandas de látex de PS em célula de osmocentrifugação. Gradiente de densidade pré-formado de Ficoll:  $1,005 - 1,04 \text{ g cm}^{-3}$ , obtido após 2 h de centrifugação a 3000 rpm e  $20^{\circ}\text{C}$ . Zonas de amostras de látex foram adicionadas e centrifugadas por outras 4 h; diâmetros das amostras: (B)  $0,460 \text{ }\mu\text{m}$ ; (C)  $0,305 \text{ }\mu\text{m}$  e (D)  $0,109 \text{ }\mu\text{m}$  (amostra polidispersa).

### 2.2.7. Estabilidade do gradiente de densidade em célula de osmocentrifugação

Para determinar mudanças no gradiente de densidade em cela de osmocentrifugação, foram obtidos gradientes em uma solução de Ficoll 8% (m/m) por centrifugação durante 2 h, 3000 rpm, 20°C. Uma mistura de látex de 3 diferentes tamanhos (monodispersos: 0,305 e 0,460  $\mu\text{m}$ ; polidisperso: 0,109  $\mu\text{m}$ ) foi colocada no topo do gradiente pré-formado, junto com marcadores de densidade. As células foram então centrifugadas (3000 rpm, 20°C): os deslocamentos de ambos, a banda de látex e marcadores de látex, foram seguidos. A Figura 2.12 mostra um gráfico da banda de látex/posição do marcador, como uma função do tempo. Algumas conclusões podem ser tiradas: até 6 h foram observadas mudanças significativas na posição dos marcadores; após esse tempo foram detectadas mudanças muito pequenas; as bandas de látex se deslocam independentemente, mas as bandas das partículas maiores se fundem após 52 h, como é esperado visto que o equilíbrio isopícnico é alcançado; a banda das partículas menores de látex torna-se tênue, não podendo ser seguida após aproximadamente 28 h.

Estes resultados mostram que a migração das bandas de látex ocorre em um movimento descendente; a densidade do meio muda nas primeiras horas e, posteriormente, a densidade do meio fica inalterada. Cada curva da Figura 2.12 representa uma média de dois experimentos.

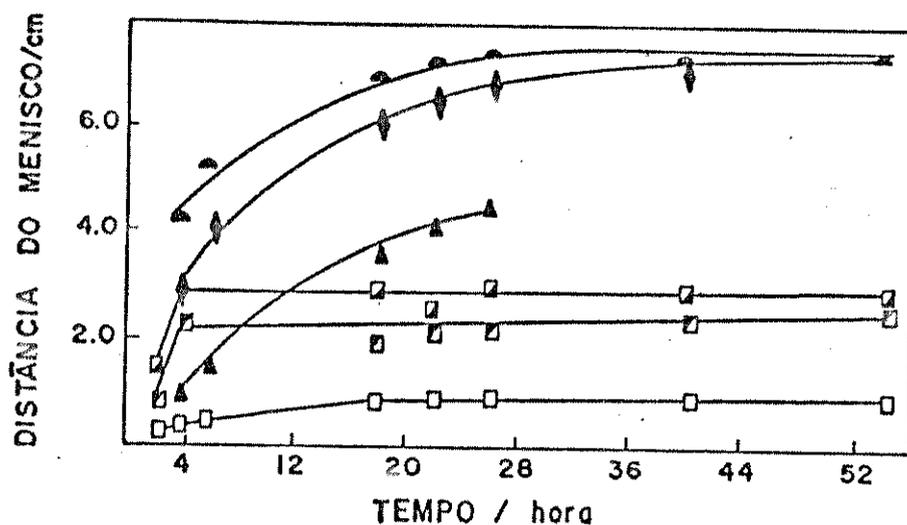


Figura 2.12. Deslocamento da zona de PS e dos marcadores de densidade em célula de osmocentrifugação, em função do tempo. 3000 rpm, 20°C. Diâmetros das partículas de PS: (▲) 0,460 μm; (◆) 0,350 μm; (▲) 0,109 μm. Densidade dos marcadores (□) 1,002; (◻) 0,1008 e (◻) 1,010 g cm<sup>-3</sup>.

#### 2.2.8. Velocidade de migração da banda de látex em osmocentrifugação e em centrifugação normal

O gradiente de densidade de Ficoll foi pré-formado por centrifugação de uma solução de Ficoll a 8% (m/m) e sacarose 4% (m/m) (6,5 cm de altura) em uma célula de diálise. O gradiente foi então transferido para um tubo de vidro (altura de 6,1 cm) e 0,2 ml de látex 0,2% (mistura de partículas com diâmetros 0,305 e 0,460 μm) foi posto no gradiente. O tubo de vidro foi então centrifugado a 3000 rpm e 20°C e a posição das bandas foi medida em função do tempo. Um outro experimento paralelo foi realizado do mesmo modo mas com a seguinte diferença: o látex de PS foi coloca-

do sobre o gradiente dentro da célula de diálise e, novamente centrifugado. Os resultados (Figura 2.13) mostram que o equilíbrio isopícnico é alcançado a cerca de 90 h na célula de osmocentrifugação; contudo, no tubo de vidro as zonas de látex continuam se deslocando mesmo após 140 h, demonstrando não ter ainda alcançado o equilíbrio. A densidade do látex foi determinada no experimento isopícnico. O valor obtido,  $1,048 \text{ g cm}^{-3}$ , concorda com dados da literatura (62). Estes experimentos provam que o movimento da zona em osmocentrifugação é mais rápido que em centrifugação normal. As curvas da Figura 2.13 representam uma média de dois experimentos.

Nós já citamos que o equilíbrio do gradiente de densidade é alcançado após poucas horas de osmocentrifugação. Consequentemente, o deslocamento mais rápido da zona na célula de osmocentrifugação não pode ser explicado somente pelo deslocamento descendente do movimento do líquido. Nós propomos que correntes locais de líquido, osmótica e osmótica-reversa, são formadas acima e abaixo da zona, puxando-a para baixo e tornando o movimento da zona mais rápido que seria o movimento das partículas independentes. Veja Figura 2.14.

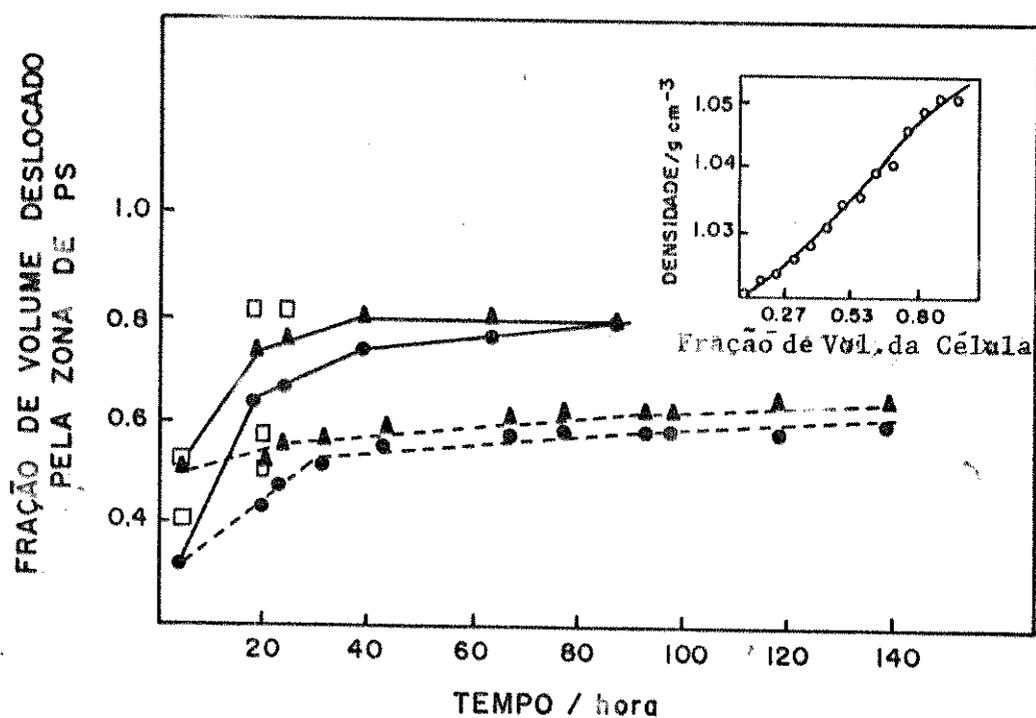


Figura 2.13. Deslocamento da zona de PS em célula de osmocentrifugação (-) e tubo de vidro (---), em função do tempo. Centrifugação a 3000 rpm, 20°C. Diâmetro das partículas de látex: (●) 0,305 μm; (▲) 0,460 μm; (□) zona tênue. O quadro inserido mostra o gradiente de densidade de Ficoll 8% (m/m), 3000 rpm, 4 h, 20°C.

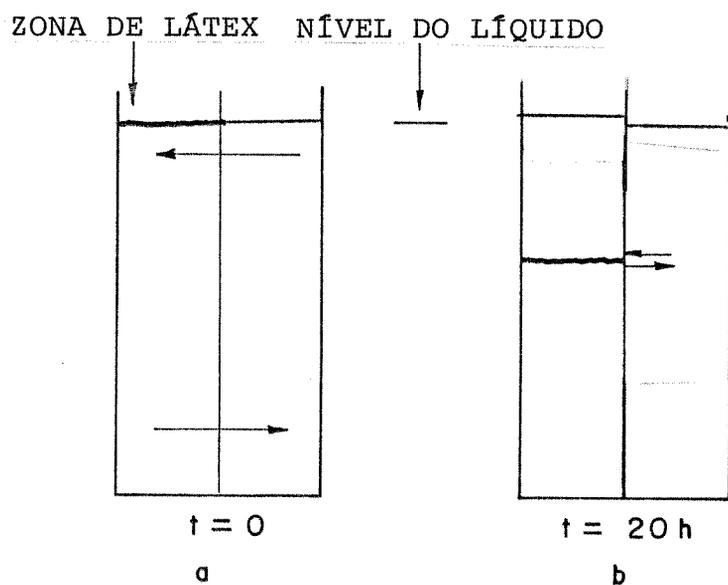


Figura 2.14. Mecanismo proposto para a migração rápida de uma zona em osmocentrifugação. Há uma corrente osmótica na parte superior da zona e uma corrente osmótica-reversa na parte inferior. O resultado é o movimento da zona de látex, mais rápido do que o observado em um tubo de centrifugação.

### 2.3. Discussão

A metodologia aqui estabelecida, osmocentrifugação zonal e centrifugação zonal (usando gradientes de Ficoll auto-gerados por osmocentrifugação), mostrou que o fracionamento por tamanho é factível em escala analítica e preparativa. Isto pode permitir que frações praticamente monodispersas sejam obtidas de material polidisperso em quantidades da ordem de algumas gramas. Usando grandes frascos (6 x 1 l) em experimentos de centrifugação zonal, pode-se estimar que amostras de látex contendo até 2,4 g de polímero possam ser fracionadas em uma única centrifugação (20 ml de uma dispersão 2% (m/m) pode ser usada em cada frasco de 1 litro), a custo muito inferior ao do fracionamento em uma ultracentrífuga (13).

Além disso, nós podemos obter das zonas de látex fracionadas, material suficiente para trabalhos posteriores. Isto não pode ser conseguido em ultracentrífuga analítica (13,20-21).

Em relação aos nossos resultados de fracionamento de látexes poliméricos já publicados (Winkler-H., A.A. et al., 1987 (77); Costa, M.C.P. et al., 1987 (78); Costa, M.C.P. et al., 1988 (79)) pode-se dizer que a técnica de fracionamento de látexes poliméricos agora disponível, possui as seguintes propriedades: alta resolução, capacidade de fracionar por tamanho, capacidade de fracionar grandes amostras e rapidez nos resultados.

Nós consideramos importante o fato de que a velocidade de migração nas células de osmocentrifugação é muito mais rápida, do que em tubo de centrifugação. Isto pode ser explicado por considerar que o deslocamento das zonas introduz um distúrbio no potencial químico do solvente, mesmo quando o gradiente formado alcança

o estado de equilíbrio. Uma corrente osmótica do solvente pode aparecer no topo da banda e uma corrente reversa pode ocorrer na parte inferior da banda; como resultado a velocidade da banda possui dois componentes: um, devido ao movimento das partículas com relação ao líquido dentro da zona; outro, que corresponde ao movimento do próprio líquido da zona, arrastado pela corrente de massa osmótica direta e reversa. Este último ponto será retomado na discussão dos resultados do capítulo 5.

### 3. ESTUDOS DE AGREGAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS DE PS

#### 3.1. Introdução: Agregação de Partículas de Látex de PS

A agregação de partículas para formar novas estruturas é a etapa mais importante de diversos processos em química, biologia e física. Exemplos incluem: reações de polímeros orgânicos, reações antígeno-anticorpo, processos de coagulação em colóides e aerossóis, transições de fase em sistemas de spins magnéticos desordenados e processos de percolação em física estatística.

Muitos progressos têm sido alcançados no conhecimento teórico de tais processos através da equação de coagulação de Smoluchwsky (80) e através de simulações por computador (81). Infelizmente, muitas das previsões dessas teorias relativas a "porque" ocorre a agregação, são difíceis de testar devido a problemas de ordem experimental que ocorrem ao se tentar elucidar "como" se formam os agregados.

Para o estudo completo dos fenômenos de agregação é fundamental responder aos dois pontos: porque e como se formam os agregados. Experimentalmente é necessário dispor de métodos que permitam resolver dois problemas fundamentais:

- i) separar os agregados sem modificar as suas estruturas; quantificar as concentrações de agregados em função do tempo;
- ii) conhecer as estruturas dos agregados.

Isto pode levar ao conhecimento quantitativo de todas as reações envolvidas no processo de agregação.

Recentemente, muitos grupos estão se capacitando para

medir a distribuição de tamanhos de agregados durante a agregação de partículas de dimensões coloidais (11,14-19,82). A seguir será feito um breve relato do trabalho desses grupos.

M.S. Bowen, M.L. Broide e R.J. Cohen, 1985 e 1987 (16-17): no trabalho destes autores a amostra a ser analisada é injetada em uma cela de fluxo laminar na qual os agregados são focalizados hidrodinamicamente, formando uma fila única diante de um feixe de raio laser. Quando cada agregado atravessa o feixe, produz um pulso de luz espalhada, cuja intensidade é relacionada com o tamanho do agregado. As esferas de PS usadas nesse estudo têm o diâmetro nominal de  $0,516 \mu\text{m}$ , a indução de coagulação das partículas foi feita com  $[\text{NaCl}] = 0,5 \text{ M}$  e a concentração inicial das esferas foi de  $1,1 \times 10^8$  por  $\text{cm}^3$ . Foram usadas células de vários diâmetros (10-50  $\mu\text{m}$ ) para diferentes estágios de agregação, desde pequenos até grandes diâmetros. Nessas condições os autores já conseguiram resolver 12 tipos de agregados sem se reportarem, contudo, à sua forma. E, embora nenhum precipitado macroscópico seja visível nas amostras, os autores relacionam a ocorrência de longos pulsos anômalos à presença de grandes agregados com raio próximo de 20 vezes ao do monômero, formados em longos tempos de agregação. Para o futuro eles propõem usar uma concentração de NaCl, inferior à concentração crítica de coagulação (0,5 M), para criar um processo onde a agregação seja melhor controlada.

P.G. Cummins, E.J. Staples, L.G. Thompson, A.L. Smith e L. Pope, 1983 (15) usaram um procedimento experimental similar ao do relato anterior. Os autores mencionam que o intervalo da intensidade de pulsos, mesmo para uma amostra de baixa polidispersidade e pequeno grau de agregação, pode exceder a faixa dinâmica do fo-

tomultiplicador. Por isso, partículas não agregadas foram detectadas por espalhamento e partículas agregadas por fluorescência, que têm a vantagem de ampliar a faixa dinâmica do espalhamento. Contudo, essa solução não resolve problemas relacionados com a morfologia e orientação dos agregados. Foi observado que a largura dos picos associados a dímeros, trímeros e n-meros aumenta monotonicamente e pode causar superposição de sinais individuais. As partículas usadas nos experimentos de agregação possuem o diâmetro nominal de  $0,88 \mu\text{m}$  e dispersão de 10% no tamanho; a concentração foi acima de  $10^8$  partículas por  $\text{cm}^3$  e o eletrólito usado foi  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  a uma concentração de  $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ , para permitir uma rápida agregação.

G.K. von Schulthess e G.B. Benedek, 1983 (82). Foi usado um "nanopar resistive pulse analyser", análogo aos "coulter counters", para investigar a evolução temporal da distribuição de tamanhos de agregados anticorpo-antígeno, nos quais os anticorpos são ligados a esferas de poliestireno de  $0,235 \mu\text{m}$  de diâmetro. O método consiste de dois compartimentos separados por um filme de policarbonato de  $8 \mu\text{m}$  de espessura que contém um único orifício com diâmetro de aproximadamente  $2 \mu\text{m}$ . Uma pressão equivalente a uma coluna de  $10 \text{ cm}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  produz um fluxo de partículas através desse orifício. Uma fonte constante de corrente produz uma diferença de potencial de cerca de  $1,8 \text{ V}$  através do poro. Por acumulação do número de pulsos é possível obter um histograma da distribuição de tamanhos.

H. Gedan, H. Lichtenfeld and H. Sonntag, 1982 (14). Foi investigada uma rápida coagulação de partículas látex de PS de diâmetro  $0,25 \mu\text{m}$  em  $\text{KNO}_3$   $0,3 \text{ mol/l}$ . Foi medido o número de single-

tes, dubletes e tripletes com um fotômetro de espalhamento de partículas individuais.

R.M. Cornell, J.W. Goodwinn, R. Buscall, Th. F. Tadros, P.A. Reynolds, G.C. Jeffrey e R.H. Ottewill. (1979, 1982, 1987, 1988) (11,18-19,83). Em 1979 (18) foi publicado um estudo de processos de agregação com partículas de látex de PS de diâmetro de 2  $\mu\text{m}$ , na presença de NaCl com concentração na faixa de  $5 \times 10^{-5}$  -  $3 \times 10^{-1}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Os estudos pretendem verificar: (i) a percentagem de singletes, como uma função do número total de partículas, a um determinado tempo e concentração de eletrólito; (ii) conhecer os tipos de agregados formados e a disposição das partículas dentro dos agregados; (iii) determinar a presença de movimentos de partículas dentro dos agregados e (iv) a dissociação de agregados previamente formados. Foram encontrados agregados que em sua grande maioria contêm menos que 5 partículas por unidade. Os dubletes se formam a partir dos primeiros minutos, após a adição de NaCl, enquanto os tripletes e quadrupletes se formam após 20 minutos. Foram também realizados estudos de agregação reversível em tempos curtos, com intervalo da ordem de minutos que se prolongaram até 400 minutos. Os estudos de mobilidade de partículas dentro dos agregados indicaram que: (i) partículas tipo singletes migram dentro do agregado; (ii) dubletes rodam dentro do agregado independente um do outro; (iii) agregados se transformam em cadeia e vice-versa; (iv) dubletes foram observados se dissociarem e moverem-se dentro do agregado; (v) muitos agregados apresentaram movimento em forma de ângulo. As amostras tinham a concentração de  $10^8$ - $10^9$  partículas. $\text{cm}^{-3}$ . O método utilizado foi microscopia dinâmica com aumento da ordem de 200-640 vezes, acoplado a uma câmara cine-

matográfica de alta velocidade. Em 1982 (83), em um trabalho sobre velocidade de sedimentação de dispersões de látex de PS, contendo partículas de raio =  $1,55 \mu\text{m}$ , em soluções de eletrólito e em soluções poliméricas de reduzido cisalhamento, é mencionado que ocorre um aumento na velocidade de sedimentação quando a concentração de NaCl é  $3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ . Nesta região são formados predominantemente dubletes e triplete. Um aumento na concentração de NaCl próximo a  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  conduz à formação de flóculos grandes e explica a discontinuidade dos dados nessa região. Em 1987 (19), foi publicado um estudo de agregação com partículas de diâmetro =  $3,47 \mu\text{m}$ . Foi encontrado que na concentração crítica de floculação ( $0,33 \text{ mol dm}^{-3}$ ) ou abaixo desta existe uma distribuição estreita de tamanho. Acima desta a coagulação é mais rápida. Os estudos foram feitos por observação direta usando um microscópio. Foi possível distinguir diretamente o tamanho e o número de agregados. Em 1988 (11), foi publicado um trabalho que relata a agregação de partículas de látex, com diâmetro variando de 210 a 1821 nm e, também, analisada a eficiência da diálise como um mecanismo para inverter o processo de agregação. O estudo foi monitorado por medidas de turbidez. Foram usados como eletrólitos NaCl ( $0,10 - 0,19 \text{ mol dm}^{-3}$ ) e  $\text{MgSO}_4$  ( $0,016 - 0,043 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Os resultados mostraram que para partículas  $0,21$  a  $0,34 \mu\text{m}$  ocorre agregação irreversível à concentração de NaCl de  $0,13 \text{ mol dm}^{-3}$ . Para partículas de  $0,78 - 1 \mu\text{m}$  foi obtida agregação reversível, mesmo a concentrações maiores que  $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$  de NaCl. Os resultados para  $\text{MgSO}_4$  foram contraditórios.

### 3.1.1. Tipos de agregação

A teoria da estabilidade coloidal de partículas hidrofóbicas, como formulada por Derjaguin e Landau (84) e Verwey e Overbeek (85) indica, com base na curva da energia potencial de interação (Figura 3.1) que dois diferentes tipos de agregação de partículas podem ser previstos. Quando a agregação ocorre no mínimo primário, as superfícies das partículas estão bem próximas  $d \leq 1-2 \text{ \AA}$ ; este processo é conhecido por coagulação. No caso de associação no mínimo secundário, um filme líquido é retido entre as partículas e o mínimo de energia (com a distância) é muito menos acentuado que na coagulação; este processo é chamado de floculação (11). O tipo de agregação que ocorre em uma dada situação, depende entre outros fatores do tamanho da partícula e da concentração do eletrólito. No caso da flocculação é possível redispersar as partículas pela remoção de eletrólito do sistema ou aplicando pequenas quantidades de energia mecânica. Por outro lado, no caso da coagulação, como consequência do mínimo de energia muito acentuado, uma redispersão não ocorrerá pela simples diminuição da concentração de eletrólito. A flocculação ocorre a concentrações de eletrólito abaixo da concentração crítica de coagulação (ccc), isto é, abaixo da concentração na qual a energia de repulsão entre as partículas se torna pequena, se comparada a  $kT$ .

### 3.1.2. Determinação experimental da ccc

O termo ccc é usado para descrever a concentração de eletrólito que causa agregação por coagulação. Em recente trabalho,

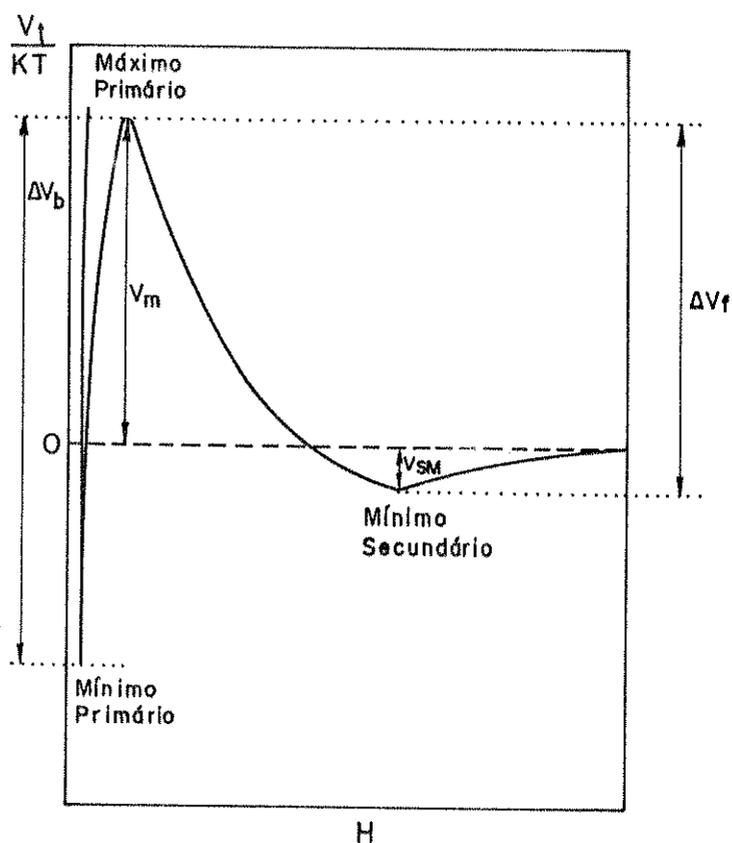


Figura 3.1. Ilustração esquemática de uma curva de  $V_t/kT$  versus  $H$  para ilustrar os principais aspectos usados na discussão da estabilidade coloidal.  $\Delta V_f$  = barreira de energia para a coagulação;  $\Delta V_b$  = barreira de energia para peptização;  $V_m$  = altura do máximo primário;  $V_{SM}$  = profundidade do mínimo secundário.

Ottewill refere-se a um outro termo, cac (concentração crítica de agregação), que é a concentração na qual se observa agregação, seja por floculação ou coagulação (11).

Do ponto de vista experimental, não há nenhuma dúvida que a ccc é uma quantidade muito importante a ser conhecida para um látex polimérico, visto que ela representa a concentração de eletrólito na qual ocorre perda de estabilidade. Experimentalmen-

te, a ccc pode ser obtida por uma variedade de métodos entre os quais o espalhamento de luz e a contagem de partículas. O método mais simples é possivelmente a observação visual de tubos de ensaio contendo a mesma concentração de látex e diferentes concentrações de eletrólito. Goodwin (19) descreve a determinação experimental da ccc para partículas cujo diâmetro nominal é  $3,47 \mu\text{m}$ , detalhada a seguir. A concentração crítica de coagulação foi determinada pipetando um determinado volume de uma dispersão conhecida de látex em cada um dos tubos de uma bateria de tubos de ensaio, e em cada um deles foi adicionada uma solução conhecida de sal. A faixa de concentração do eletrólito foi escolhida, sendo suficientemente larga para incluir o valor típico de ccc para eletrólitos monovalentes simétricos, isto é,  $3 \times 10^{-1} \text{ mol/litro}$ . As dispersões foram agitadas e, em seguida, deixadas repousar por 2 h, sendo então novamente agitadas. O volume do sedimento foi medido após um dia. O volume de sedimentação foi considerado ser indicativo da ocorrência de coagulação desde que, em uma coagulação rápida, as partículas formam uma rede cujo volume é menor que o do conjunto das partículas individuais que sedimentam em uma solução mais diluída de eletrólito. O aumento do volume de sedimentação com o aumento da concentração de eletrólito é mostrado na Figura 3.2. A ccc encontrada foi  $0,33 \text{ mol dm}^{-3}$  de NaCl, como sendo a menor concentração na qual o volume de sedimentação máximo é obtido. Este experimento somente pode ser executado com altas concentrações de partículas de látex, da ordem de  $4 \times 10^9 \text{ cm}^{-3}$ . Os valores da ccc podem variar com o tamanho da partícula, tipo e densidade de grupos superficiais, da partícula, presença ou ausência de materiais estabilizantes, como surfactantes, e o tipo de eletrólito.

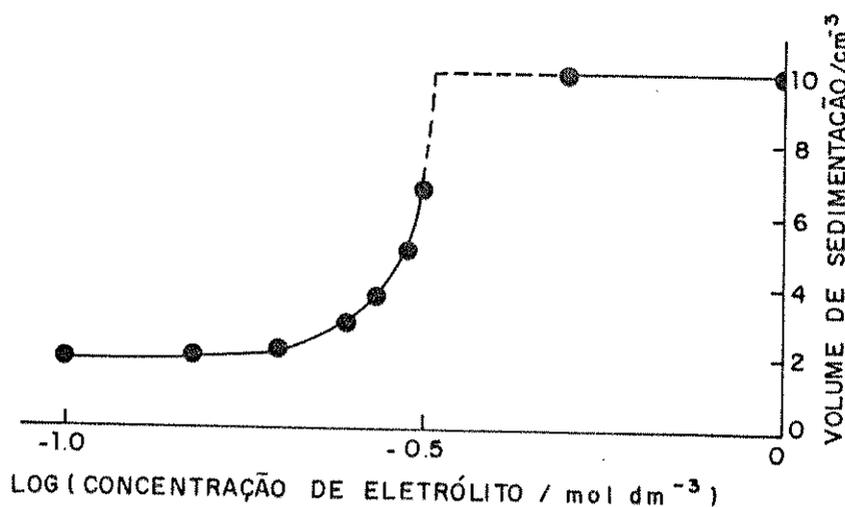


Figura 3.2. Volume de sedimentação das partículas de látex de PS versus log concentração de eletrólito (NaCl) para determinar a ccc. Concentração do número de partículas  $4 \times 10^9 \text{ cm}^{-3}$  (Ref. 19).

### 3.1.3. Estabilidade coloidal

A teoria da estabilidade coloidal DLVO (84-85) trata das variações de energia que ocorrem quando as partículas se aproximam umas das outras em um sistema coloidal. A teoria envolve estimativas de energia de atração (forças de London-van der Waals) e da energia de repulsão, ambas em função da distância interpartícula. Na dedução da expressão geral admite-se que a energia potencial repulsiva,  $V_R$ , e a energia potencial atrativa,  $V_A$ , são aditivas e produzem a energia potencial total. Derjaguin (84) obteve uma solução aproximada para a energia potencial repulsiva resultante da superposição das partes difusas de duplas camadas elétricas existentes em torno de duas partículas esféricas idênticas, Figura 3.3, cada uma delas de raio  $a$ , e sendo  $H$  a distância mais curta entre

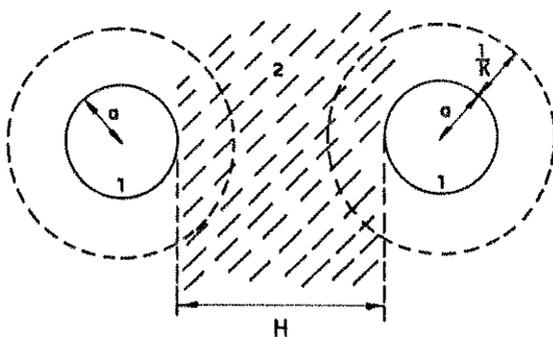


Figura 3.3. Interação entre duas partículas esféricas, de raio  $a$ , do material 1 em um meio líquido 2;  $1/\kappa$  = parâmetro da dupla camada;  $H$  = separação interfacial.

as duas esferas, tal que  $\kappa a > 10$

$$V_R = \frac{\epsilon a \Psi_s^2}{2} \ln [1 + \exp (-\kappa H)] \quad [3.1]$$

onde  $\Psi_s$  é o potencial na superfície de uma partícula e  $\kappa$  é o inverso do comprimento de Debye-Hückel. Para valores de  $\kappa a < 3$  e valores intermediários de  $10 < \kappa a < 3$ , outras soluções para a equação 3.1 são disponíveis na literatura (71). Uma solução aproximada para a energia potencial atrativa é encontrada em (19):

$$V_A = \frac{-Aa}{H} \left[ \frac{2,45}{60 p} - \frac{2,17}{180 p^2} + \frac{0,59}{420 p^3} \right] \quad [3.2]$$

onde

$$p = \frac{2\pi H}{\lambda} \quad [3.3]$$

nessa equação  $\lambda$  é tomado como 100 nm e  $A$  é a constante combinada de Hamaker. Esse tratamento admite que é razoável igualar o potencial zeta,  $\xi$ , com o potencial de superfície  $\Psi_s$  e que a constante

de Hamaker para partículas grandes de PS em água é da ordem de  $6 \times 10^{-21}$  J. Diante disso, é possível calcular o potencial de interação do par de partículas.

#### 3.1.4. Agregação no mínimo primário: Coagulação

A cinética de um processo de agregação possui dois fatores determinantes: a velocidade na qual as partículas colidem e a interação durante a colisão. A velocidade de colisão pode se dar em condições pericinéicas ou ortocinéicas. Em condições pericinéicas o movimento das partículas dentro de uma dispersão coloidal é originado pelo movimento Browniano translacional e rotacional. Em condições ortocinéicas o movimento das partículas é causado pelos fluxos no meio fluído.

Smoluchowski (86) considerou o caso de nenhuma repulsão entre as partículas em colisão, em condições pericinéicas. Isto é, na região acima da ccc e portanto em regime de coagulação rápida. Se um par de partículas esféricas de raio  $a$  tem um mínimo de energia potencial a uma distância mútua, entre suas superfícies,  $\delta a$ , então as duas partículas, cujos centros estejam separados por

$$2(a + \delta a) = R \quad [3.4]$$

ou menos, coagularão irreversivelmente. Para partículas grandes uma primeira aproximação é considerar  $R = 2a$ . O número de colisões por unidade de tempo é obtido pela solução de equações de difusão que consideram o fluxo de partículas através de uma esfera de raio  $a + \delta a$ . Se  $n_0$  é a concentração de partículas monodispersas e  $D_0$  o

coeficiente de difusão na primeira e segunda leis de difusão de Fick, a velocidade de colisão,  $J$ , é dada por

$$J = 8\pi R D_o n_o \quad [3.5]$$

A velocidade inicial do desaparecimento de partículas individuais (ou singletes) com o tempo é dada por

$$- \left( \frac{dn_s}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = 8\pi R D_o n_o^2 \quad [3.6]$$

onde  $n_s$  é a concentração de partículas individuais e  $n_s = n_o$  para  $t=0$ .

No caso onde as interações entre as diversas partículas são importantes, a velocidade total de coagulação  $J_T$ , é dada pela expressão

$$J_T = \frac{8\pi R D_o n_o}{W} \quad [3.7]$$

Esta expressão é obtida considerando-se que a velocidade de coagulação difere da velocidade de colisão por uma razão de estabilidade,  $W$ , representada por

$$W = 2a \int_{2a}^{\infty} \frac{\exp(V/kT)}{r^2} dr \quad [3.8]$$

onde  $V$  é a energia potencial de interação e  $kT$  é a energia térmica. Na ausência de uma barreira de energia, isto é, fazendo  $V = 0$ , é encontrado que  $W = 1$  e obtém-se a equação para coagulação rápida. Na presença de uma barreira de energia  $V$  torna-se positivo e  $W$  fica

maior que a unidade e, claramente, nestas condições a velocidade de coagulação é atenuada; ocorre então uma coagulação lenta. Na prática, a concentrações intermediárias de eletrólito e potenciais de grandeza média, ( $|\Psi_s| \approx 50 \text{ mV}$ ),  $W$  pode atingir valores da ordem de  $10^7$  de forma tal que a coagulação é imperceptível em uma escala razoável de tempo. Essa aproximação enfatiza a natureza cinética da estabilidade das dispersões coloidais. Desse modo, a razão de estabilidade  $W$  é a razão entre uma coagulação rápida e uma coagulação lenta. A velocidade inicial de desaparecimento de singletes, nesse contexto, é dada por

$$\left(-\frac{dn_s}{dt}\right) = \frac{8\pi RD_o n_o^2}{W} \quad [3.9]$$

### 3.1.5. Agregação no mínimo secundário: Floculação

Segundo a literatura (71) o processo de floculação não é muito pronunciado para partículas pequenas, mas torna-se mais característico e acentuado quando aumenta o tamanho das partículas e, particularmente, quando aumenta a concentração de eletrólito. Esta tendência é mostrada na Figura 3.4. Dentro da faixa de concentração de eletrólito 1:1 ali indicada ( $5 \times 10^{-2} - 0,4 \text{ mol dm}^{-3}$ ), uma vez a partícula de raio =  $1,62 \mu\text{m}$  penetre no mínimo secundário ela terá um longo tempo de residência e permanecerá separada da segunda partícula por distâncias da ordem de  $6 - 10 \text{ nm}$ . Contudo, ali permanece um substancial máximo de energia potencial, a ser superado antes das partículas entrarem no mínimo primário.

A floculação de partículas no mínimo secundário pode ser tratada de modo similar à coagulação no mínimo primário. No mínimo

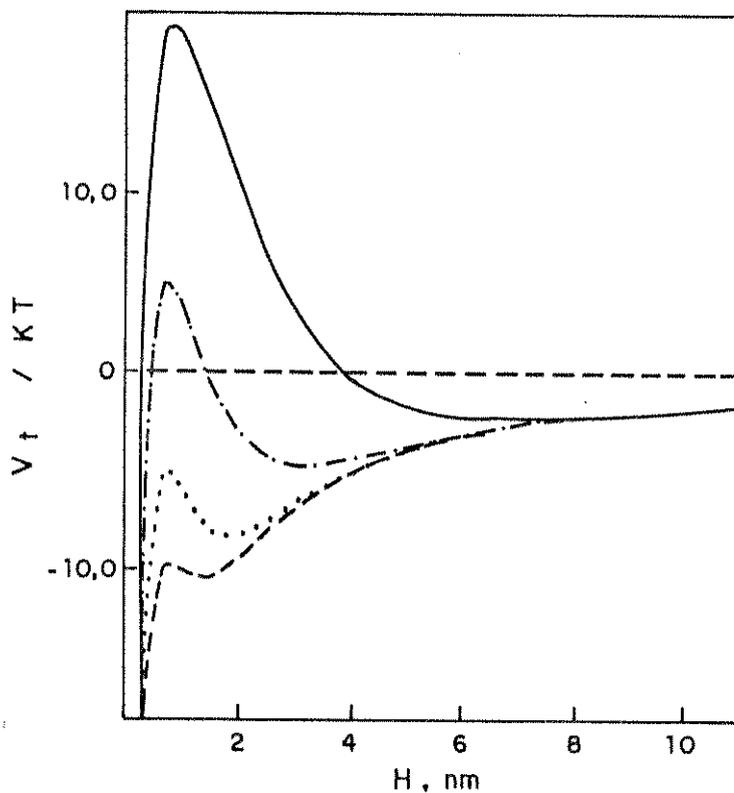


Figura 3.4.  $V_t/kT$  versus  $H$  para partículas esféricas de raio  $1,62 \mu\text{m}$  a várias concentrações de um eletrólito 1:1. —,  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ; ---,  $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ ; ...,  $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ ; ---,  $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$  Ref. (71).

secundário, a distância entre os centros de duas partículas é dada por

$$R = 2a + H_{s_{\min}} \quad [3.10]$$

onde  $H_{s_{\min}}$  é a distância entre as superfícies das partículas. Devido ao fato do mínimo secundário ser pouco profundo, relativamente  $kT$ , é claro que as partículas possuem energia suficiente para escapar do estado de floculação. Se  $E$  é a fração do total de par-

tículas no mínimo secundário, então a velocidade de agregação entre as partículas é dada por

$$-\left(\frac{dn_s}{dt}\right)_{t \rightarrow 0} = \frac{8\pi R D_o n_o^2 E}{W} \quad [3.11]$$

Admitindo-se uma distribuição de Boltzman de energias,  $(\exp(V_{s_{\min}}/kT))$  para aquelas partículas que possuem energia suficiente para escapar do mínimo secundário e, portanto

$$E = 1 - \exp(V_{s_{\min}}/kT) \quad [3.12]$$

a razão de estabilidade no mínimo secundário,  $W_{s_{\min}}$ , é dada por:

$$W_{s_{\min}} = \frac{R \int_R^{\infty} \frac{\exp(V/kT)}{r^2} dr}{[1 - \exp(V_{s_{\min}}/kT)]} \quad [3.13]$$

Desde que  $V$  é negativo para todos os valores de  $r$  maiores que  $R$ , o numerador é menor que a unidade, conseqüentemente, a estabilidade com relação à floculação surge quando o denominador é pequeno. Em muitos casos uma aproximação pode ser dada por

$$W_{s_{\min}} = \frac{1}{1 + \exp(V_{s_{\min}}/kT)} \quad [3.14]$$

A metodologia estabelecida no capítulo 2 é aqui utilizada nos seguintes estudos:

- (a) indução de agregação em partículas de PS;
- (b) fracionamento de partículas agregadas de PS;
- (c) caracterização dos agregados.

### 3.2. Parte Experimental e Resultados

#### 3.2.1. Materiais e Equipamentos

##### Materiais:

Ficoll, Pharmacia Fine Chemicals (Lot Nº MA 01428, Code Nº 17-0400-01).

Látex de poliestireno, Sigma, nos diâmetros: 0,109; 0,305 e 0,460  $\mu\text{m}$ .

Acetato de celulose, Carlo Erba (53% de ácido acético combinado).

Ácido acético glacial, Mallinckrodt e Quimis.

Acetona PA-ACS Carlo Erba.

##### Equipamentos:

Centrífuga refrigerada, de caçapas basculantes, RC-3B Sorvall Instruments.

Bomba peristáltica com controle de velocidade, Buchler Instruments serial No. 42561.

Densímetro PAAR-DMA 60/602.

Refratômetro Abbe Bausch & Lomb.

Viscosímetro de Ostwald.

Célula de fluxo Thomas: 8495-L10; 0,25 ml; 10 mm de caminho ótico.

Espectrofotômetro UV-visível Micronal B 382.

Registrador, Instrumentos Científicos CG Ltda.

Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-P15, operando entre 15 e 25 kV.

### 3.2.2. Tipos de Experimentos

Os experimentos de fracionamento e caracterização de misturas de látexes, contendo partículas agregadas e não agregadas, são de dois tipos: procedimento A - centrifugação zonal; procedimento B - osmocentrifugação zonal. Ambos os procedimentos são explicados no diagrama abaixo:

#### 1ª Etapa:

Preparar a membrana (M)  
↓  
Montar a célula (C).  
↓  
Encher um dos compartimentos da célula com meio homogêneo M e o outro com solvente, simultaneamente  
↓  
Obter o gradiente de densidade  
(meio M, temperatura T, velocidade  $\omega_1$ , tempo  $t_1$ )  
↓  
Retirar alíquotas de 1 ml do gradiente e do solvente simultaneamente (17 alíquotas)  
Medir a densidade ( $\rho$ ) e a viscosidade ( $\eta$ ) de cada alíquota

2ª Etapa:

Obter o gradiente de densidade, segundo as condições definidas na 1ª etapa

(membrana M, célula C, meio M, temperatura T, velocidade  $\omega_1$ , tempo  $t_1$ )

## Procedimento A

Retirar o solvente (T)

↓

Transferir o gradiente para tubo (T)

↓

Medir a altura da coluna do líquido (gradiente),  $h_0$ , no tubo

## Procedimento B

↓

Medir a altura da coluna do líquido (gradiente),  $h_0$ , na célula C.

↓ ↓

Pôr a amostra (zona) no topo do gradiente (T)

↓

Acompanhar a migração da zona

(T,  $\omega_2$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ , etc.)

↓

Fracionamento da amostra

Retirar alíquotas do sistema para análises posteriores (T) de  $\rho$ ,  $h$ ,  $D$ , etc.

Medidas de densidade ótica em fluxo

## 3.2.3. Estabilidade dos Gradientes de Densidade de Ficoll

Gradientes de densidade auto-gerados de Ficoll foram preparados por osmocentrifugação de soluções aquosas de Ficoll 8% (m/m). Os gradientes foram transferidos para tubos de vidro. Um gradiente típico assim obtido é apresentado na Figura 3.5.

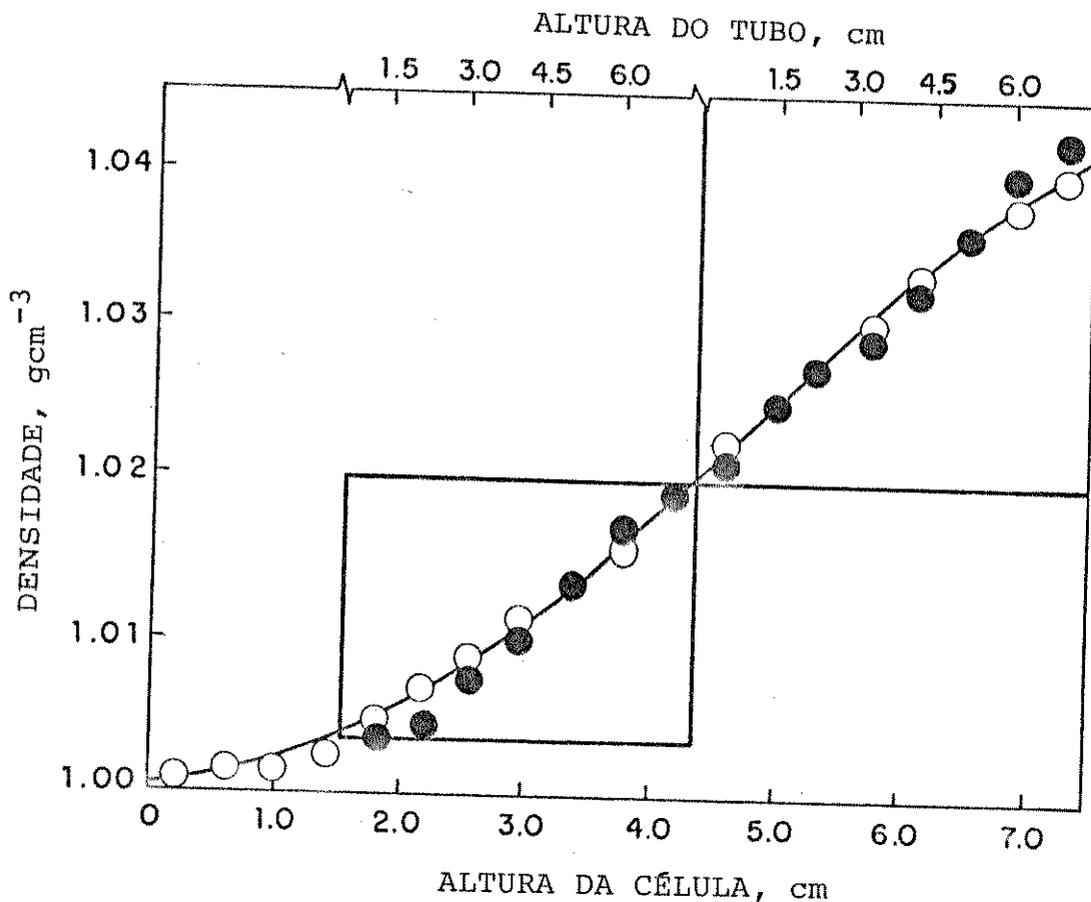


Figura 3.5. Gradientes de densidade de Ficoll gerado por osmocentrifugação. Solução de partida: solução aquosa de Ficoll 8% (m/m); condições de osmocentrifugação: 2 h 20 min, 3000 rpm. (○) densidade da fração no momento de transferir para o tubo de centrifugação; (●) densidade após 16 h 14 min de centrifugação no tubo.

Para avaliar a estabilidade do gradiente de densidade em experimentos conduzidos por centrifugação zonal, determinações de densidade foram feitas em alíquotas tomadas a várias alturas dos tubos, após longos tempos de centrifugação. Os resultados são apresentados na Figura 3.5 e mostram que os gradientes não sofrem maiores mudanças, sobre estas condições. Deve ser observado que

gradientes de densidade suficientemente estáveis, os quais são cruciais para os experimentos descritos neste capítulo, não seriam obtidos se outros materiais formadores de gradiente de densidade de baixo peso molecular fossem usados, devido a seus altos coeficientes de difusão e baixa viscosidade.

O gradiente apresentado na Figura 3.5 é uma média de três experimentos.

#### 3.2.4. Agregação e determinação do tamanho de partículas de látex.

Para eliminar a agregação das partículas de látex PS, partiu-se dos resultados obtidos no capítulo 2 que mostram a possibilidade de fracionamento em escala preparativa, por tamanho, de amostras de látex polidisperso. Foram utilizadas duas amostras de látex polidisperso obtidas por coagulação de látexes monodispersos. Uma das amostras foi o sobrenadante de um látex com diâmetro nominal de  $0,109 \mu\text{m}$ , o qual coagulou acidentalmente em seu frasco original (denominada amostra I). Esse tipo de acidente pode ocorrer por manuseio inadequado, mudança brusca de temperatura, acondicionamento incorreto, etc.

A outra amostra foi um látex de  $0,460 \mu\text{m}$ , coagulado pela adição de várias concentrações de eletrólito (chamada amostra II).

##### 3.2.4.1. Amostra I

Gradientes de Ficoll foram gerados por osmocentrifugação (145 min, 3000 rpm,  $20^\circ\text{C}$ ) e transferidos para dois tubos de vidro (A e B) com uma bomba peristáltica. O tubo A contém o gradiente de menor densidade ( $1,003\text{-}1,020 \text{ g cm}^{-3}$ ) e o tubo B o de maior densidade ( $1,020\text{-}1,040 \text{ g cm}^{-3}$ ).

Medidas de densidade antes e depois da transferência mostraram que os gradientes são praticamente inalterados.

Nos tubos A e B foi colocada sobre a coluna do gradiente uma mistura da amostra do látex polidisperso (amostra I) e uma amostra monodispersa. O tubo A foi então centrifugado por 20 h, 3000 rpm, 20°C e o tubo B por 130 horas, nas mesmas condições. Após esse tempo, muitas bandas foram visualmente observadas, como é mostrado nas Figuras 3.6 e 3.7. A posição das bandas de látex foi medida com uma régua, a determinados tempos de centrifugação.

No final do experimento, o conteúdo do tubo foi retirado, em alíquotas. Foram determinadas a densidade, a viscosidade e a turbidez de cada alíquota. Usando estes dados e as equações 1.25 e 1.26, os raios das partículas foram calculados a partir dos coeficientes de sedimentação.

Os resultados assim obtidos estão reunidos na Tabela 3.1. Eles mostram uma precisão de 4-7% na determinação do tamanho das partículas.

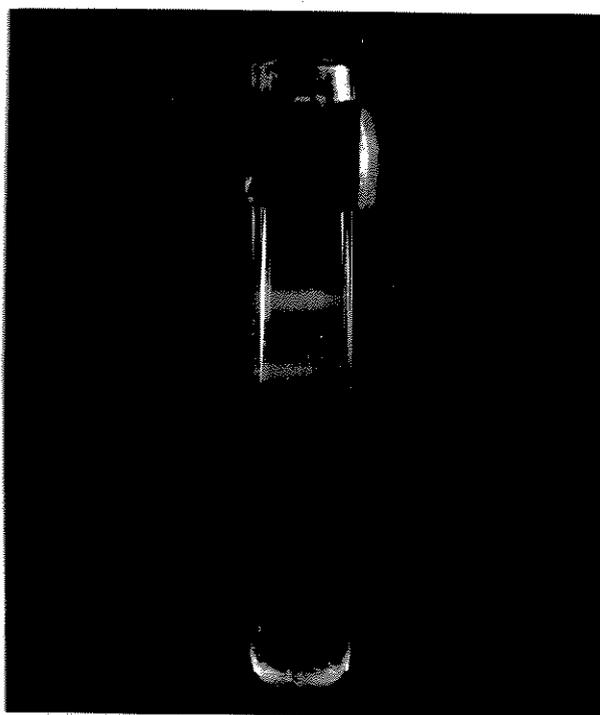


Figura 3.6. Bandas formadas por centrifugação do sobrenadante de um látex coagulado, em um gradiente de densidade.

(Tubo A: 3000 rpm, 20°C, 20 h).

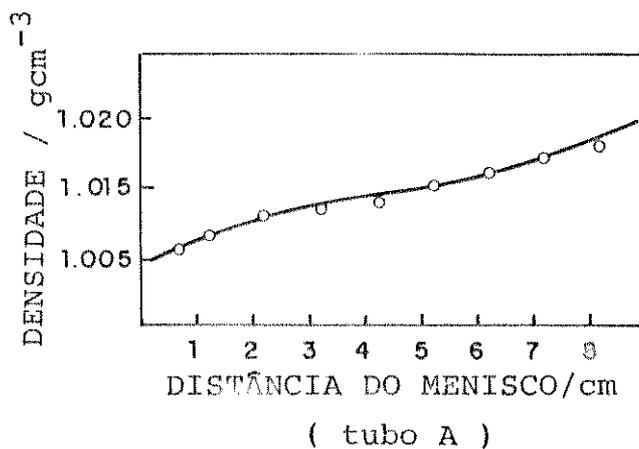
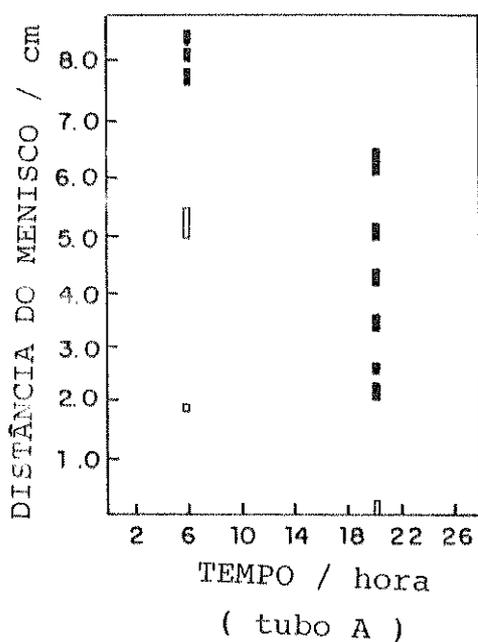
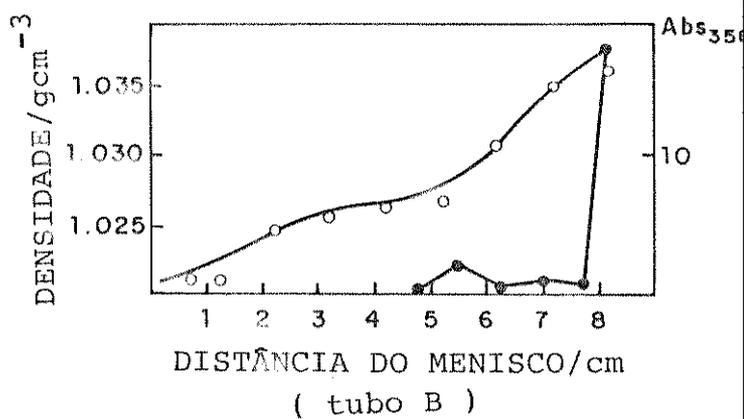
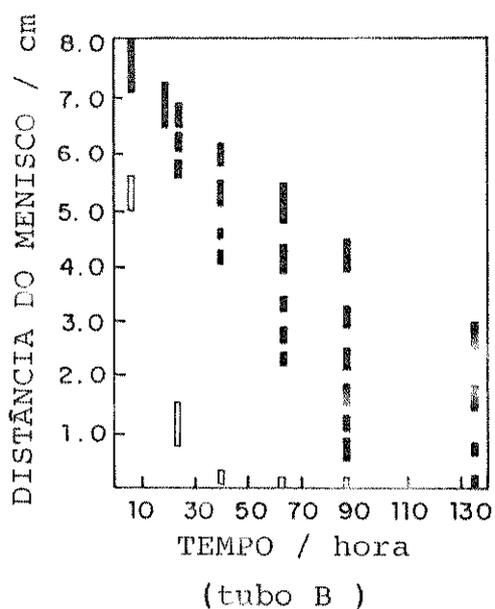


Figura 3.7 . Deslocamento da zona de PS em um tubo de centrífuga, como uma função do tempo. Condições de centrifugação: 3000 rpm, 20°C. Tubo A: diâmetro das partículas de PS (□) 0,305 e (▨) 0,109 μm (amostra polidispersa); tubo B: diâmetro das partículas de PS (□) 0,460 e (▨) 0,109 μm (amostra polidispersa).

TABELA 3.1. Cálculo dos diâmetros das partículas de látex a partir dos coeficientes de sedimentação. Dados referentes à Figura 3.6.

Diâmetro nominal ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro da esfera equivalente	Número da zona	Coefficiente de sedimentação ( s )	$\frac{\text{Massa de partícula na zona } i}{\text{Massa da partícula nominal}}$
0,305	0,284	1	2550	1
0,109	0,105	1	350	1
	0,138	2	600	2,2
	0,161	3	820	3,6
	0,172	4	940	4,4
	0,191	5	1160	6,0
	0,201	6	1280	7,0

### 3.2.4.2. Amostra II

#### 1ª Etapa: Indução de Agregação

Foram realizados experimentos de indução de agregação, em condições análogas às usadas nos trabalhos de Ottewill (18) sobre coagulação de látexes de PS; foram utilizadas as seguintes concentrações de NaCl:  $5 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-3}$ ,  $6 \times 10^{-2}$  e  $3 \times 10^{-1}$  M. Esse intervalo de concentração de eletrólito inclui a concentração crítica de coagulação (ccc) do látex, que é  $1 \times 10^{-1}$  M.

#### 2ª Etapa: Centrifugação em Gradiente de Densidade

Foram preparadas dispersões do látex de diâmetro de  $0,460 \mu\text{m}$ , contendo  $0,4\%$  (m/m) de PS e as seguintes concentrações de NaCl:  $5 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-3}$ ,  $6 \times 10^{-2}$  e  $3 \times 10^{-1} \text{ molL}^{-1}$ . Estas dispersões foram deixadas sedimentar por vários tempos, à temperatura ambiente. Uma alíquota de  $200 \mu\text{l}$  de cada dispersão foi posta no topo de um gradiente de densidade de Ficoll gerado por osmo-centrifugação (concentração inicial,  $8\%$  (m/m); 2 h, 3000 rpm,  $20^\circ\text{C}$ ) e centrifugada a 3000 rpm,  $20^\circ\text{C}$ .

Os resultados destes experimentos estão na Tabela 3.2. Algumas observações são feitas a partir desses dados:

(i) o número de bandas aumenta com a concentração de NaCl e o tempo de coagulação;

(ii) as massas relativas das partículas, em cada banda, mostram um considerável desvio de números inteiros; estes desvios são maiores que aqueles encontrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.2. Massa relativa dos componentes em zonas visíveis obtidos por centrifugação zonal de látex de PS 0,460  $\mu\text{m}$  misturado com NaCl.

[NaCl] $\text{mol.L}^{-1}$	Tempo de coagulação (min)	Número da zona	Coefficiente de sedimentação (s)	Massa da partícula na zona i  Massa da partícula nominal
-	-	1	5048	1,0
$5 \times 10^{-5}$	112 <sup>a</sup>	1	4072	0,7
$3 \times 10^{-3}$	114 <sup>a</sup>	1	4517	0,9
		2	6424	1,4
$6 \times 10^{-2}$	116 <sup>a</sup>	1	6190	1,4
		2	7336	1,8
		3	9621	2,6
$3 \times 10^{-1}$	50 <sup>b,c</sup>	1	4036	0,7
		2	6426	1,4
		3	8560	2,2
		4	9794	2,7
$5 \times 10^{-5}$	8640 <sup>c</sup>	1	5315	1,1
		2	6815	1,6
		3	7398	1,8
$3 \times 10^{-3}$	8640 <sup>c</sup>	1	4998	1,0
		2	6130	1,3
		3	6590	1,5
$6 \times 10^{-2}$	8640 <sup>c</sup>	1	4875	1,0
		2	7398	1,8
		3	8307	2,1
		4	8946	2,4
		5	9594	2,6

<sup>a</sup> Gradiente de densidade: 1,008-1,030  $\text{g cm}^{-3}$

<sup>b</sup> A esta concentração de NaCl, para tempo de coagulação maior que 50 min, uma zona única e larga foi obtida, extendendo-se até o fundo do tubo.

<sup>c</sup> Gradiente de densidade: 1,003-1,041  $\text{g cm}^{-3}$ .

Nós consideramos que os desvios de números inteiros acima mencionados podem ser associados ao seguinte fato: partículas de látex podem sofrer agregação reversível e irreversível. Agregação irreversível pode gerar agregados (ou "clusters") bem definidos, de vários tamanhos, cada um correspondendo a uma banda definida no tubo de centrifugação. Agregação reversível pode gerar padrões complexos de concentração, nos quais os picos de concentração não necessariamente correspondem a espécies definidas (87).

Isto pode ser avaliado, determinando-se a turbidez ao longo da altura do tubo de centrifugação, para uma amostra coagulada, como mostra a Figura 3.8. Esta mostra os vários picos de concentração observados e, também, mostra que uma significativa concentração de partículas de PS é encontrada entre os picos.

Alíquotas de várias frações de agregados foram colhidas e examinadas em um microscópio eletrônico de varredura.

A preparação das amostras para microscopia envolveu as seguintes etapas: 1) após colher as alíquotas, de 1 ml, de cada banda, estas foram diluídas em 10 ml de solução de bórax a 0,1% (m/m). (Esta medida tem como objetivo eliminar traços de Ficoll dos agregados); 2) em tubos de vidro de fundo chato foram colocados pedaços de mica; 3) cada uma das dispersões de agregados foi colocada em um tubo, sobre o pedaço de mica; 4) o tubo foi levado à centrífuga por 5 min a 900 rpm, 20°C, para que os agregados sedimentassem sobre a mica; 5) retirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma seringa; 6) com o auxílio de uma pinça retirou-se a mica com o material, deixou-se em um dessecador por 24 h e, por

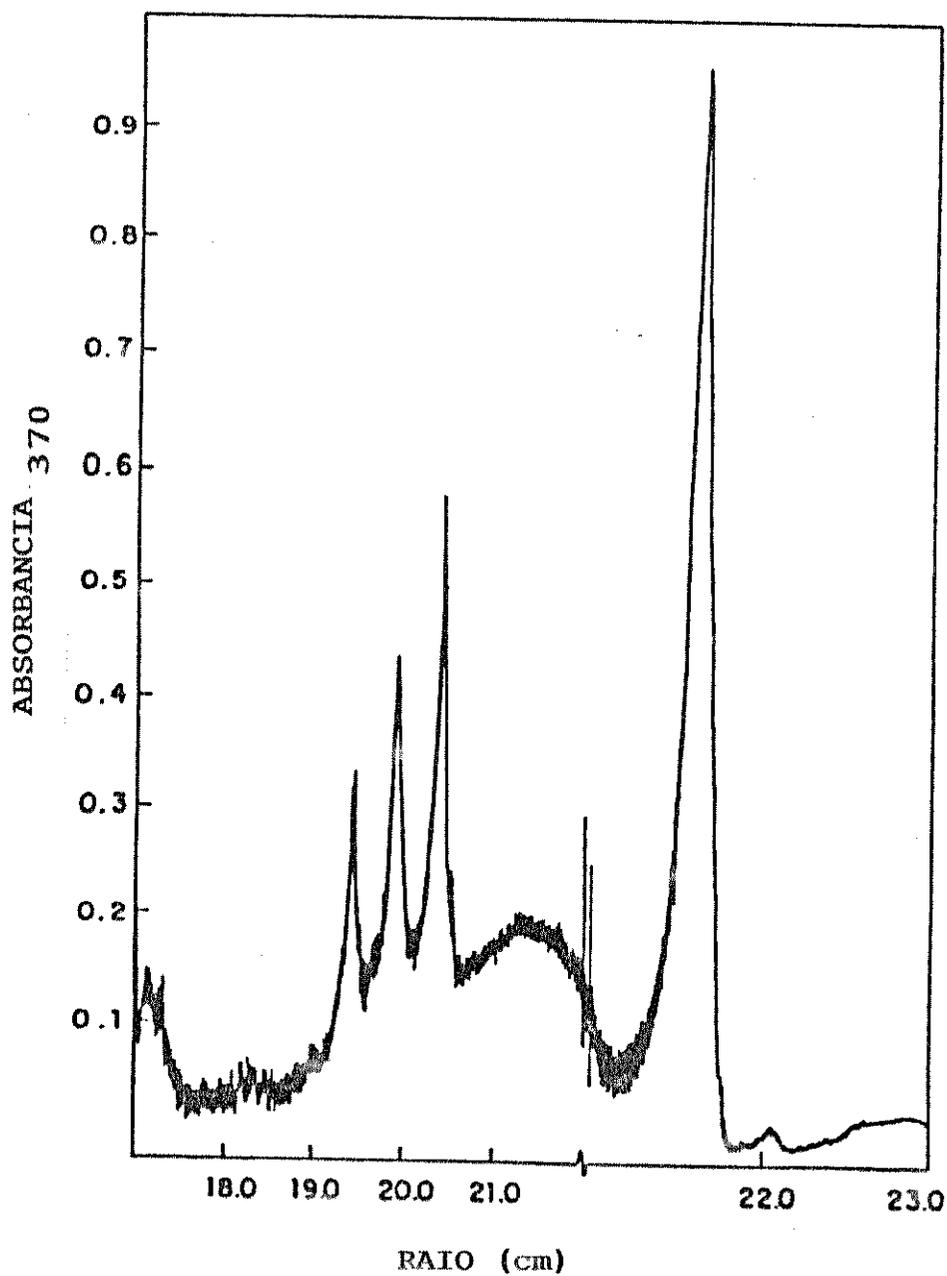


Figura 3.8. Fracionamento de agregados de látex de PS em um gradiente de densidade pré-formado de Ficoll. Condições de centrifugação 3000 rpm, 2 h (antes de por a zona) e mais 2 h 35 min, 20°C.

último, a mica contendo o material foi assentada sobre um suporte de latão, fixada com esmalte (base para unhas). Antes de examinadas no microscópio, as amostras receberam uma camada de ouro, evaporado sob vácuo.

Alguns agregados típicos são representados esquematicamente na Figura 3.9. O agregado não compacto (tipo colar) pode significar um estado transiente de agregação ou distribuição não uniforme de carga nas superfícies das partículas.

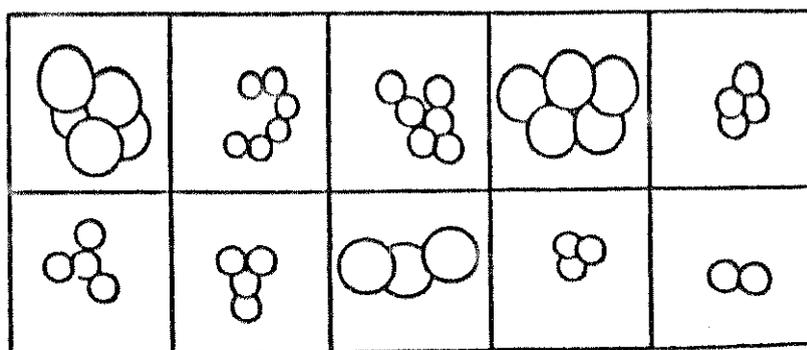


Figura 3.9. Ilustração esquemática de agregados de látex.

### 3.3. Discussão

A determinação do tamanho de partículas em centrífuga de baixa velocidade é relativamente fácil de ser realizada e fornece uma precisão de raios de partículas na faixa de 3-12%. Essa precisão na determinação do tamanho de partículas de látex é razoável face ao que é encontrado na literatura, usando-se outras técnicas mais laboriosas e/ou caras, tais como ultracentrifugação (13,20-21) espalhamento de luz (6,12-17), eletroforese (26), turbidimetria (8-11). A técnica é eficaz porque os gradientes são estáveis, durante o tempo requerido para a centrifugação. Isto não acontece quando são utilizados materiais de baixo peso molecular (como sacarose) que possuem altos coeficientes de difusão e baixa viscosidade (13). Um aspecto importante é que gradientes úteis de Ficoll podem ser auto-gerados sem o uso de ultracentrífugas e, assim, são

diminuídos os requisitos de equipamento para estes experimentos. Nós acreditamos que os procedimentos descritos neste trabalho abrem novas perspectivas para a caracterização de látexes poliméricos, um assunto que tem mostrado pouco progresso até o momento. A seguir comparamos as técnicas desenvolvidas com aquelas encontradas na literatura, para a caracterização desses materiais.

Tabela 3.3 Comparação da faixa do tamanho de partículas de PS por diferente métodos

Método	Intervalo de diâmetro das partículas poliméricas ( $\mu\text{m}$ )	Referência
Ultramicroscopia	0,01 - 2	15, 18-19
Microscopia eletrônica	0,0005 - 3	5-7
Espalhamento de luz	0,1 - 30	6, 12-17
Ultracentrifugação	0,0005 - 0,1	13, 20-22
Sedimentação por " Field Flow Fractionation"	0,01 - 1,0	25
Este trabalho	0,1 - 10	

Com relação à agregação das partículas de látex, a formação de ambos os tipos de agregado, reversível ou irreversível, tem sido demonstrada pelo uso de quatro técnicas: observação microscópica dinâmica (18-19), análise por " nanopar resistive " (82), espalhamento de luz acoplado a focalização hidrodinâmica (15-17) e medidas de turbidez (11). Quando comparadas a este trabalho, as técnicas descritas nesta tese têm as seguintes características:

(i) elas podem ser usadas em uma larga faixa de tamanhos de partículas, o que não pode ser feito em microscopia ótica (18-19); (ii) os agregados são submetidos a baixas velocidades de cisalhamento, quando migram lentamente, durante o experimento de centrifugação; (iii) os agregados formados a baixas concentrações de sal são facilmente detectados por centrifugação zonal; estes agregados não são relatados pelos autores que usam espalhamento de luz (15-17).

Neste trabalho, nós encontramos que o sobrenadante de um látex acidentalmente coagulado, contém uma série de partículas discretas, cujas massas são múltiplos inteiros das partículas primárias; isto é consistente com a existência de agregados bem definidos e de vida longa. Por outro lado, o látex coagulado por adição de sal mostrou um padrão complexo de bandas; o densitograma da Figura 3.8 mostra que uma grande quantidade de látex é encontrado entre as bandas. Este comportamento é similar ao que é encontrado normalmente em sedimentação, transporte difusivo e eletroforético de sistemas em que há interação entre as espécies que migram (87). Nós acreditamos que a avaliação e interpretação de curvas análogas àquela que é apresentada na Figura 3.8 pode possibilitar a determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos para agregação de partículas de látex. Essa possibilidade é levantada por Ottewill em um seu trabalho recente (11), usando medidas de turbidez para detectar a presença de agregados. Outra possível explicação é que partículas entre as bandas correspondam a agregados de outras formas e distâncias entre partículas que aquelas dominantes em cada banda (87).

Os estudos sobre agregação e determinação do tamanho de partículas de PS estão sendo publicados (88).

#### 4. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE SEDIMENTAÇÃO E PESO MOLECULAR DA ERITROCRUORINA

##### 4.1. Introdução: Eritrocruorina

Eritrocruorinas são hemoglobinas extracelulares encontradas em muitos invertebrados (platelmintos, nematóides, moluscos, crustáceos, insetos, anelídeos e pogomorfos). O tipo de eritrocruorina que é objeto desse trabalho é bastante encontrado entre as três classes de anelídeos: poliquetas, oligoquetas e hirundíneos (89).

A espécie da qual foi obtida a eritrocruorina usada neste trabalho é a Glossoscolex paulistus (Oligochaeta, Glossoscollecidae), conhecido por minhocossú, um anelídeo que vive no solo em regiões calcáreas do Estado de São Paulo, e tem uma heme proteína gigante extracelular que ocorre dissolvida no sangue (90). Esse tipo de pigmento respiratório, denominado eritrocruorina, foi observado em microscopia eletrônica como sendo formado por dois discos hexagonais, sobrepostos, cada um contendo seis subunidades, com uma cavidade central (91).

Em contraste com hemoglobinas de vertebrados, cujo ponto isoelétrico situa-se entre pH 6,5 e 7,5, em eritrocruorinas são observados valores entre 4,5 e 5,5. Isso se deve a alta proporção de ácidos aspártico e glutâmico.

A determinação do coeficiente de sedimentação da eritrocruorina foi conduzida em experimentos de centrifugação em gradientes de densidade auto-gerados por osmocentrifugação, usando-se a equação 1.25.

A partir do coeficiente de sedimentação é possível estimar o peso molecular utilizando a seguinte relação (35):

$$\frac{s_1}{s_2} = \left[ \frac{PM_1}{PM_2} \right]^{2/3}$$

para o caso de duas proteínas globulares com o mesmo volume específico.

O trabalho desenvolvido neste capítulo foi realizado em colaboração com o Departamento de Bioquímica da UNICAMP (102,103).

## 4.2. Parte Experimental e Resultados

### 4.2.1. Materiais e Equipamentos

#### Materiais:

Ficoll, Pharmacia Fine Chemicals (Lot No. MA 01428 Code No. 17-0400-01).

Tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 contendo EDTA  $10^{-3}$  M.

Eritrocruorina (hemeproteína extracelular), amostra fornecida por Carlos Bonafé do Departamento de Bioquímica - UNICAMP.

Membranas assimétricas de acetato de celulose, preparadas a partir de uma solução contendo 11,7% (m/m) de acetato de celulose da Rhodia, 43,3% (m/m) de acetona, 19,3% (m/m) de ácido acético e 25,7% (m/m) de H<sub>2</sub>O, segundo o método detalhado no item 2.2, cap. 2.

Células de diálise de paredes paralelas (já utilizada nos experimentos dos capítulos 2 e 3).

### Equipamentos:

Centrífuga refrigerada, de caçapas basculantes, RC-3B Sorvall Instruments.

Bomba peristáltica, Milan Equipamentos Científicos Ltda.

Densímetro PAAR-DMA 60/602.

#### 4.2.2. Obtenção de gradientes de densidade auto-gerados por osmocentrifugação

Os gradientes de densidade foram obtidos centrifugando-se Ficoll 8% (m/m) em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4 contendo EDTA  $10^{-3}$  M; estes gradientes cobrem a faixa de 1,0010 a 1,0055  $\text{g cm}^{-3}$  (1,6 - 22,6 Poise). São gerados em células de diálise construídas com placas de acrílico nas dimensões de (7,5 x 3,5 x 0,7) cm; as membranas de acetato de celulose foram preparadas segundo o método descrito no cap. 2, item 2.2 partindo-se de uma solução contendo 10 g de acetato de celulose, 19 ml de acetona, 63 ml de ácido acético e 88 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . As centrifugações foram realizadas em uma centrífuga refrigerada RC-3B Sorvall, com um rotor "swinging-bucket", a 4000 rpm, por 2 h 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Os gradientes assim formados (Figura 4.1) são transferidos para tubos de centrífuga transparentes com o auxílio de uma bomba peristáltica (Milan Equipamentos Científicos Ltda.), a baixa velocidade para evitar modificação no gradiente, em ordem decrescente de densidade. Três faixas de gradientes de densidade foram obtidos: A (1,0013 - 1,0090  $\text{g cm}^{-3}$ ); B (1,0100 - 1,0300  $\text{g cm}^{-3}$ ) e C (1,0325 - 1,0550  $\text{g cm}^{-3}$ ). A faixa de viscosidade para a seção A é 1,6-2,6 Poise, para B, 2,8-9,4 P e para C, 11,2-22,6 P.

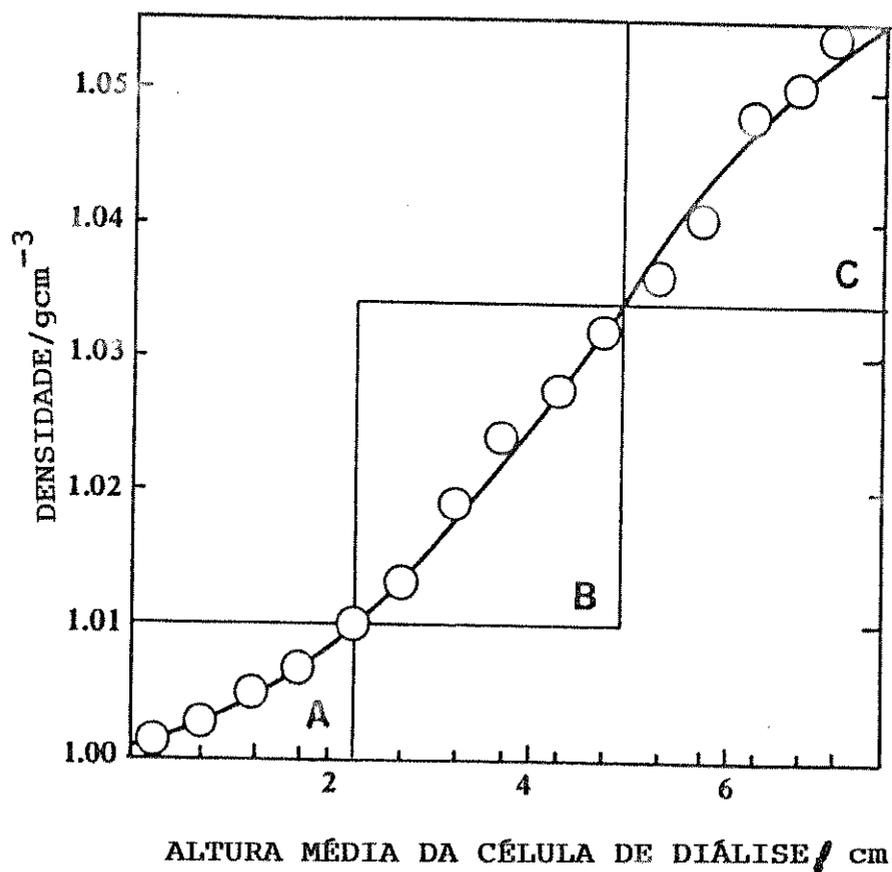


Figura 4.1. Gradiente de densidade auto-gerado dividido em três intervalos A, B, C. Solução de partida: Ficoll 8% (m/m), pH 7,4 e tampão Tris-HCl 0,05 M contendo EDTA  $10^{-3}$  M. Condições de osmocentrifugação: 4°C, 4000 rpm, 2 h 15 min.

#### 4.2.3. Experimentos de centrifugação zonal

Soluções de eritrocruorina (50  $\mu$ l: concentrações 2,5; 5,0; 6,25 e 12,5  $\text{mg cm}^{-3}$ ) foram aplicadas ao topo dos gradientes de densidade e centrifugadas a 4000 rpm, 4°C. O deslocamento da zona de eritrocruorina foi acompanhado visualmente e medido com uma régua. Após o término do experimento, o conteúdo do tubo de vidro foi retirado com o auxílio de uma longa agulha adaptada a uma seringa, e dividido em alíquotas de 1 ml para medidas de densidade (executadas em um densímetro PAAR-DMA 60/602). As viscosidades destas alíquotas foram obtidas usando dados da literatura (92-93). A densidade de flutuação da proteína foi assumida como sendo 1,3717  $\text{g cm}^{-3}$  (94).

Para averiguar o tipo de gradiente mais adequado para estudos de velocidade de sedimentação da eritrocruorina, entre aqueles apresentados na Figura 4.1, foi examinado o comportamento da espessura da zona durante o experimento. Esse é um dos critérios de avaliação usados na literatura (95-101), pois interfere diretamente na precisão dos resultados. A banda inicial tinha a espessura de 2 mm. O gradiente A pode ser considerado como um gradiente tipo alargador de zona, embora apresente a vantagem de baixa viscosidade, o que permite o mais rápido deslocamento da zona. O gradiente B, aproximadamente linear, facilita a realização dos cálculos, além de apresentar um pequeno alargamento da zona. O gradiente C, possuindo altas viscosidades, dificulta o deslocamento da zona e apresenta-se como alargador de zona a longos tempos de centrifugação, não sendo recomendável para estudos de velocidade de sedimentação. As seções A e B são, portanto, as mais

convenientes para serem usados nos experimentos de centrifugação zonal.

Os coeficientes de sedimentação foram calculados seguindo o procedimento descrito na literatura (61), usando um programa BASIC para um computador ITAUTEC, para resolver a equação 1.25.

Os resultados apresentados na Tabela 4.2 foram usados para determinar o coeficiente de sedimentação padrão de eritrocruorina,  $s_{20,w} = 58$  S (Figura 4.2).

A partir do coeficiente de sedimentação é possível estimar o peso molecular utilizando a relação  $PM_1/PM_2 = (s_1/s_2)^{3/2}$ . Utilizando-se dados de coeficientes de sedimentação e peso molecular de diversas eritrocruorinas já estudadas e assumindo que a variação do volume parcial específico seja desprezível, podemos construir um gráfico colocando o peso molecular em função  $s_{20,w}$ .

Na Figura 4.3 colocamos os diversos valores encontrados na literatura (91), bem como a regressão linear, e obtivemos uma alta correlação ( $p < 0,01$ ). O peso molecular correspondente a 58 S é  $3,23 \times 10^6$  Da.

Tabela 4.1 Alargamento da zona de eritrocruorina sob condições de centrifugação: 4000 rpm, 4° C.

Concentração da amostra ( $\text{mgcm}^{-3}$ )	Volume da amostra ( $\mu\ell$ )	Tempo de centrifugação (h)	Largura da banda (cm)	Gradiente de densidade	
2,50	50	17	0,5	A	
		46	0,5		
		17	0,2	B/C	
		46	0,5		
		17	0,2	C	
		46	0,5		
3,40	50	18	0,4	A/B	
		48	0,5		
5,00	50	48	0,4	A/B	
		100	12	0,5	B
			21	0,5	
	12		0,5	A	
	50	48	21	0,8	
			48	0,2	B/C
6,25	50	17	0,7	A	
		17	0,2	C	
		46	0,5		
12,50	50	48	0,7	A/B	
		100	12	0,4	B
	21		0,7		
	12		0,5	C	
	21	0,8			

Tabela 4.2 Sedimentação da eritrocruirina em centrifugação zonal a 4000 rpm, 4°C

Número da amostra	Raio médio da amostra (cm)		Tempo de centrifugação (h)	Volume da amostra ( $\mu\ell$ )	Concentração da amostra ( $\text{mgcm}^{-3}$ )	Coeficiente sedimentação (S)	Gradiente de densidade ( $\text{gcm}^{-3}$ )
	Início	Término					
1	14,87	15,62	17	50	2,50	83	1,0020-1,0123
	14,87	16,72	46				
	14,97	15,37	17				
	14,97	16,02	46				
2	14,67	15,47	18	50	3,40	99	1,0030-1,0230
	14,67	16,72	48				
2	16,37	18,37	48	50	5,00	103	1,0050-1,0190
1	15,87	16,32	12	100		105	1,0095-1,0315
	15,87	16,62	21				
	16,27	17,12	12				
	16,27	17,67	21				
2	15,87	19,22	48	50	12,50	190	1,0050-1,0160
	15,07	15,87	12	100		221	1,0120-1,0325
	15,07	16,22	21			192	

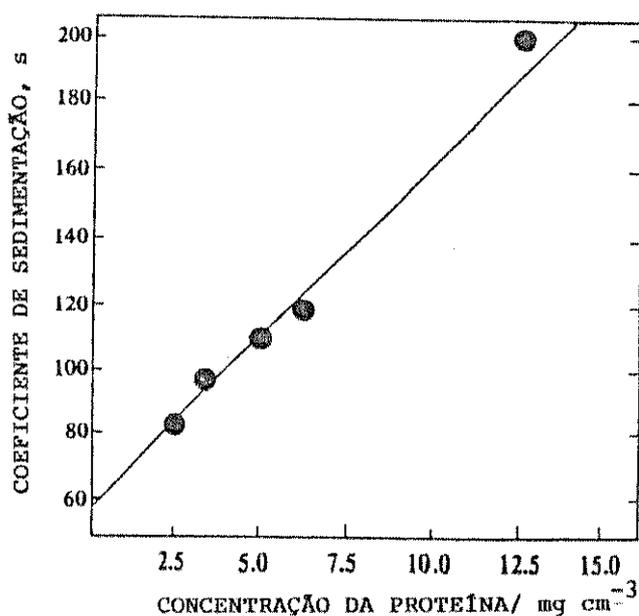


Figura 4.2. Coeficiente de sedimentação de eritrocruorina (Glossoscolex paulistus) em função da concentração.

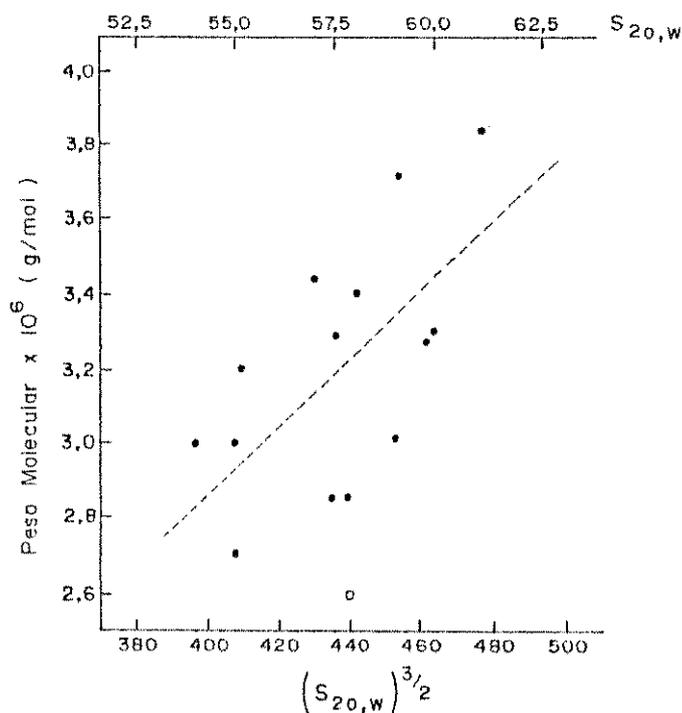


Figura 4.3. Peso molecular de eritrocruorinas de diversas espécies em função de  $(S_{20,w})$ . Obteve-se por regressão linear  $PM = 8908 \times (S_{20,w})^{3/2} - 701640$  ( $p < 0,01$ ). O peso molecular para a espécie Glossoscolex paulistus ( $S_{20,w} = 58$ ) corresponde nessa relação a  $3,23 \times 10^6$  Da. O círculo aberto se refere a uma das espécies, e não foi considerado devido ao alto desvio em relação à curva.

### 4.3. Discussão

O coeficiente de sedimentação da eritrocruorina de Glossoscolex paulistus, à diluição infinita, encontra-se dentro do intervalo obtido para as diversas eritrocruorinas (91). A partir do coeficiente de sedimentação foi estimado o peso molecular utilizando a relação proposta por Martin & Ames (35). Os valores do coeficiente de sedimentação e peso molecular foram recentemente publicados (103).

Estudos de microscopia eletrônica de transmissão revelaram para a eritrocruorina estudada, dimensões entre 27 e 29 de distância vértice a vértice e 16 a 18 nm de altura (102), o que representa uma relação axial a 0,6 a 0,7 (59). Esses resultados mostram que as partículas de eritrocruorina podem ser consideradas de formato esférico (isto é, relação axial próxima da unidade) e, em estudos posteriores, podem ser usadas para estimar o diâmetro da eritrocruorina nas diversas concentrações usando a equação 1.26 e comparados com dados da literatura (104-107).

O aumento do coeficiente de sedimentação em soluções mais concentradas demonstra a ocorrência de associação entre as moléculas de eritrocruorina. Estas já são, por si, agregados de subunidades menores. Uma confirmação visual desse fato é encontrada na foto da Figura 4.4, onde se tem uma banda assimétrica justificada pela existência de material associado, caminhando provavelmente na frente.

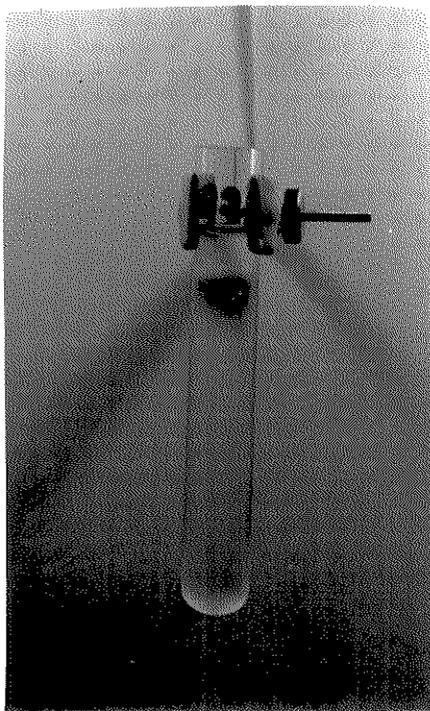


Figura 4.4 Experimento de sedimentação da eritrocruorina (observar a presença de uma banda assimétrica correspondente à eritrocruorina)

## 5. FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS DISSIPATIVAS EM CELAS DE DIÁLISE

### 5.1. Introdução

Na natureza são encontrados dois tipos de ordem: ordem estática e ordem dinâmica (108).

No primeiro caso, a ordem é atingida através de transformações reversíveis. Por exemplo, na cristalização de um líquido, quando a temperatura é suficientemente diminuída a ordem estática (ou seja, cristais obtidos a partir do líquido) surge como resultado de uma transição de fase, que ocorre sob condições de equilíbrio dinâmico. Observe-se que ordem estática ocorre através de equilíbrio dinâmico.

A ordem dinâmica ocupa uma posição completamente diferente. Ela é obtida não porque a entropia é diminuída devido a um decréscimo de temperatura do sistema; ela ocorre porque há um fluxo de entropia do sistema para o meio ambiente. Ordenamento dinâmico se manifesta através de estruturas espaciais e/ou temporais, denominadas de estruturas dissipativas.

A literatura descreve numerosos exemplos de instabilidade com criação de ordem em vários campos do conhecimento: na físico-química (109), na bioquímica (110), na ecologia (111) e na dinâmica dos fluidos (112-113). Alguns destes exemplos estão associados ou não com reações químicas; tais são as células de Bénard (114-116), os anéis de Liesegang (117) e as oscilações em sistemas eletroquímicos (118-119).

Para compreender a formação de estruturas dissipativas é necessário identificar os dois estágios do fenômeno: (a) como e

quando começa; (b) como e quando atinge o estágio estacionário. Em outras palavras, é preciso estabelecer as relações entre flutuação, organização e estabilidade. Para tanto, neste capítulo, serão discutidos os tópicos: fundamentos da teoria da estabilidade termodinâmica, produção de entropia e uma aplicação a fenômenos macroscópicos.

Neste trabalho, é descrito um novo fenômeno de formação de estrutura dissipativa em células de diálise, observado em experimentos de osmocentrifugação zonal com amostras de alta concentração de proteína. Nestes experimentos, foi observada a formação de múltiplas bandas (estriamento) por toda a célula gerando um padrão periódico de concentração. Os experimentos para a formação desta estrutura dissipativa constam basicamente de duas etapas: (1) obtenção de gradientes de densidade auto-gerados em celas de diálise; (2a) centrifugação zonal de amostras de alta concentração de proteína; (2b) osmocentrifugação zonal de amostras de alta concentração de proteína.

#### 5.1.1. Características termodinâmicas dos sistemas encontrados na natureza

As características termodinâmicas dos três tipos de sistemas encontrados na natureza são detalhados a seguir:

1. Sistemas isolados, que não trocam matéria ou energia com o meio ambiente. O comportamento desses sistemas é completamente caracterizado pela segunda lei da termodinâmica em sua forma canônica: a entropia de um sistema cresce monotonamente com o tempo até alcançar o seu valor máximo no estado de equilíbrio termo-

dinâmico:

$$\frac{dS}{dt} \geq 0 \quad [5.1]$$

Em tal sistema, nenhuma auto-organização é possível.

2. Sistemas fechados, que trocam energia mas não matéria com suas vizinhanças. Nesses sistemas, o equilíbrio termodinâmico é caracterizado por um valor mínimo de energia livre de Helmholtz, usualmente definida por:

$$F = E - TS \quad [5.2]$$

onde E é a energia do sistema, T é a temperatura e S é a entropia. Esta equação indica que o equilíbrio é o resultado do compromisso entre tendências opostas: a de maximização de entropia e a de minimização de energia. A temperatura é que determina o peso relativo dos dois fatores. À baixa temperatura prevalece a energia e tem-se a formação de "ordem" (baixa entropia) e estruturas de "baixa energia", como os cristais. Por outro lado, à alta temperatura, a entropia é dominante e portanto há desordem molecular. Dessa forma, a termodinâmica clássica conduz ao conceito de estruturas de equilíbrio caracterizadas por baixa energia livre.

3. Sistemas abertos, que trocam matéria e energia com o meio ambiente. No caso desses sistemas é possível distinguir dois tipos de comportamento: (a) o comportamento de um sistema próximo

ao equilíbrio, descrito pela termodinâmica de não-equilíbrio linear, onde são tratados tipos de estruturas estacionárias que resultam de restrições cinéticas ao atingimento do equilíbrio; (b) o comportamento de um sistema longe do equilíbrio, onde se manifestam tipos de auto-organização no tempo e/ou no espaço, as quais foram chamadas de estruturas dissipativas (120).

Para obter uma teoria termodinâmica para esse tipo de estrutura, Prigogine teve que mostrar que o não-equilíbrio pode ser uma fonte de ordem (121-123). Aqui, uma nova estrutura é sempre o resultado de uma instabilidade, a qual se origina de uma flutuação. Isto é o oposto do que se passa em sistemas próximos do equilíbrio, nos quais uma flutuação é sempre seguida de uma resposta que traz o sistema de volta ao estado não perturbado (ou seja, a resposta segue o Princípio de Le Châtelier).

#### 5.1.2. Fundamentos da teoria da estabilidade termodinâmica e a produção de entropia

O método de Lyapunov, datado de 1893, permite decidir sobre a estabilidade de um sistema usando diretamente as equações diferenciais, que o descrevem, sem o conhecimento de suas soluções. A seguir serão apresentadas algumas definições básicas e os teoremas de Lyapunov (a interpretação geométrica e a prova desses teoremas podem ser encontradas na literatura (116)).

Seja  $L(x)$  uma função escalar de  $x$ , e seja  $\Omega$  o domínio aberto dessa função em torno da origem ( $x=0$ ). A função  $L(x)$  é "definida positiva" em  $\Omega$ , se para todo  $x$ :

- (i) a função é contínua juntamente com sua primeira de-

rivada parcial,

(ii) a função não existe na origem,

(iii) além da origem (e sempre em  $\Omega$ ) ela é positiva. A origem é um mínimo isolado.

Se na condição (iii) a palavra positiva é substituída por negativa, tem-se uma função "definida negativa". Se, de outra maneira, a condição (iii) é dispensada, para permitir que a função seja positiva ou seja nula, esta função é dita "semi-definida positiva".

### Teorema 1. Estabilidade

A solução nula ou a solução estacionária na origem do sistema (representado pela equação abaixo):

$$\frac{dx}{dt} = F(x) \quad [5.3]$$

é estável, se existir em algum ponto vizinho da origem, uma função "definida positiva"  $L(x)$ , tal que  $dL(x)/dt$  relativo às soluções da equação [5.3] seja "semi-definida negativa":

$$\frac{dL}{dt} \leq 0 \quad [5.4]$$

### Teorema 2. Estabilidade Assintótica

A solução nula do sistema, representada pela equação [5.3], é assintoticamente estável se em alguma vizinhança da origem existir uma função "definida positiva"  $L(x)$ , tal que seu gradiente  $dL(x)/dt$  com respeito às soluções da equação [5.3] seja "semi-definida negativa" naquela região

$$\frac{dL}{dt} < 0 \quad [5.5]$$

Uma função  $L(x)$  que satisfaça qualquer um desses teoremas é chamada uma função de Lyapunov. A existência de pelo menos uma função desse tipo, assegura ao sistema o amortecimento das flutuações, seja no equilíbrio ou nas suas vizinhanças. Os estados que correspondem ao equilíbrio termodinâmico ou os estados estacionários que correspondem a um mínimo de produção de  $S$  na termodinâmica linear do não-equilíbrio, são automaticamente estáveis e caracterizados por uma função de Lyapunov.

### Produção de entropia

Em sistemas abertos, a variação de  $S$  possui dois termos (124):

$$dS = d_e S + d_i S \quad [5.6]$$

onde  $d_e S$  é a transferência de  $S$  através das fronteiras do sistema e  $d_i S$  é a produção de  $S$  dentro do sistema.

A segunda lei admite que a produção de  $S$  dentro do sistema é positiva (ou nula)

$$d_i S \geq 0 \quad [5.7]$$

Ela é nula quando o sistema sofre transformações reversíveis (em equilíbrio), mas é positiva quando o sistema estiver sujeito a transformações irreversíveis. Assim, somente processos irreversíveis produzem  $S$ . Quando, no interior de um determinado sistema, estiverem ocorrendo processos irreversíveis tais como perda de calor, atrito e assim por diante, estes produzem um aumento de  $S$ ; há

"produção de S" no sistema. Este aumento de S,  $d_i S$ , não pode mudar seu sinal através de uma inversão no sentido das trocas de calor com o meio ambiente. Em todos os processos irreversíveis a produção de S sempre ocorre na mesma direção, isto é,  $d_i S$  somente pode ser positiva ou zero (na ausência de processos irreversíveis). É importante notar que o sinal positivo de  $d_i S$  é escolhido meramente por convenção; ele poderia ser escolhido negativo. O ponto principal é que a variação é monótona, esta "produção de S" não pode mudar de direção com o tempo. Daí a designação da entropia como "a flecha do tempo" (121).

Em todos os casos o sistema evolui para o estado de equilíbrio caracterizado pela existência de um potencial termodinâmico. O estado de equilíbrio, segundo Max Planck, é o "alvo" para estados de não-equilíbrio.

Para sistemas isolados a entropia é uma função de Lyapunov (ver equação 5.1). Potenciais termodinâmicos tais como energia livre de Gibbs ou Helmholtz, também são funções de Lyapunov para outras "condições de fronteira" (tais como, valores impostos de volume e temperatura). Contudo, a desigualdade da equação 5.7, a qual não envolve a diferencial total de uma função, em geral não permite defini-la como uma função de Lyapunov. Esta é uma das razões porque até recentemente, as aplicações da termodinâmica ficaram essencialmente limitadas a processos de equilíbrio (121).

Para estender a termodinâmica a processos de não-equilíbrio, é necessário explicitar uma expressão para a produção de entropia. É suposto, em princípio, que em equilíbrio ou fora dele, a entropia depende sempre das mesmas variáveis, com as quais mantém

as mesmas relações funcionais. Esta é a suposição de equilíbrio local.

Segundo a condição de equilíbrio local, em qualquer processo irreversível ocorrendo dentro de um sistema, é possível isolar um pequeno volume no qual a produção local de entropia depende de variáveis macroscópicas locais:

$$s = s(u, v, x_y) \quad [5.8]$$

onde  $u$  é a densidade de energia interna,  $v$  o volume específico e  $x_y$  a fração de massa do componente  $y$ . Esta suposição implica que o volume considerado é termalizado, ou seja, os efeitos de colisão são suficientes para excluir a influência de flutuações estatísticas do equilíbrio. Reações químicas são aqui incluídas sob a condição de que ocorram com velocidade suficientemente baixa para que o sistema se mantenha termalizado.

Admitida a condição de equilíbrio local, a produção de entropia por unidade de tempo pode ser explicitada pela expressão bilinear:

$$P[S] = \frac{d_i S}{dt} \quad [5.9]$$

$$= \int \sigma(S) dV = \int \sum_k (J_k X_k) dV \geq 0 \quad [5.10]$$

onde

$$\tau(S) = \sum_k J_k X_k$$

é a produção local de entropia,  $J_k$  são os fluxos generalizados de processos irreversíveis (reações químicas, fluxo de calor, difusão, etc.) e  $X_k$  são as forças generalizadas correspondentes (afinidades, gradientes de temperatura, gradientes de potencial químico, etc.).

A equação 5.9 é a fórmula básica da termodinâmica macroscópica de fenômenos irreversíveis (121).

Na produção local de entropia em sistemas contínuos, três situações principais podem ocorrer:

(a) o equilíbrio, onde ambos os fluxos e as forças desaparecem:

$$J_k^{eq} = 0 \quad [5.11a]$$

$$X_k^{eq} = 0 \quad [5.11b]$$

(b) a "região linear", próxima do equilíbrio, onde os fluxos são funções lineares das forças.

$$J_k = \sum_l L_{lk} X_l \quad [5.12]$$

Nesta região dois teoremas gerais podem ser estabelecidos: as leis de reciprocidade, de Onsager

$$L_{lk} = L_{kl} \quad [5.13]$$

e o teorema de produção mínima de entropia (124-125):

$$P[S] = \min \quad [5.14]$$

Em termos qualitativos as leis de Onsager [5.13] dizem que se a força "um" (por exemplo o gradiente de temperatura), pode influenciar o fluxo "dois" (por exemplo a difusão do componente  $i$ ) então a força "dois" (o gradiente de concentração do componente  $i$ ) pode também influenciar o fluxo "um" (o fluxo de calor).

O teorema de produção mínima de entropia [5.14] diz que para estados estacionários suficientemente próximos do equilíbrio a produção de entropia alcança seu mínimo. Este teorema é válido somente para a região estritamente linear na qual os desvios do equilíbrio são tão pequenos que os coeficientes fenomenológicos  $L_{lk}$  podem ser tratados como constantes.

Esse teorema expressa um tipo de propriedade "inercial" de sistemas de não-equilíbrio. Quando determinadas condições de contorno impedem o sistema de alcançar o equilíbrio termodinâmico (produção zero de entropia), o sistema passa a um estado de "dissipação mínima".

Durante muito tempo grandes esforços foram feitos no sentido de generalizar esse teorema para situações longe do equilíbrio. Em 1967, Prigogine mostrou que longe do equilíbrio o comportamento termodinâmico de um sistema pode ser bem diferente, até mesmo oposto, do que é proposto pela equação [5.14].

De acordo com o teorema de produção mínima de entropia, a produção de  $S$  é uma função de Lyapunov na região estritamente linear nas proximidades do equilíbrio. Se o sistema é perturbado, a produção de  $S$  aumenta, mas o sistema reage para retornar ao valor mínimo da produção de  $S$ .

(c) a "região não linear", longe do equilíbrio.

Quando um sistema, próximo do equilíbrio, é perturbado

obtém-se a expressão:

$$S = S_0 + \delta S + \frac{1}{2}\delta^2 S \quad [5.15]$$

onde  $S_0$  é a entropia no equilíbrio. Devido ao fato de a entropia no equilíbrio ser um máximo, o termo de primeira ordem é nulo e, portanto, a estabilidade é dada pelo sinal do termo de segunda ordem  $\delta^2 S$ .

Glansdorff e Prigogine (120) mostraram que a função  $\delta^2 S$  é uma função de Lyapunov nas vizinhanças do equilíbrio, independente das condições de contorno do sistema. A partir da termodinâmica clássica foi possível calcular explicitamente esta importante expressão:

$$T\delta^2 S = -\left[\frac{C_V}{T} (\delta T)^2 + \frac{\rho}{\chi} (\delta v)_{N_Y}^2 + \sum_{YY'} \mu_{YY'} (\delta N_Y) (\delta N_{Y'})\right] < 0 \quad [5.16]$$

Aqui  $C_V$  é o calor específico a volume constante,  $\rho$  é a densidade,  $v = 1/\rho$  é o volume específico (o índice  $N_Y$  significa que a composição é mantida constante com a mudança de  $v$ ),  $\chi$  é a compressibilidade isotérmica,  $N_Y$  é a fração molar do componente  $y$  e  $\mu_{YY'}$  é a derivada

$$\mu_{YY'} = \left(\frac{\partial \mu_Y}{\partial N_{Y'}}\right)_{p,T} \quad [5.17]$$

onde  $p$  é a pressão.

As condições básicas de estabilidade na termodinâmica

clássica, formuladas inicialmente por Gibbs, são as seguintes:

$$C_V > 0 \text{ (estabilidade térmica)}$$

$$\chi > 0 \text{ (estabilidade mecânica)}$$

$$\sum_{YY'} \mu_{YY'} \delta N_Y \delta N_{Y'} > 0 \text{ (estabilidade relativa a difusão)}$$

Estas condições implicam que  $\delta^2 S$  está relacionada com  $P$  (equação 5.9) através de:

$$\frac{1}{2} \frac{\partial}{\partial t} \delta^2 S = \sum_k J_k X_k = P > 0 \quad [5.18]$$

É precisamente devido as desigualdades nas equações [5.16] e [5.18] que  $\delta^2 S$  é uma função de Lyapunov. Como já foi dito, a existência de uma função de Lyapunov garante o amortecimento de todas as flutuações. Esta é a razão porque próximo do equilíbrio, uma descrição macroscópica de grandes sistemas, é suficiente. Flutuações podem somente ter um papel secundário, aparecendo como correções para leis macroscópicas, as quais são desprezadas em grandes sistemas.

Duas questões de fundamental importância podem aqui ser levantadas:

(1) É possível extrapolar esta propriedade de estabilidade para longe do equilíbrio?

(2) É possível  $\delta^2 S$  representar o papel de uma função de Lyapunov quando são considerados grandes desvios do equilíbrio mas é mantida a estrutura de uma descrição macroscópica?

Fora do equilíbrio, a desigualdade [5.16] permanece válida, contudo a derivada de  $\delta^2 S$  está longe de ser relacionada com a produção total de  $S$  na equação 5.18, porém é relacionada com a

perturbação dessa produção de S. Em outras palavras, tem-se:

$$\frac{1}{2} \frac{\partial}{\partial t} \delta^2 S = \sum_k \delta J_k \delta X_k \quad [5.19]$$

O lado direito da equação [5.19] foi chamado por Glansdorff e Prigogine, de "produção de excesso de entropia". Nesta equação,  $\delta J_\rho$  e  $\delta X_\rho$  são, respectivamente, os excessos de fluxos e forças devido ao desvio do estado estacionário, cuja estabilidade foi posta à prova através de uma perturbação. Agora, ao contrário do que acontece no equilíbrio ou próximo do equilíbrio, o lado direito da equação 5.19, geralmente não tem um sinal bem definido. Se para todo t maior que  $t_0$ , onde  $t_0$  é o tempo inicial da perturbação, tem-se

$$\sum_k \delta J_k \delta X_k \geq 0 \quad [5.20]$$

então  $\delta^2 S$  é efetivamente uma função de Lyapunov e a estabilidade é garantida. Na região próxima do equilíbrio, esta quantidade é sempre positiva. A uma distância maior do equilíbrio o excesso de S pode mudar de sinal (levando em conta todas as condições impostas ao sistema).

É nessa região que tipos de comportamento completamente novos e inesperados podem ocorrer. Estes efeitos são devidos ao aparecimento de uma instabilidade, representada pela equação [5.19], que conduz a uma "bifurcação termodinâmica". A característica nova é que existem, então, "pontos críticos" (em outras palavras, uma amplificação da flutuação) a partir dos quais o sistema pode apresentar um fenômeno macroscópico de auto-organização no tempo e/ou

no espaço, com a formação de estruturas denominadas por Prigogine de "estruturas dissipativas".

Esses tipos de estruturas (física, química ou biológica) foram chamadas de dissipativas porque elas são mantidas através de um influxo de energia, no sistema. Prigogine introduziu esse termo para enfatizar a forte associação, a princípio paradoxal, entre "estrutura ou ordem" de um lado e "dissipação ou perda" do outro.

### 5.1.3. Aplicação a fenômenos macroscópicos

#### 5.1.3.1. Reação de Belousov-Zhabotinsky

Em 1959, Belousov comunicou a descoberta de oscilações periódicas na coloração de uma solução com uma frequência de  $10^{-2}$  Hz, no decorrer da oxidação de ácido cítrico por bromato, usando cério(III) como catalisador. Foram observadas dezenas de períodos (126). Posteriormente, estudos experimentais e teóricos detalhados dessa reação, foram publicados no período de 1964-1974 por Zhabotinsky e colaboradores (127).

O procedimento experimental é o seguinte: 2 ml da mistura homogênea (volumes iguais de  $\text{Ce}_2\text{SO}_4$  ( $4 \times 10^{-3}$  mol/l);  $\text{KBrO}_3$  ( $3,5 \times 10^{-1}$  mol/l);  $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$  (1,2 mol/l);  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1,5 mol/l) e poucas gotas do indicador ferroína) foram colocados em um tubo de ensaio termostaticado a  $21^\circ\text{C}$ .

A solução reagente inicialmente apresenta oscilações em relação ao tempo: passa periodicamente de uma coloração vermelha, indicativa do excesso de  $\text{Ce}^{3+}$ , a uma coloração azul indicativa do excesso de  $\text{Ce}^{4+}$  (estrutura temporal). Essa oscilações não ocorrem

simultaneamente em todas as partes da solução, mas se iniciam num ponto e se propagam em todas as direções com velocidades diferentes. Após um número variável de oscilações com o tempo, aparece uma pequena região de concentração não homogênea, a partir da qual procedem oscilações em relação ao espaço: camadas alternadamente coloridas de vermelho e azul, até encherem o tubo (estrutura espacial). Durante a formação dessas camadas, as oscilações com o tempo continuam a serem observadas na parte da solução onde as camadas ainda não foram estabelecidas. A estrutura final é geralmente estável durante 15 a 30 minutos e desaparece a medida que o sistema se aproxima do equilíbrio.

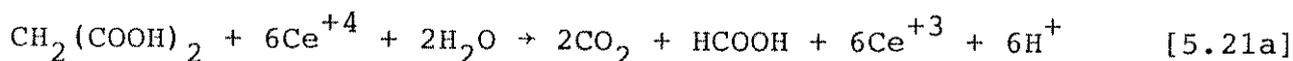
O experimento foi repetido a diferentes temperaturas. A estrutura temporal-espacial foi sempre reproduzida; somente seu tempo de vida varia. Contudo, se o experimento é realizado com concentrações iniciais dos reagentes fora do domínio no qual foram observadas as oscilações, o sistema permanece homogêneo e nenhuma estrutura espacial ou temporal é observada. É possível, também, realizar um experimento em um meio não homogêneo, isto é, impondo um gradiente de concentração (120).

A condição básica para o surgimento de oscilações químicas é a existência de reações não lineares: auto-catálise (a presença de um produto X da reação, acelera a sua própria síntese), auto-inibição (a presença de X bloqueia a reação de sua síntese) e catálise-cruzada (dois produtos pertencentes a duas reações em cadeia, um ativa a catálise do outro).

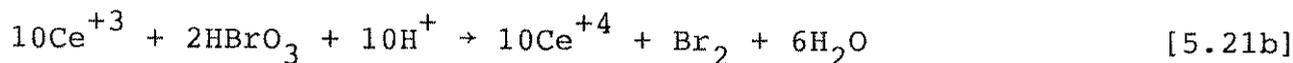
No caso da reação de Belousov-Zhabotinsky, as moléculas envolvidas são simples mas os mecanismos das reações são complexos; cerca de trinta intermediários já foram identificados. As princi-

tais etapas das reações parecem ser:

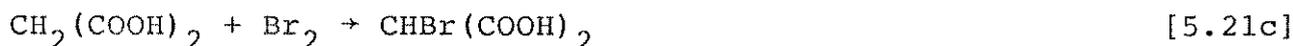
(a) oxidação do ácido malônico por Ce(IV):



(b) oxidação dos íons Ce(III) pelo ácido brômico:



(c) bromação do ácido malônico:



De acordo com os estudos cinéticos feitos por Zhabotinsky, pelo menos a etapa (b) é auto-catalítica. Durante o período de indução esta reação ocorre na mesma velocidade que a etapa (a). Em outras palavras



em (b) compensa a transformação:



em (a), de tal forma que a concentração de  $\text{Ce}^{+3}$  permanece constante no sistema. Simultaneamente, contudo, bromo é formado pela reação (b) e combina-se com ácido malônico em (c) para produzir ácido bromomalônico e ácido dibromomalônico. Ácido dibromomalônico forma

um complexo com  $Ce^{+3}$ , e assim, age como um inibidor da reação auto-catalítica (b). Quando o acúmulo do inibidor suprime a reação auto-catalítica, a concentração de  $Ce^{+4}$  cai, a medida que a velocidade da primeira reação permanece inalterada pelo inibidor. O complexo inibidor é contudo instável e se decompõe posteriormente em dióxido de carbono e ácido dibromoacético. Este último é um fraco inibidor. Como resultado a reação (b) recomeça a produzir íons  $Ce^{+4}$ . O mesmo "ciclo" é então repetido indefinidamente enquanto os reagentes estiverem presente em concentrações suficientemente distantes das do equilíbrio.

O reconhecimento de um processo dissipativo em sistemas de reação química foi manifestado, aparentemente, pela primeira vez no trabalho de Turing (128), que diz respeito a reações químicas acopladas à difusão dos reagentes. Prigogine, deu grande impulso ao estudo teórico de tais processos.

O estudo cinético da reação de Belousov-Zhabotinsky é extremamente complexo; a título de ilustração será apresentado a seguir um sistema simples (Brusselator) estudado por Prigogine e que consta da sequência de reações:



Os reagentes iniciais e produtos finais A, B, D e E, são mantidos constantes enquanto as concentrações dos dois componentes intermediários, X e Y, podem mudar com o tempo. Considerando as

constantes cinéticas iguais à unidade, obtém-se o sistema de equações:

$$\frac{dX}{dt} = A + X^2Y - BX - X \quad [5.23a]$$

e

$$\frac{dY}{dt} = BX - X^2Y \quad [5.23b]$$

o qual admite o estado estacionário (o detalhamento matemático dessas equações é encontrado na referência (120)):

$$X_0 = A, \quad Y_0 = \frac{B}{A} \quad [5.24]$$

onde  $X_0$  e  $Y_0$  são, respectivamente, as concentrações de X e Y no estado estacionário.

A solução (equação 5.24) torna-se instável se

$$B > B_c = 1 + A^2 \quad [5.25]$$

Além do valor crítico de  $B(B_c)$ , a reação química conduz a um comportamento ordenado no tempo chamado de "estrutura temporal dissipativa". A frequência dessas oscilações, passando periodicamente de uma coloração vermelha para azul, é uma função bem definida de variáveis macroscópicas, como concentração e temperatura.

Quando se considera a difusão, a variedade de instabilidades torna-se extremamente grande. Na presença de difusão, novas equações cinéticas substituem a equação 5.23:

$$\frac{dX}{dt} = A + X^2Y - BX - X - D_X \frac{\partial^2 Y}{\partial r^2} \quad [5.26]$$

$$\frac{dY}{dt} = BX - X^2Y + D_Y \frac{\partial^2 Y}{\partial r^2} \quad [5.27]$$

onde  $D_X$  e  $D_Y$  são os coeficientes de difusão dos componentes X e Y. Aqui há a possibilidade de estados estacionários não uniformes, chamados de bifurcações por Turing (128). Na presença de difusão, a estrutura temporal pode tornar-se dependente do espaço e apresentar oscilações químicas (camadas alternadas de vermelho e azul). O sistema, então, apresenta um estado ordenado e se mantém nesse estado estacionário de elevada ordem às custas de uma dissipação de energia, que é fornecida pela relação fixa de não equilíbrio AB/DE para a sequência de reações (equação 5.23). Em outras palavras, o sistema apresenta uma "estrutura espacial dissipativa".

No caso da reação de Belousov-Zhabotinsky, à semelhança do "Brusselator", uma estrutura dissipativa espacial aparece como resultado de uma instabilidade na estrutura dissipativa temporal.

Concluindo a discussão da reação de Belousov-Zhabotinsky verifica-se que, de modo geral a ocorrência de estruturas dissipativas requer que o sistema exceda algum "valor crítico", o qual é uma função complexa dos parâmetros que descrevem os processos de reação e difusão. Um aspecto também geral é que as estruturas dissipativas são muito sensíveis a características globais dos sistemas químicos, tais como: forma, tamanho do sistema ou do recipiente, condições de contorno impostas à sua superfície e assim por diante. Todos esses aspectos influenciam de forma decisiva os tipos de instabilidade que conduzem a estruturas dissipativas.

### 5.1.3.2. Células de Bénard

Os primeiros trabalhos descrevendo as células de Bénard datam do começo do século (114). O autor e seus colaboradores continuaram trabalhando exaustivamente sobre o tema durante 28 anos (115).

O sistema de Bénard consta de uma camada horizontal de fluido de espessura de 1 mm (o líquido usado era espermacete de baleia, com uma temperatura de fusão de  $46^{\circ}\text{C}$ ). A camada de líquido era posta sobre um prato metálico de 100 mm de diâmetro, o qual era aquecido e mantido a uma temperatura uniforme  $T_2$ . A superfície superior estava em livre contato com o meio ambiente, à temperatura  $T_1$ . Quando o gradiente de temperatura  $(T_2 - T_1) / (T_1 + T_2)$  atinge um "valor crítico" o estado estacionário, no qual o calor é propagado somente por condução torna-se instável. Tem-se assim a convecção. A produção de entropia é então ampliada à medida que por convecção se tem um novo mecanismo de transporte de calor. Dessa forma, o escoamento considerável de calor ao longo do gradiente de temperatura entre as fronteiras do sistema cria uma estrutura dissipativa, o qual mantém no interior do sistema um estado de escoamento de matéria que se encontra bastante afastado do estado de equilíbrio. A sujeição do sistema a um gradiente térmico gera uma instabilidade e faz com que um número macroscópico de moléculas se mova de um modo coerente, por tempos na faixa de segundos a horas, criando um padrão de fluxo e formando um estado de auto-organização: células hexagonais de tamanho característico.

A formulação de uma explicação detalhada e quantitativa da convecção nas células de Bénard, tem se constituído em um desa-

ção permanente para teóricos (116-117). Em 1916, Lord Rayleigh, mostrou que a simples presença do gradiente de temperatura não é suficiente para garantir o começo do fluxo convectivo. É necessário que a energia potencial, liberada pela descida da camada mais densa e subida da camada menos densa, exceda a energia dissipada pela viscosidade de arraste e difusão de calor. A relação desses efeitos pode ser expressa pelo número adimensional de Rayleigh: a força de empuxo dividida pelo produto da viscosidade de arraste e velocidade da difusão de calor. A convecção começa, então, quando o número de Rayleigh excede um "valor crítico". Por exemplo, em experimentos realizados por Peter L. Silveston e Ernest L. Koschmieder, foi encontrado o número crítico de Rayleigh de  $1700 \pm 50$  (117).

As limitações da teoria de Rayleigh são as seguintes:

(i) no modelo teórico o fluido é confinado entre duas fronteiras rígidas e, experimentalmente, a fronteira superior é livre; (ii) a única propriedade do sistema alterada pela temperatura é a densidade. Assim, o modelo considera explicitamente, o empuxo como a única força propulsora do fluxo convectivo em determinado fluido, cuja grandeza depende da diferença de temperatura entre topo e fundo.

Uma teoria alternativa desenvolvida em 1958 por J.R.A. Pearson reconhece a tensão superficial como tendo uma influência dominante no fluxo convectivo nos experimentos de Bénard. Como a densidade, a tensão superficial é reduzida com o aumento de temperatura. O balanceamento desses efeitos é expresso pelo número de Marangoni, o qual é similar ao de Rayleigh, exceto que a força de empuxo é substituída pela força de superfície. Assim, a convecção

nas células de Bénard só tem início quando o número de Marangoni atinge um certo valor crítico. Uma teoria posterior desenvolvida em 1964 por D.A. Nield incorpora ambas as forças, empuxo e tensão superficial, com predominância da tensão superficial. Vários experimentos da convecção Bénard demonstram esse fato de forma inequívoca: (a) as células hexagonais de convecção aparecem mesmo quando o líquido é resfriado de baixo para cima; sob estas condições o gradiente de densidade se opõe ao fluxo convectivo; portanto, a formação de células de Bénard nessas condições mostra o domínio das forças de superfície; (b) fluxo convectivo atribuído à tensão superficial foi observado em experimentos conduzidos em duas expedições espaciais, onde a gravidade e o empuxo são desprezíveis; (c) fluxo convectivo é suprimido quando é adicionado detergente na parte superior da camada do líquido; nesse caso a tensão superficial é muito menor do que em ausência dos detergentes; (d) experimentos mostraram o efeito das paredes laterais do recipiente no começo da convecção de Bénard; a forma das fronteiras impõe um fluxo primário transitório antes de se atingir o "mosaico hexagonal" no estado estacionário. (117).

Um experimento bastante instrutivo é o detalhado em 1961 por S. Chandrasckhar, onde uma camada de líquido (óleo de sílica) é aquecida de baixo para cima e mantida horizontalmente entre dois pratos condutores de calor. Acima de uma diferença crítica de temperatura, células com formato de rolos apresentam-se como a configuração estável em convecção conduzida por forças de empuxo ao invés de tensão superficial. A unidade fundamental do padrão de fluxo consiste de dois rolos que giram em direções opostas; a largura desta unidade é duas vezes a espessura da camada do fluido. O

aspecto do padrão depende fortemente das paredes laterais do recipiente. Em um recipiente retangular os rolos são paralelos às paredes menores: em um recipiente circular, eles formam anéis concêntricos. Um padrão de rolo estável é usualmente observado somente quando o líquido não tem superfície livre. Este fenômeno concorda elegantemente com as predições da teoria de Rayleigh (117).

Concluindo, a convecção conduzida por tensão superficial, em um determinado sistema, é qualitativamente diferente da convecção conduzida por empuxo.

Uma teoria da convecção bem estabelecida e utilizável deve incluir a condição de que o próprio fluxo altere a força que dirige esse fluxo. Não é conhecido um método prático para a solução exata do problema, mas existem algumas aproximações. Uma delas é a adaptação das idéias introduzidas em 1937 por L.D. Landau (para descrever certos tipos de transição de fase, tal como, o começo da magnetização em materiais ferromagnéticos) para a convecção, que incorpora a teoria de Rayleigh como primeira aproximação. Contudo, ambas as teorias são derivadas de experimentos hipotéticos nos quais muitas propriedades dos fluídos, tais como viscosidade e difusividade térmica, são consideradas constantes com a temperatura. Assim um modelo matemático tratável das células de Bénard, que inclua o compromisso ótimo entre a complexidade dos fluídos e a complexidade da teoria continua a ser um desafio para os teóricos (117).

## 5.2. Parte Experimental

### 5.2.1. Materiais e Equipamentos

#### Materiais:

Ficoll, Pharmacia Fine Chemicals (Lot Nº 01428, Code Nº 17-0400-01).

Sacarose P.A. Reagen

Tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 contendo EDTA  $10^{-3}$  M.

Eritrocruorina (hemeproteína extracelular).

Hemoglobina humana (hemeproteína intracelular).

Membranas assimétricas de acetato de celulose, preparadas a partir de uma solução contendo 11,7% (m/m) de acetato de celulose Rhodia, 43,3% (m/m) de acetona, 19,3% (m/m) de ácido acético e 25,7% (m/m) de H<sub>2</sub>O (segundo o método descrito no capítulo 2, item 2.2).

Células de diálise de paredes paralelas (já utilizada em experimentos anteriores nos capítulos 2, 3 e 4).

Células de diálise setoriais (Figura 5.1).

#### Equipamentos:

Centrífuga refrigerada, de caçapas basculantes, RB-3B Sorvall Instruments.

Bomba peristáltica, Milan Equipamentos Científicos LTda.

Densímetro PAAR-DMA 60/602.

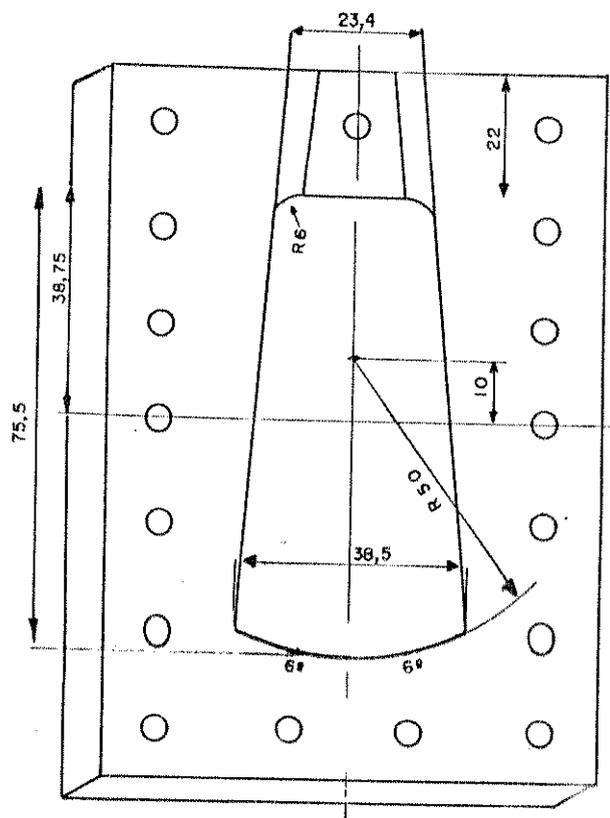


Figura 5.1 Vista de frente do compartimento da solução que compõe a célula setorial de diálise, construída em acrílico (dimensões em mm).

#### 5.2.2. Obtenção de gradientes de densidade auto-gerados por osmocentrifugação

As células de diálise usadas para a obtenção dos gradientes de densidade, foram de dois tipos: setoriais e de paredes paralelas. As setoriais foram especialmente projetadas para este experimento (Figura 5.1), enquanto as de paredes paralelas já haviam sido usadas em experimentos anteriores (itens 2.2, 3.2 e 4.2).

As soluções formadoras dos gradientes de densidade foram

as seguintes:

(i) Ficoll 13% (m/m) e sacarose 22% (m/m) em tampão (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, contendo EDTA  $10^{-4}$  M);

(ii) Ficoll 8% (m/m) em tampão 92% (m/m).

Cada célula de diálise foi montada e um dos seus compartimentos foi cheio com a solução formadora do gradiente de densidade; simultaneamente, o outro compartimento foi cheio com solvente. No caso da solução (i) o solvente foi sacarose 22% (m/m) e tampão 78% (m/m) e na solução (ii) o solvente foi somente o tampão.

As células foram colocadas na centrífuga a 3000 rpm, 4°C e 4 h (incluindo o tempo de aceleração). Uma vez obtidos os gradientes de densidades, foram colhidas frações de cada gradiente simultaneamente às do solvente, ao longo de toda a célula. Medidas de densidade foram feitas com o densímetro PAAR DMA 60/602. Com os dados de densidade e raio de centrifugação foram construídos os gráficos da Figura 5.2 (a curva 5.2a foi resultado de quatro experimentos, enquanto a curva 5.2b foi resultado de dois experimentos). A curva 5.2a foi utilizada em estudos anteriores (item 4.2) para o cálculo do coeficiente de sedimentação da eritrocruorina.

### 5.2.3. Centrifugação zonal com amostras de alta concentração de proteína

Uma vez obtido o gradiente de densidade tipo (i), em célula de diálise de paredes paralelas, este foi transferido para um tubo de vidro com o auxílio de uma bomba peristáltica. Para essa operação não alterar o gradiente de densidade, os seguintes

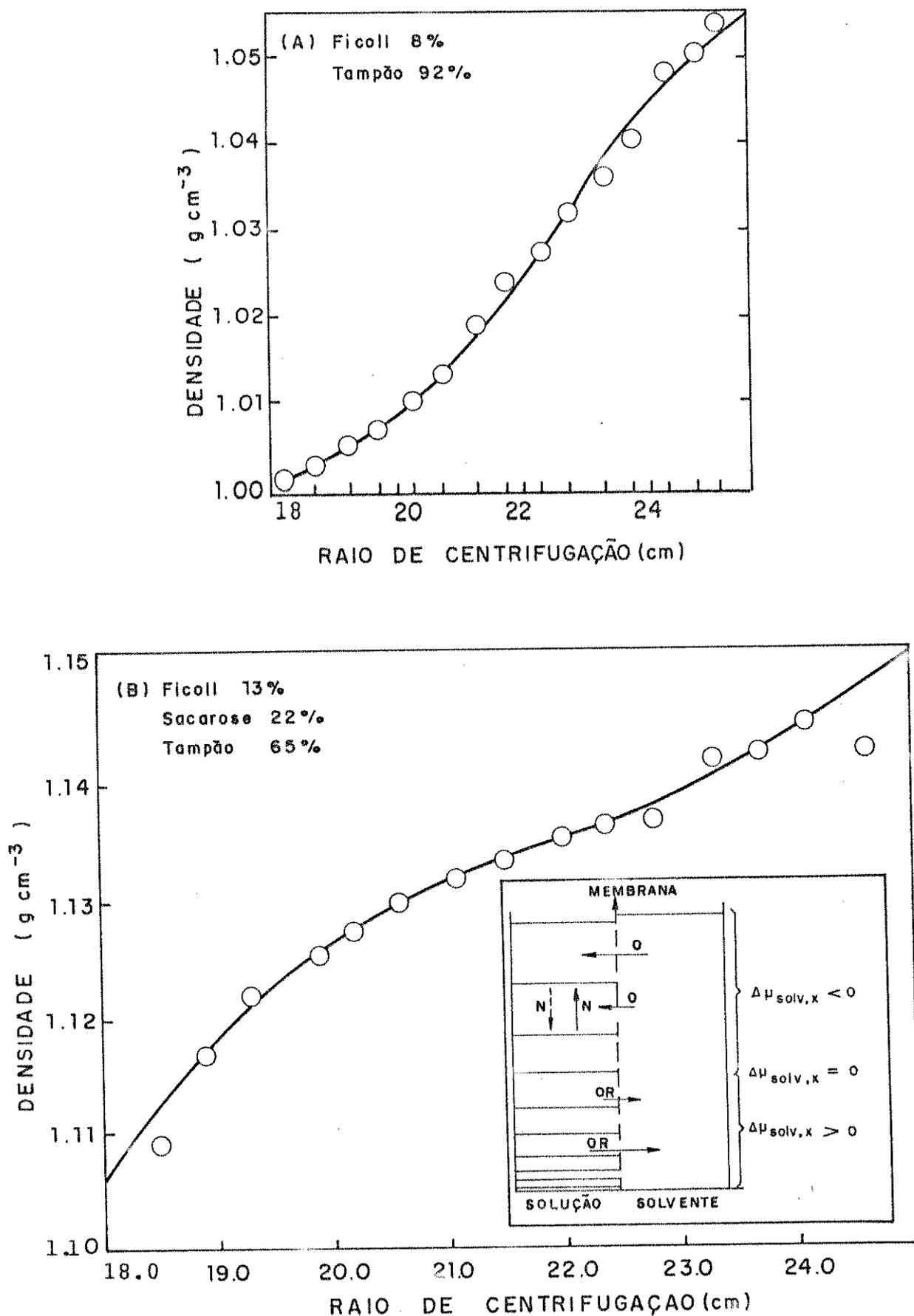


Figura 5.2. Gradientes de densidade auto-gerados por osmocentrifugação, a partir das soluções. (A) Ficoll 8%(m/m) em tampão Tris-HCl 0,05M e pH 7,4 contendo EDTA  $10^{-3}\text{M}$ ; (B) Ficoll 13%(m/m), sacarose 22%(m/m) no mesmo tampão (em destaque o fluxo do solvente na cela de osmocentrifugação). Condições de centrifugação: 3000 rpm, 4 h,  $4^{\circ}\text{C}$ .

cuidados foram tomados: 1) a célula de diálise foi imersa em um banho de água ( $T \approx 4^{\circ}\text{C}$ ) e, também, o tubo de vidro; 2) o conteúdo do compartimento do solvente foi retirado lentamente com a ajuda de uma seringa; 3) o gradiente de densidade foi, então, transferido lentamente da célula de diálise para o tubo de vidro.

Após a transferência, amostras de eritrocruorina (200  $\mu\text{l}$ , 125,0 mg/ml) e hemoglobina humana (200  $\mu\text{l}$ , 91,2 mg/ml) foram colocadas, separadamente, sobre os gradientes de densidade contidos nos tubos de vidro e levadas a centrifugar a 3000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após 24 horas de centrifugação foi observado apenas o alargamento da zona original da proteína (Figura 5.3A).

#### 5.2.4. Osmocentrifugação zonal com amostras de alta concentração de proteína

O experimento foi conduzido em um sistema aberto, osmoticamente acoplado (presença de correntes osmótica e osmótica-reversa) e sob a ação de um campo centrífugo. Foram estudados os efeitos de algumas características do sistema:

##### 1. Efeito da concentração da amostra

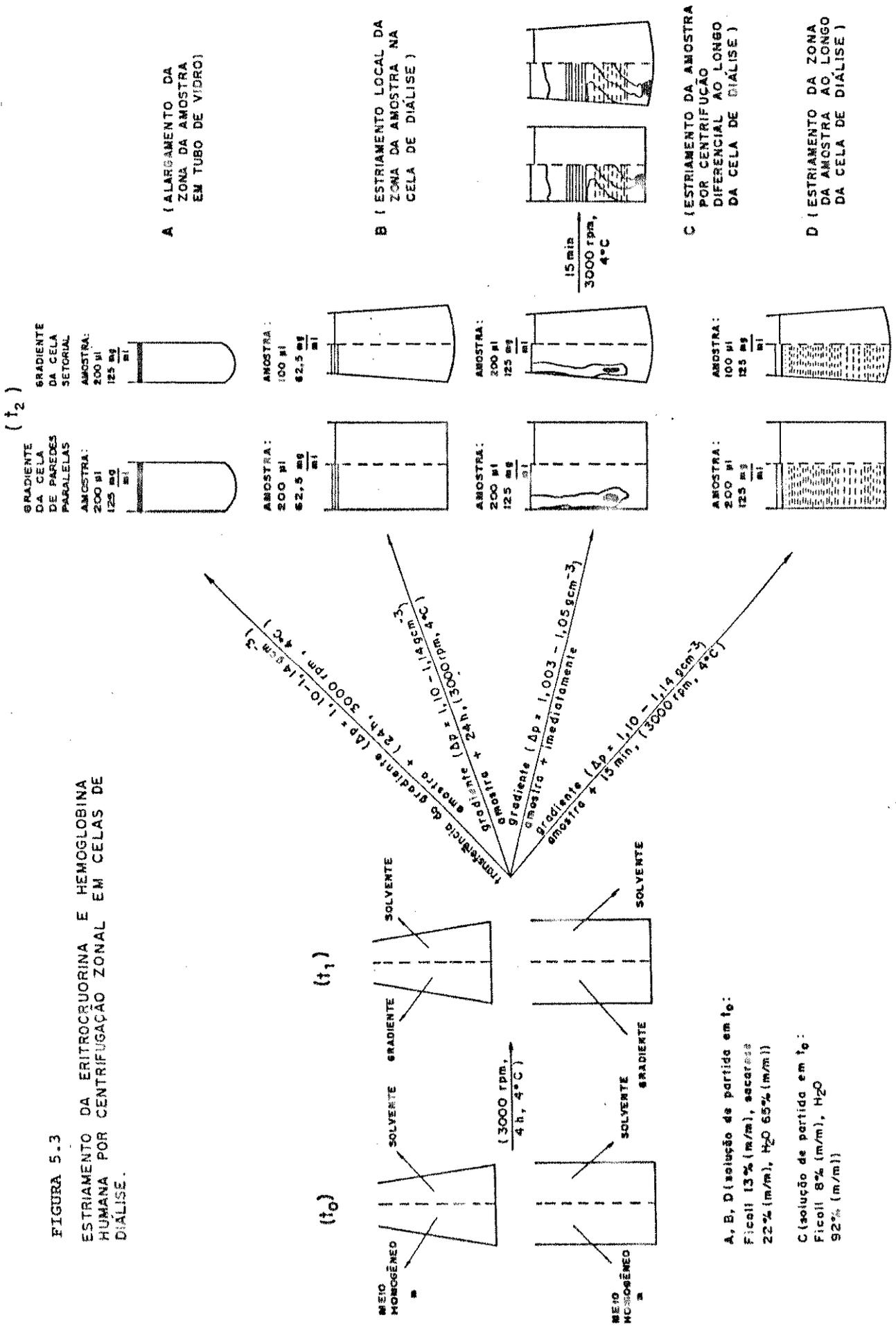
Foram usadas altas concentrações de proteína: eritrocruorina (10,0; 62,5 e 125 mg/ml) e hemoglobina humana (91,2 mg/ml); para verificar o efeito da concentração sobre a migração das proteínas.

##### 2. Efeito do tipo de material

Dois tipos de hemeproteínas foram usados: eritrocruorina (peso molecular  $3,23 \times 10^6$  Daltons) e hemoglobina humana (peso

FIGURA 5.3

ESTRIAMENTO DA ERITROCRUORINA E HEMOGLOBINA HUMANA POR CENTRIFUGAÇÃO ZONAL EM CELAS DE DIALISE.



A, B, D (solução de partida em  $t_0$ ):

Ficoll 13% (m/m), sacarose 22% (m/m),  $\text{H}_2\text{O}$  65% (m/m)

C (solução de partida em  $t_0$ ):

Ficoll 8% (m/m),  $\text{H}_2\text{O}$  92% (m/m)

molecular  $92 \times 10^3$  Daltons) para verificar a especificidade da estrutura.

### 3. Efeito do tipo de gradiente

Foram utilizados dois tipos de gradiente de densidade (i) e (ii) descritos no item 5.2.2.

### 4. Efeito da geometria da célula de diálise

Para o estudo do efeito das paredes laterais sobre as estruturas, foram usados dois tipos de células de diálise: setoriais e de paredes paralelas.

### 5. Efeito de fluxo do solvente

Para analisar esse efeito, o gradiente de densidade do tipo (ii) foi dividido em três regiões denominadas de a, b e c (ilustradas na Figura 5.2B) a seguir explicadas:

- (a) região em que o solvente flui do compartimento do mesmo solvente para o compartimento da solução;
- (b) região que inclui o ponto de fluxo zero do solvente e suas vizinhanças;
- (c) região em que o solvente flui do compartimento da solução para o compartimento do próprio solvente.

As equações que explicam o fluxo do solvente nas três diferentes regiões descritas acima, foram apresentadas no item 2.1.5.1.

#### 5.2.4.1. Experimentos realizados

##### Experimento I

Após gerados os gradientes de densidade (a partir de Fi-

coll 13% (m/m), sacarose 22% (m/m) e tampão 65% (m/m)) em células de diálise de paredes paralelas, foram postas separadamente duas amostras de respectivamente 10,0 mg/ml e 62,5 mg/ml de eritrocruorina sobre os gradientes. Em seguida, foram levadas à centrífuga (3000 rpm, 4°C) e acompanhadas visualmente. No final de 24 horas foram fotografadas (Figura 5.3B).

#### Experimento II

Obtido o gradiente de densidade (a partir de Ficoll 8% (m/m) em tampão) em células de diálise de paredes paralelas, foi colocada uma amostra de 125,0 mg/ml de eritrocruorina sobre o gradiente. A seguir a célula foi centrifugada (3000 rpm, 4°C) durante 15 minutos; foi removida da centrífuga, examinada visualmente e fotografada (Figura 5.3C).

#### Experimento III

Uma vez obtidos os gradientes de densidade em células de diálise setoriais e de paredes paralelas, a partir de uma solução contendo: Ficoll 13% (m/m) e sacarose 22% (m/m) em tampão, amostras de eritrocruorina e hemoglobina humana foram colocadas sobre os gradientes, nas mesmas células de diálise em que estes foram gerados, conforme o esquema abaixo:

C1) Célula de diálise de paredes paralelas, 200 µl de amostra de eritrocruorina (125 mg/ml);

C2) Célula de diálise setorial, 100 µl de amostra de eritrocruorina (125 mg/ml);

C3) Célula de diálise de paredes paralelas, 200 µl de

amostra de hemoglobina humana (91,2 mg/ml);

C4) Célula de diálise setorial, 100  $\mu$ l de amostra de hemoglobina humana (91,2 mg/ml).

Nas células de paredes paralelas o volume das amostras foi de 200  $\mu$ l, enquanto na célula setorial foi de 100  $\mu$ l, isto para manter a mesma espessura da zona.

Em seguida, as células foram levadas à centrífuga (3000 rpm, 4°C) durante 5, 10, 15, 30 e 45 minutos. Ao fim de cada um desses intervalos a centrifugação foi interrompida e as células foram fotografadas (Figura 5.3C e Figura 5.4).

### 5.3.2. Resultados

#### 5.3.2.1. Efeito da concentração

No experimento I foram observados os seguintes resultados após 24 horas:

i) para amostras de eritrocruorina, 10,0 mg/ml, foi observado somente o alargamento da zona original (Figura 5.3B);

ii) para amostras de eritrocruorina, 62,5 mg/ml foi observado um estriamento local da banda proteína, na altura do topo do gradiente (Figura 5.3B).

No experimento III, onde foram usadas altas concentrações de proteína (eritrocruorina, 125 mg/ml e hemoglobina humana, 91,2 mg/ml), foi observado em todas as quatro células (C1, C2, C3 e C4) a formação de múltiplas bandas coloridas a partir de 5 minutos.

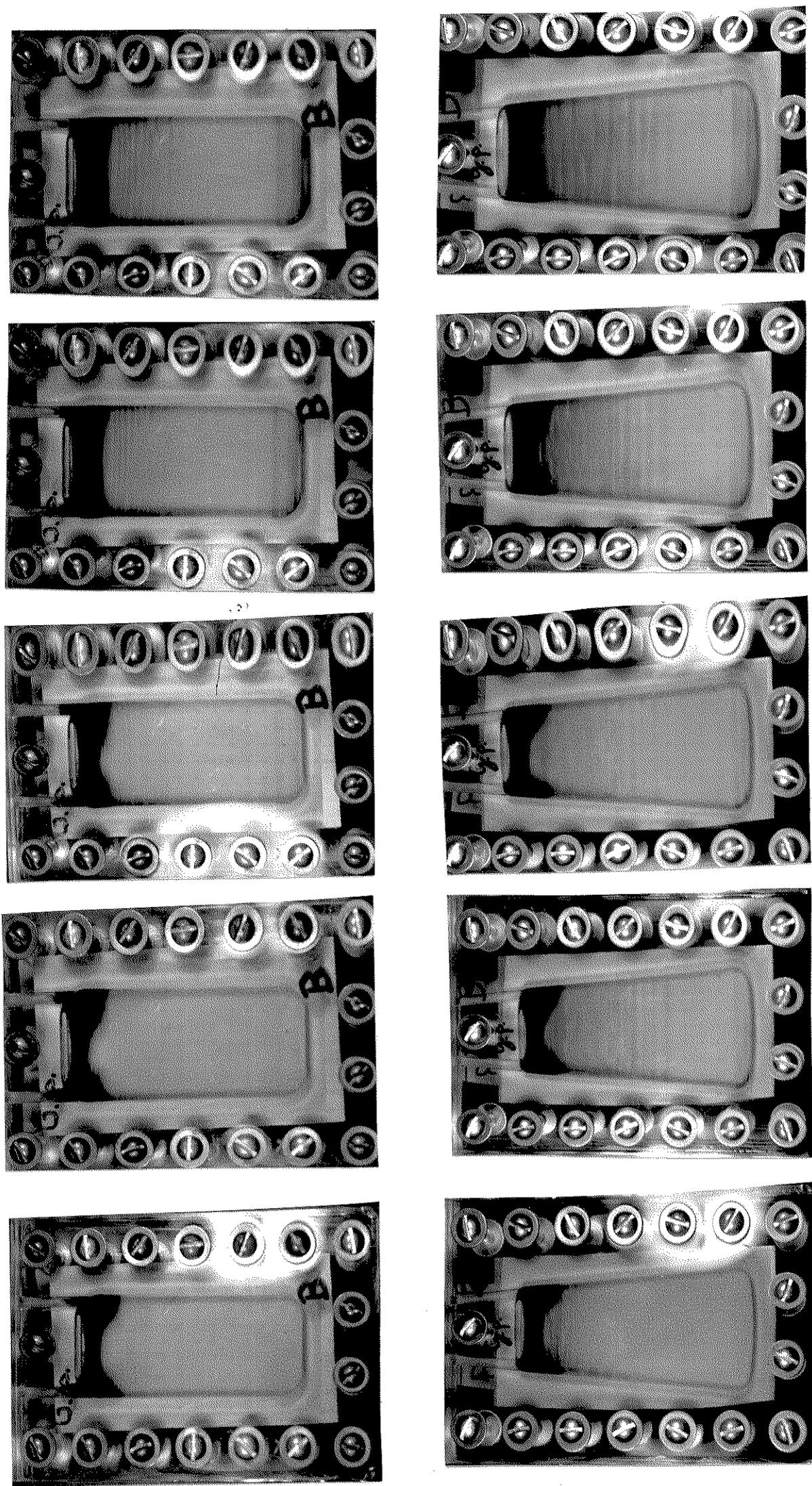


Figura 5.4. Formação de estruturas dissipativas em células de diálise: A) de paredes paralelas; B) setorial.

Em tempos maiores, as bandas se propagaram por toda a célula, gerando um padrão periódico de concentração (estrutura espacial) como se vê na Figura 5.4.

#### 5.3.2.2. Efeito do tipo de material

Quando se compara transferência de proteína, desde a zona original (topo do gradiente) até o fundo do gradiente, para as duas amostras de proteína, observa-se que a hemoglobina humana (91,2 mg/ml;  $10^{-6}$  mM) migra mais acentuadamente (maior intensidade das bandas, Figura 5.5) que a eritrocruorina (125,0 mg/ml;  $38,7 \times 10^{-9}$  mM).

#### 5.3.3.3. Efeito do tipo de gradiente

Para altas concentrações de proteína, em diferentes gradientes, o resultado é o seguinte: i) quando o gradiente de densidade tem o intervalo de  $1,10 - 1,15 \text{ g/cm}^3$ , o resultado é o estriamento da proteína por toda a célula de diálise, como já foi relatado no experimento I; ii) quando o gradiente de densidade tem o intervalo de  $1,00 - 1,05 \text{ g/cm}^3$  (experimento II), a amostra posta sobre o gradiente decanta imediatamente. Levada à centrífuga (3000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) observa-se com 15 minutos um estriamento, por toda a célula.

#### 5.3.3.4. Efeito da geometria da célula

Na célula de paredes paralelas, onde as múltiplas bandas ou estrias são regularmente espaçadas, o espaçamento é da mesma ordem de grandeza da espessura das estrias.

Na célula setorial, as múltiplas bandas ou estrias não são regularmente espaçadas, as distâncias entre elas vão aumentando (no sentido do topo para o fundo da célula). A observação de estrias no fundo deste tipo de célula é mais tardia que na célula de paredes paralelas.

#### 5.3.3.5. Efeito do fluxo do solvente

Para analisar o efeito do fluxo de solvente na cela de osmocentrifugação sobre a formação de estrias, as fotos da Figura 5.4 foram cuidadosamente observadas com o auxílio de uma lupa. Uma outra sequência de fotos para hemoglobina humana foi também analisada. Com o resultado dessas observações foi construída a Figura 5.5.

A região (a) na qual o solvente flui osmoticamente, localiza-se na Figura 5.5, do topo até aproximadamente 3,0 cm. A região (b) que inclui o "ponto de fluxo zero" e suas vizinhanças, localiza-se na Figura 5.5, de aproximadamente 3,5 a 5,0 cm. Aqui é conveniente considerar também o gradiente de densidade da Figura 5.2b. A região (c), na qual o solvente flui do compartimento da solução para o compartimento do solvente, localiza-se na Figura 5.5, de aproximadamente 5,0 até o fundo da célula.

As equações que explicam essas regiões foram apresentadas no item 1.2.5.1.

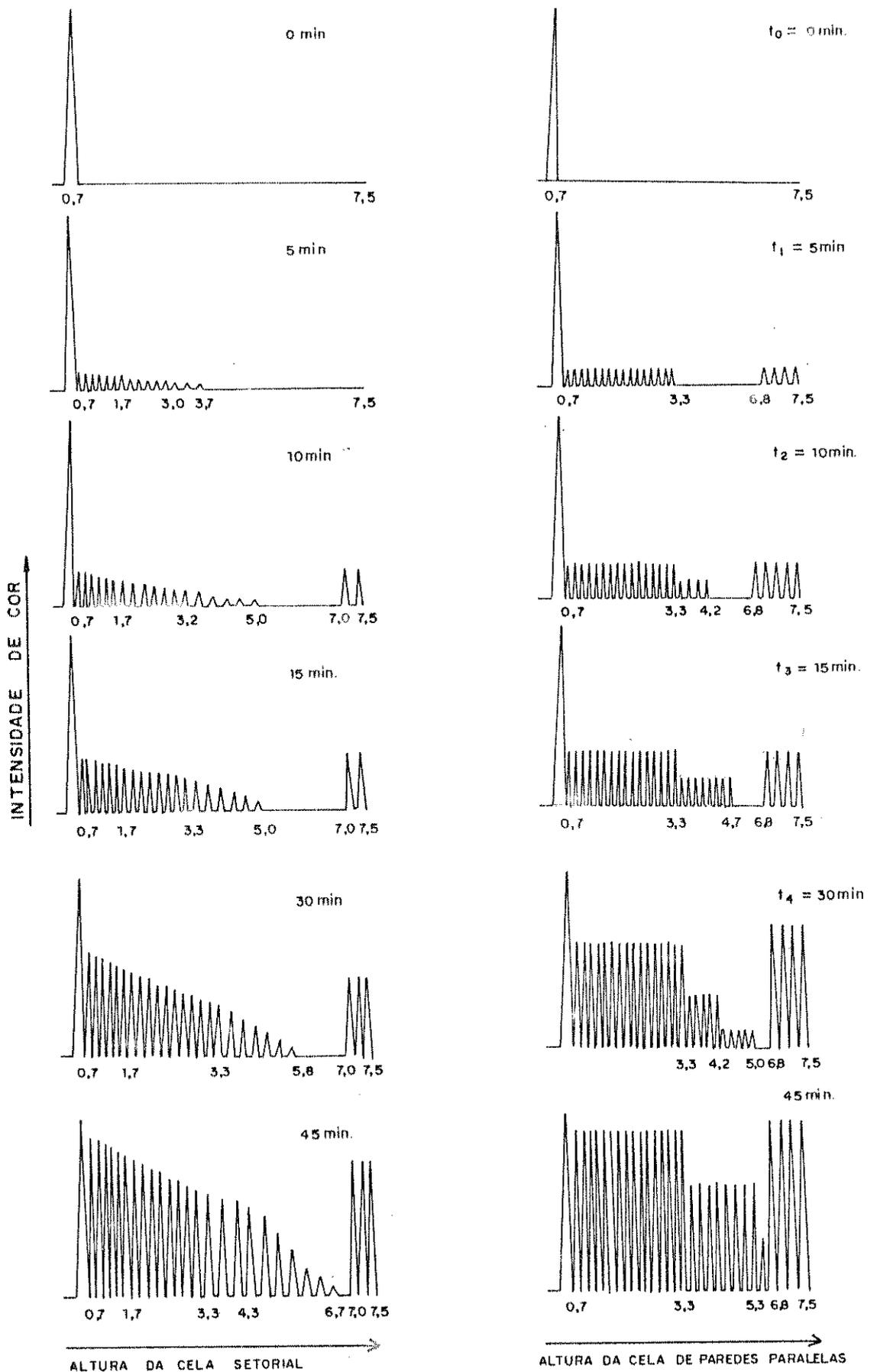


Figura 5.5. Representação das estruturas dissipativas temporais e espaciais (gráficos baseados em observação visual das fotos da Figura 5.4).

A seguir são detalhadas as observações atribuídas ao fluxo do solvente.

#### Zona principal

Quando se observa a "zona original" da proteína no decorrer do tempo de 5 até 45 minutos, nas quatro células do experimento I, verifica-se que independente dos parâmetros: geometria da célula, tipo de proteína e concentração da amostra, o topo do sistema apresenta um adensamento na base da zona. A espessura da região adensada vai ficando mais estreita com o tempo (Figura 5.4 e 5.5).

#### Células de paredes paralelas

região (a): com cinco minutos de centrifugação, já são observadas estrias por toda essa região, as quais são regularmente espaçadas e de mesma intensidade de cor. A concentração das estrias aumenta com o tempo, diminuindo a distância entre elas;

região (b): aqui são registradas estrias (já a partir de 5 minutos de centrifugação), que vão se propagando com o tempo para o fundo da célula. As estrias são regularmente espaçadas e de coloração uniforme. Para um determinado tempo, quando se compara os padrões das estrias das regiões (a) e (b), verifica-se que a distância entre as estrias na região (b) é maior que na região (a) e, opostamente, a concentração das estrias na região (b) é menor que na região (a). Observa-se, também, que a concentração das estrias aumenta com o tempo, diminuindo a distância entre elas.

região (c): à semelhança da região (a), com 5 minutos de

centrifugação já são observadas estrias por toda a região, contudo, a distância entre elas é menor que na região (a) e a concentração das estrias é igual ou superior à da região (a). Verifica-se, também, que a concentração de proteína nas estrias aumenta com o tempo, diminuindo a distância entre elas.

#### Células setoriais

região (a): com 5 minutos de centrifugação, já são observadas estrias por toda a região. As estrias não são regularmente espaçadas, isto é, as distâncias entre elas vão aumentando com a profundidade da célula. A concentração de proteína nas estrias vai diminuindo no mesmo sentido, mas aumenta com o tempo, diminuindo a distância entre elas.

região (b): as estrias possuem um padrão de espaçamento e concentração similar às da região (a).

região (c): tem um padrão semelhante às da região (c) da célula de paredes paralelas.

#### 5.4. Discussão

Centrifugação zonal em tubos de vidro (5.2.3) não produziu nenhum estriamento das bandas proteína, mesmo com 24 horas de centrifugação. Isto elimina a possibilidade de atribuir-se a formação de bandas ao fracionamento das proteínas, nos experimentos conduzidos em células de diálise (nas mesmas condições de gradiente, amostras, condições de centrifugação).

A formação de estrutura temporal-espacial, observada nos

experimentos realizados em célula de diálise pode ser atribuída ao adensamento da solução de proteína na base da zona, por ultrafiltração; este adensamento (instabilidade) gera gradientes horizontais de densidade. A partir de um determinado "valor crítico" de adensamento, começa a convecção da região adensada da zona, a qual migra gerando uma nova banda no espaço (estrutura espacial). A repetição deste efeito com o tempo, causa o aparecimento de múltiplas bandas (estrutura temporal). Esses efeitos simultâneos, conduzem a uma estrutura final: múltiplas bandas coloridas por toda a célula.

O adensamento que se observa nitidamente na Figura 5.4, e que diminui de intensidade com o tempo, pode funcionar como uma "fonte de alimentação" para a formação de múltiplas bandas.

Para avaliar se a formação da estrutura aqui encontrada ocorre com "dissipação de energia", alguns pontos serão discutidos a seguir:

1. Trata-se de um sistema aberto, em condições de não equilíbrio. Nestes sistemas, para alcançar o equilíbrio isopícnico, as partículas protéicas (densidade =  $1,37 \text{ g/cm}^3$ ) deveriam migrar até o fundo do gradiente, pois as suas densidades são maiores que toda a faixa de densidades do gradiente ( $1,10 - 1,15 \text{ g/cm}^3$ ).

2. O gradiente de densidade é estável, no tempo de realização dos experimentos (45 minutos).

Reunindo esses dois pontos, e concentrando a atenção na "zona de alimentação do sistema" verificamos que as correntes osmótica e osmótica-reversa impõem ao sistema binário (proteína + solvente) uma nova rota de transporte de massa, com o auxílio de

uma membrana semi-permeável. Cada nova interface no sistema (ou nova rota de transporte de massa) contribuirá para um  $dG/dt$  mais negativo. Dessa forma, o sistema é conduzido para um estado ordenado (múltiplas bandas coloridas por toda a célula) às custas de dissipação de energia livre.

Concluindo, o experimento aqui exposto revela um novo mecanismo de formação de estrutura dissipativa temporal-espacial, em células de diálise, que pode ser reproduzido e acompanhado com muita facilidade.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

As técnicas de fracionamento e determinação do tamanho de partículas poliméricas aqui desenvolvidas, osmocentrifugação zonal e centrifugação zonal (usando gradientes de densidade auto-gerados por osmocentrifugação), possuem as seguintes propriedades: alta resolução, capacidade de fracionar e caracterizar por tamanho, capacidade de fracionar grandes amostras e rapidez na obtenção dos resultados. A partir dos resultados já publicados (74-76) pode-se dizer que os procedimentos descritos aqui podem ser adequados para muitas finalidades, por exemplo o controle do tamanho das partículas na polimerização por emulsão ou dispersão de látexes de PS. Nós acreditamos que as técnicas aqui estabelecidas abrem novas perspectivas para a caracterização de látexes poliméricos, um assunto que tem mostrado pouco progresso até o momento (26).

O movimento de sedimentação das zonas de látex é mais rápido na osmocentrifugação zonal que em experimentos de centrifugação normal, o que indica a necessidade de otimização dos gradientes de densidade auto-gerados por osmocentrifugação, sendo possível utilizar alguns roteiros já existentes na literatura (97,98).

Os estudos de agregação aqui realizados possuem as seguintes características: i) é possível utilizar partículas em uma larga faixa de tamanhos, o que não pode ser feito em microscopia

ótica (18-19); ii) os agregados são submetidos a baixas taxas de cisalhamento, durante o experimento de centrifugação; iii) os agregados formados a baixas concentrações de sal são facilmente detectados por centrifugação zonal; estes agregados não são relatados pelos autores que usam espalhamento de luz (15-17). Essas características poderão contribuir enormemente para futuros estudos da cinética de agregação de partículas, na solução de problemas até o momento não resolvidos, tais como: separar os agregados sem modificar as suas estruturas, quantificar as concentrações desses agregados em função do tempo e conhecer as estruturas dos agregados (18).

Com relação aos estudos realizados com a eritrocruorina de Glossoscolex paulistus, conclui-se que o coeficiente de sedimentação à diluição infinita, 58S, encontra-se dentro do intervalo obtido para as diversas eritrocruorinas (91). A partir do coeficiente de sedimentação foi estimado o peso molecular  $3,23 \times 10^6$  Da. Esses resultados indicam a possibilidade de medir o coeficiente de sedimentação e estimar a massa molar de proteínas em centrífugas de baixa velocidade.

Por último, esta tese descreve uma nova classe de estruturas dissipativas, encontradas em experimentos de ultracentrifugação zonal, utilizando altas concentrações de proteína; estes experimentos podem ser reproduzidos e acompanhados com muita facilidade. Esse estudo, aliado aos casos análogos descritos na literatura (110-119), provavelmente contribuirá para resolver problemas básicos de morfogênese e biogênese (122-123).

## 7. PERSPECTIVAS

- 7.1. Aperfeiçoar a centrifugação e a osmocentrifugação através da utilização de um equipamento ótico ou do acoplamento de uma câmara de vídeo à centrífuga, para acompanhar, sem interrupção, o deslocamento das bandas;
- 7.2. Otimizar os gradientes de densidade obtidos por osmocentrifugação;
- 7.3. Caracterizar partículas de látexes poliméricos, naturais e sintéticos, por tamanho e/ou densidade;
- 7.4. Utilizar a metodologia estabelecida em estudos de cinética de agregação.
- 7.5. Determinar o diâmetro de partículas de proteínas tipo eritrocrurina, a partir de medidas de coeficiente de sedimentação;
- 7.6. Relacionar o mecanismo de formação de estruturas dissipativas encontrado, com os problemas básicos de morfogênese e de biogênese.

8. REFERÊNCIAS

1. PRICE, C.A.. Centrifugation in Density Gradients. New York, Academic Press, 1982, Cap. 1, 3, 4, p. 1-11, 32-78, 79-113.
2. ALBERTSSON, P.A.. Partition of Cell Particles and Macromolecules. New York, Wiley, 2<sup>nd</sup> ed., 1972.
3. GALEMBECK, F. and COSTA, M.C.P.. The osmosedimentation effect: its application to chemical and biochemical separation. Brazilian J. Med. Biol. Res. 20, 297 (1987).
4. ALLEN, T.. Particle Size Measurements, 3<sup>rd</sup> ed., London, Chapman and Hall Ltd., 1981, Cap. 4, p. 103-162.
5. BRADFORD, E.B., VANDERHOFF, J.W. and ALFREY Jr., T.. The use of monodisperse latexes in an electron microscope investigation of the mechanism of emulsion polymerization. J. Colloid Interface Sci. 11, 135 (1956).
6. MACLAY, W.N. and GINDLER, G.M.. Latex particle size determination by electron microscope techniques. J. Colloid Sci. 18, 343 (1963).
7. COOKE, D.D. and KERKER, M.. Particle size distribution of colloidal suspensions by light scattering based upon single particle counts-polystyrene latex. J. Colloid Interface Sci. 42, 150 (1973).
8. ZOLLARS, R.L.. Turbidimetric method for on-line determination of latex particle number and particle size distribution. J. Colloid Interface Sci. 74, 163 (1980).
9. GARCIA-RUBIO, L.H.. The effect of molecular size on the absorption spectra of macromolecules. Macromolecules 20,

3070 (1987).

10. DEVON, M.J. and RUDIN, A.. A simple technique for measuring the refractive index of polymer latexes at various wavelenghts. J. Appl. Polymer Sci. 34, 469 (1987).
11. JEFFREY, G.C. and OTTEWILL, R.H.. Reversible aggregation Part I. Reversible flocculation monitored by turbidity measurements. Colloid & Polymer Sci. 266, 173 (1988).
12. ROWELL, R.L., WALLACE, T.P. and KRATOHVIL, J.P.. Determination of the number concentration of polydisperse colloid spheres by light scattering. J. Colloid Interface Sci. 26, 494 (1968).
13. WALLACE, T.P., CEMBROLA, R.J., MIGLIORE, A.J. and De CANN, D. E.. Size distribution analysis of polymer latex systems via combination of light scattering and ultracentrifugation techniques. J. Colloid Interface Sci. 51, 283 (1975).
14. GEDAN, H., LICHTENFELD, H. and SOWNTAG, H.. Some comments on von Smoluchowski theory of rapid coagulation. Colloid & Polymer Sci. 260, 1151 (1982).
15. CUMMINS, P.G., STAPLES, E.J., THOMPSON, L.G., SMITH, A.L. and POPE, L.. Size distribution measurements of non-aggregating and aggregating dispersions using a modified flow ultramicroscope. J. Colloid Interface Sci. 92, 189 (1983).
16. BOWEN, M.S., BROIDE, M.L. and COHEN, R.J.. Temporal evolution of the cluster size distribution during brownian coagulation. J. Colloid Interface Sci. 105, 617 (1985).
17. BROIDE, M.L. and COHEN, R.J.. Cluster-size distribution

- during salt-induced coagulation of polystyrene microspheres. Materials Research Society Symposium on Fractal Aspects of Materials, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, December 2-5 (1985) p. 1-3.
18. CORNELL, R.M., GOODWIN, J.W. and OTTEWILL, R.H.. Direct microscopic studies of particle motion in stable dispersions and in flocules. J. Colloid Interface Sci. 71, 254 (1979).
19. REYNOLDS, P.A. and GOODWIN, J.W.. The aggregation of large polystyrene latex particles. Colloids Surfaces 23, 273 (1987).
20. LANGE, H.. Rapid density gradient centrifugation of dispersed particles. Colloid & Polymer Sci. 258, 1077 (1980).
21. MÄCHTLE, W.. Schnelle dynamische H<sub>2</sub>O/Percoll-dichtegradienten für mikropartikel in der analytischen ultrazentrifuge. Colloid & Polymer Sci. 262, 270 (1984).
22. BOVEY, F.A., KOLTHOFF, I.M., MEDALIA, A.I. and MEEHAN (Eds). In: Emulsion Polymerization, Vol. IX, High Polymer Series, New York, Interscience Publishers Inc., 1955, p.290.
23. SONG, H.H. and ROE, R.J.. Structural change accompanying volume change in amorphous polystyrene as studied by small and intermediate angle X-ray scattering. Macromolecules 20, 2723 (1987).
24. WALES, M. . Particle size distribution in rubber latex. J.Phys. Chem 66, 1768 (1962).

25. KIRKLAND, J.J., REMENTER, S.W. and YAU, W.W.. Time-delayed exponential field-programmed sedimentation field flow fractionation for particle-size-distribution analyses. Anal. Chem. 53, 1730 (1981).
26. McCANN, G.D., VANDERHOFF, J.W., STRICKLER, A. and SACKS, T.I., in Separation and Purification Methods, Perry, E.S., van OSS, C.J. and Gushka, E. (Eds.) 1947, p. 153.
27. BILLMEYER, Jr.. Textbook of Polymer Science, Singapore, Wiley-Interscience, 1984, Cap. 8.
28. JELINEK, Z.. Particle Size Analysis, New York, Halsted Press, 1974.
29. VAN DE HULST, H.C.. Light Scattering by Small Particles, New York, Wiley, 1957.
30. KERKER, M.. The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation, New York, Academic, 1969.
31. BOHREN, C.F., HUFFMAN, D.R.. Absorption and Scattering of Light by Small Particles, New York, Wiley, 1983.
32. CHEESEMAN, G.C.N.. Proc. Conf. Particle Size Analysis, Groves, M.J. (Ed.), Chem. Soc. Analyst. Div. (1978), Heyden, 1977.
33. ESPENSCHIED, W.F., KERKER, M. and MATIJEVIC, E.. Logarithmic distribution function for colloidal particles. J. Phys Chem, 68, 3093 (1964).
34. KERKER, M., MATIJEVIC, E., ESPENSCHIED, W.F., FARONE, W.A. and KITANI, S.. J. Colloid Sci. 19, 213 (1964).

35. MARTIN, R.G. and AMES, B.N.. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. J. Biol. Chem. 236, 1371 (1961).
36. STUDIER, F.W.. Sedimentation studies of the size and shape of DNA. J. Mol. Biol. 11, 373 (1965).
37. GOREZYNSKI, R.M., MILLER, R.G. and PHILLIPS, R.A.. Homogeneity of antibody-producing cells as analysed by their buoyant density in gradients of Ficoll. Immunology 19, 817 (1970).
38. DIGMAN, C.W.. A convenient program for the rapid calculation of sedimentation coefficients in linear salt or sucrose gradients. Anal. Biochem. 49, 124 (1972).
39. YOUNG, B.D. and KRUMLAUF, R.. A computer program for the calculation of sedimentation coefficients and molecular weights of nucleic acids. Anal. Biochem. 115, 97 (1980).
40. HIRST, W. and COX, R.A.. A method for predicting the location of particles sedimenting in sucrose gradients. Anal. Biochem. 131, 51 (1983).
41. LUNDH, S.. A new approach to analytical density gradient equilibrium centrifugation. Simultaneous determination of molecular weight, specific volume, and preferential hydration of human transferrin. J. Polymer Sci. 15, 733 (1977).
42. RENDON, J.L. and CALCAGNO, M.. A new plot to estimate protein molecular weight by density gradient ultracentrifugation. Experientia 41, 382 (1985).
43. MESSELSOHN, M., STAHL, F.W. and VINOGRAD, J.. Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 43, 581 (1957).
44. ENDE, H.A. and STANNETT, V.. Density gradient centrifugation of a graft copolymer. J. Polymer Sci. 2, 4047 (1964).
45. ENDE, H.A. and HERMANS, J.J.. Analysis of copolymers by means of density gradient centrifugation. II. Comparison with kinetic requirements. J. Polymer Sci. 2, 4053 (1964).
46. NAKAZAWA, A. and HERMANS, J.J.. Study of compositional distribution in a styrene-methyl acrylate copolymer by means of density-gradient centrifugation. J. Polymer Sci. 9, 1871 (1974).
47. STACY, C.J.. Determination of compositional heterogeneity in butadiene-styrene copolymers by density gradient ultracentrifugation. J. Appl. Polymer Sci. 21, 2231 (1977).
48. PEARSON, R.W. and TRUOG, E.. Further results on the mineralogical subdivision of soil separates by means of heavy liquid specific gravity separation. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 3, 20 (1938).
49. LOW, B.W. and RICHARDS, F.M.. The use of the gradient tube for the determination of crystal densities. J. Amer. Chem. Soc. 74, 1660 (1952).
50. BEAVERS, A.H.. Use of density gradients for size distribution analysis. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 22, 12 (1958).
51. BEAVERS, A.H.. Preparation of sensitive linear density gradients. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 25, 357 (1961).
52. WOOLSON, E.A. and AXLEY, J.H.. Clay separation and identification by a density gradient procedure. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 33, 46 (1969).
53. FRANCIS, C.W., TAMURA, T., BONNER, W.P. and AMBURGEY Jr., J.

- W.. Separation of clay minerals and soil clays using isopycnic zonal centrifugation. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 34, 351 (1970).
54. NUNES, A.P. and GALEMBECK, F.. Percoll and Ficoll self-generated density gradients by low-speed osmocentrifugation. Anal. Biochem. 14, 48 (1985).
55. WINKLER-H., A.A.. Obtenção e uso de gradientes de densidade: fracionamento e caracterização de látexes poliméricos. Tese de Doutorado. Campinas, 1987. 126 p.
56. GALEMBECK, F., ROBILOTTA, P.R., PINHEIRO, E.A., JOEKES, I. and BERNARDES, N.. Rapid sedimentation under gravity. Basic theory and experimental demonstrations. J. Phys. Chem. 84, 112 (1980).
57. GALEMBECK, F. and PIRES, A.T.N.. Osmosedimentation methods: preparative and analytical applications. Sep. Purif. Methods 15, 97 (1986).
58. NUNES, S.P., WINKLER-H., A.A. and GALEMBECK, F.. A new centrifugal ultrafiltration device. Sep. Sci. Tech. 21, 823 (1986).
59. VAN HOLDE, K.E.. Bioquímica Física. São Paulo, Editora Edgard Blücher, 1975, Cap. 4, 5, p. 59-73, 74-92.
60. SVEDBERG, T. and PEDERSON, K.O.. The ultracentrifuge. Oxford, Clarendon Press, 1940, 479 p.
61. BISHOP, B.S.. Digital computation of sedimentation coefficients in zonal centrifuges. Nat. Cancer Inst. Monogr. 21, 175 (1966).
62. BONT, W.S., BOOM, J., HOFES, H.P. and DE URIES, M.. Sedimentation analysis of latex spheres and gold sols. Colloid &

- Polymer Sci. 257, 656 (1979).
63. SHAW, D.J.. Introdução a Química dos Colóides e de Superfícies. S. Paulo, Editora Edgard Blücher, 1975, Cap. 1, 15. p. 1-11, 158-168.
64. OTTEWILL, R.H.. In: Colloid Science, Vol. 1. London, The Chemical Society (Ed.), 1973, Cap. 5, p. 173-219.
65. Encyclopedia of Polymer Science of Technology. New York, Interscience Publishers, 1968, Vol. 8, p. 169.
66. HARKINS, W.D.. A General Theory of the Mechanism of Emulsion Polymerization. J. Amer. Chem. Soc. 69, 1428 (1947).
67. SMITH, W.V. and EWART, R.H.. Kinetics of Emulsion Polymerization. J. Chem. Phys. 16, 592 (1948).
68. ROE, C.P. and BRASS, P.D., J. Polym. Sci. 24, 401 (1957); HOFF, B.M.E. vand der, in Solvent Properties of Surfactant Solutions vol. II, K. Shinozaki (Ed), Marcel Dekker, New York, 1967, p. 285; ROE, C.P., Ind. Eng. Chem. 60, 20 (1968).
69. GOODWIN, J.W., OTTEWILL, R.H., PELTOW, R., VIANELLO, G. and YATES, D.E., Brit. Polymer J. 10, 173 (1978); FITCH, R.M. Polymer Colloids II, Plenum Press, New York, 1980.
70. a) DUNN, A.S., Chem Ind. 49, 1406 (1971).  
 b) HARKINS, W.D., in Physical Chemistry of Surface Films. Reinhold Publ. Corp., New York, 1952, p. 332.  
 c) KOTERA, A., FURUSAWA, K. and TAKEDA, Y., Kolloid-Z. Z. Polym. 239, 677 (1970).
71. BUSCALL, R. and OTTEWILL, R.H.. In: Polymer Colloids, R. Buscall, T. Corner and J.F. Stageman (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, London, 1985, chap. 5, p.

141-217.

72. NUNES, S.P. and GALEMBECK, F.. Preparation and characterization of cellulose acetate membranes for osmosedimentation. J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed. 21, 49 (1983).
73. NUNES, S.P., GALEMBECK, F. and BARELLI, N.. Cellulose acetate membranes for osmosedimentation: performance and morphological dependence on preparation conditions. Polymer 27, 937 (1986).
74. Privilégio de invenção.  
BRASIL. PI nº 016919. Processo de Fracionamento e Concentração de Proteínas e Aparelho Associado. 13 nov.1987.
75. GONÇALVES, M.C. and GALEMBECK, F.. Serum protein fractionation by membrane processes: centrifugal ultrafiltration, osmosedimentation and multistage ultrafiltration. Sep. Sci. Tech. (in press).
76. GALEMBECK, F., GONÇALVES, M.C., COSTA, M.C.P. and ERISMANN, N.M.. New membrane separation techniques: osmosedimentation, multistage ultrafiltration and pressurized pervaporation. Communication to 6º Simpósio Nipo-Brasileiro de Ciência e Tecnologia, Campinas, 1988.
77. WINKLER-H., A.A.. Osmocentrifugation in density gradients: application to polymer latex separation. J. Appl. Polym. Sci. 34, 853 (1987).
78. COSTA, M.C.P., WINKLER-H., A.A., NUNES, S.P. and GALEMBECK, F.. Osmosedimentation in density gradients. In: Synthetic Polymeric Membranes. B. Sedlacek and J. Kahovec (ed.), Walter de Gruyter, West Berlin, 1987, p. 581-588.

79. COSTA, M.C.P., WINKLER-H., A.A. and GALEMBECK, F.. Density gradient self-generation by osmocentrifugation application to the study of latex particles. Química Nova 11, 120 (1988).
80. ERNST, M.H.. In: Fractals in Physics, L. Pietroners and E. Tosatti (eds.), New York, Elsevier Science Publishers, 1985, Cap. 6.
81. BALAZS, A.C., ANDERSON, C. and MUTHUKUMAR, M.. A computer simulation for the aggregation of associating polymers. Macromolecules 20, 1999 (1987).
82. von SCHULTHESS, G.K., BENEDEK, G.B. and DE BLOIS, R.W.. Experimental measurements of the temporal evolution of cluster size distributions for high-functionality antigens cross-linked by antibody. Macromolecules 16, 434 (1983).
83. BUSCALL, R., GOODWIN, J.W. and OTTEWILL, R.H. and TADROS, Th. F.. The settling of particle through newtonian and non-newtonian media. J. Colloid Interface Sci. 85, 78 (1982).
84. DERJAGUIN, B.V. and LANDAU, L.. Acta Phys. Chim. URSS 14, 633 (1941).
85. VERWEY, E.J.W. and OVERBEEK, J.Th. G.. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids, Amsterdam, Elsevier, 1948.
86. von SMOLUCHOWAKI, M.. Z. Phys. Chem. 92, 129 (1917).
87. CANN, J.R. and GOAD, W.B.. Bimodal sedimenting zones due to ligand-mediated intercatations. Science 170, 441 (1970).
88. COSTA, M.C.P.. Polystyrene latex fractionation and particle-size determination: the use of density gradients in a

- low-speed centrifuge. Colloids and Surfaces 33, 175 (1988).
89. VINOGRADOV, S.N.. The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocrucorins and chlorocrucorins). Comp. Biochem. Physiol. 82B, 1 (1985).
90. MEIRELLES, N.C., OLIVEIRA, B., PAULA, E., MARANGONI, S. and MARQUES, M.R.F.. Erythrocrucorin of Glossoscolex paulistus (oligochaeta, glossoscolencidae): presence of disulfide bonds and their relation to ligand properties. Comp. Biochem. Physiol. 82B, 203 (1985).
91. CHUNG, M.C.M. and ELLENTON, H.D.. The physico-chemical and functional properties of extracellular respiratory haemoglobins and chlorocrucorins. Prog. Biophys. Molec. Biol. 35, 53 (1979).
92. PRETLOW, T.G., BOONE, C.W., SHRAGER, R.I. and WEISS, G.H.. Rate zonal centrifugation in a Ficoll gradient. Anal. Biochem. 29, 230 (1969).
93. BELL, L.R. and HSU, H.W.. Transport phenomena in zonal centrifuge rotors. IX. Gradient properties of Ficoll and methyl cellulose. Sep. Sci. 9, 401 (1974).
94. WOOD, E.J., MOSBY, L.J. and ROBINSON, M.S.. Characterization of the extracellular haemoglobin of Haemopsis sanguisuga (L.). Biochem. J. 153, 589 (1976).
95. VINOGRAD, J. and BRUNER, R.. Band centrifugation of macromolecules in self-generating density gradients. II. Sedimentation and diffusion of macromolecules in bands. Biopolymers 4, 131 (1966).
96. SARTORY, W.K., Instability in diffusing fluid layers. Biopolymers 7, 251 (1969).

97. SPRAGG, S.P., MORROD, R.S. and RANKIN Jr., C.T.. The optimization of density gradients for zonal centrifugation. Sep. Sci. 4, 467 (1969).
98. HSU, H.W.. Transport phenomena in zonal centrifuge rotors: X. Optimal gradient solution for velocity sedimentation. Mathematical Biosci. 23, 179 (1975).
99. VINK, H.. Boundary spreading in velocity sedimentation in the ultracentrifuge. J. Colloid Interface Sci. 116, 17 (1987).
100. MEUWISSEN, J.A.T.P.. Hydrodynamic instability: An explanation of anomalous zone spreading in density gradient methodology. Spectra 2000 4, 21 (1973).
101. PRICE, C.A.. Equivolumetric gradients: Apparent limits on resolution and capacity imposed by gradient-induced zone narrowing. Spectra 2000 4, 71 (1973).
102. BONAFÉ, C.F.S.. Estudos bioquímicos e físicos de hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta). Tese de Mestrado. Campinas, 1988, p. 62.
103. COSTA, M.C.P., BONAFÉ, C.F.S., MEIRELLES, N.C. & GALEMBECK, F.. Sedimentation coefficient and minimum molecular weight of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta). Brasilian J. Med. Biol. Res. 21, 115 (1988).
104. PILZ, I., SCHWARZ, E. & VINOGRADOV, S.N.. Small-angle-X-ray studies of *Lumbricus terrestris* haemoglobin. Int. J. Macromol. 2, 279 (1980).
105. MESSERSCHNIDT, V., WILHELM, P., PILZ, I., KAPP, O.H. & VINOGRADOV, S.N.. The molecular size and shape of the

- extracellular hemoglobin of Nephtys incisa. Biochim. Biophys. Acta 744, 366 (1983).
106. WEBER, R.E. & OLSEN, L.F.. Does macromolecular surface pH explain the cation dependence of erythrocyte oxygen affinity? Mol. Physiol. 6, 1 (1984).
107. TERWILLIGER, R., TERWILLIGER, N., BONAVENTURA, C., BONAVENTURA, J. & SCHABTACH, E.. Structural and functional properties of hemoglobin from the vestimentiferan Pogonophora, Lamellibrachia. Biochim. Biophys. Acta 829, 27 (1985).
108. VOLKENSHTEIN, M.V.. Biophysics, Moscow, Mir Publishers, 1983, Cap. 9, p. 313-345.
109. NICOLIS, G. and LEFEVER, R. (Eds.), Membrane, dissipative structure and evolution, Adv. Chem. Phys. 29, 1 (1975).
110. WILSON, H.R. and COWAN, J.D.. Biophys. J. 12, 1 (1972).
111. DENEUBOURG, J.L.. In: Insectes Sociaux. H. Montagnier (Ed.), Paris, Masson 23, 329 (1976).
112. PRIGOGINE, I. and RICE, S.A. (Eds.). Instability and dissipative structures in hydrodynamics. Advan. Chem. Phys. 32 (1975).
113. SCHECHTER, R.S., VELAZQUEZ, M.G. and PLATTEN, J.K.. Adv. Chem. Phys. Vol. XXVI, 265 (1975).
114. BÉNARD, H.. Rev. Gen. Sci. Pures Appl. 11, 1261 (1900); Ann. Chim. Phys. 23, 62 (1901).
115. BÉNARD, H.. C.R. Acad. Sci. (Paris) 185, 1109 (1927); Bull. Soc. Fr. Phys. 1125 (1928); Proc. 3rd Int. Congr. Appl. Mech. 1, 120 (1930).
116. NORMAND, C., POMEAU, Y. and VELAZQUEZ, M.G.. Convective

- instability: A physicist's approach. Rev. Mod. Phys. 49, 581 (1977).
117. VELAVERDE, M.G. and NORMAND, C.. Convection. Scientific Amer. 243, 92 (1980).
118. JORNE, J.. Electrochimica Acta 28, 1713 (1983).
119. TESCHKE, O., GALEMBECK, F., and TENAM, M.A. Oscillating behavior of the iron anodes: Effect of electrode wetting. Langmuir , 3. 400 (1987).
120. GLANDORFF, P. and PRIGOGINE, I.. Thermodynamic Theory of Structure Stability and Fluctuations, London, Wiley-Interscience, 2<sup>nd</sup> ed., 1974, 306 p.
121. PRIGOGINE, I.. Time, structure and fluctuation. Science 201, 777 (1978).
122. PRIGOGINE, I. and STENGERS, I.. Order out of Chaos, London, Fontana Paperbacks, 1986, 349 p.
123. PRIGOGINE, I. and STENGERS, I.. A Nova Aliança: A Metamorfose da Ciência. Brasília Editora Universidade de Brasília, 1984, Cap. VI, p. 129-148.
124. PRIGOGINE, I.. Introduction to Thermodynamics of Irreversible Processes, New York, Thomas, 1955.
125. DEFAY, R., PRIGOGINE, I. and SANFELD, A.. Surface Thermodynamics. J. Colloid Interface Sci. 58, 498 (1977).
126. BELOUSOV, B.P.. Sborn referat. radiat. meditsinza (1958).
127. ZHABOTINSKY, A.M.. Biofizika 2, 306 (1964); Oscillations in Biological and Chemical Systems, Moscow, Acad. Sic. USSR. (Nanka) (1967); Russ. J. Phys. Chem. 42, 1649 (1968); Concentrational Auto-oscillations, Moscow, Nanka (1974).
128. TURING, A.M.. The chemical basis of morphogenesis. Phil.Trans. Royal Soc. of London 237, 37 (1952).