

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS



**OBTENÇÃO DE MICROESFERAS DE POLIESTIRENO
FLUORESCENTES E MAGNÉTICAS**

Tese de Doutorado

Paula Poli Soares

Orientador: Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold.

Corientador: Prof^a. Dr^a Leandra Franciscato Campo.

Porto Alegre, 30 de Setembro de 2016.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**OBTENÇÃO DE MICROESFERAS DE POLIESTIRENO
FLUORESCENTES E MAGNÉTICAS**

Paula Poli Soares

Tese de Doutorado realizada sob orientação do Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold e coorientação Prof^a. Dr^a. Leandra Franciscato Campo em Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Materiais.

Porto Alegre, 30 de Setembro de 2016.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marly Antônia Maldaner Jacobi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Rosane Ângela Ligabue
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. João Edgar Schmidt
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cyro Ketzer Saul
Universidade Federal do Paraná

RESUMO

Neste trabalho realizou-se a obtenção e caracterização de microesferas poliméricas fluorescentes e magnéticas a partir do método de emulsificação/evaporação do solvente e por métodos de polimerização *in situ* em sistemas de emulsão e miniemulsão, via técnica radicalar convencional e radicalar por transferência de átomo (ATRP). As microesferas de poliestireno de tamanho homogêneo podem atuar como suporte sólido para a captura de diferentes moléculas-alvo sejam elas anticorpos, antígenos, peptídeos ou ácidos nucleicos, em sistemas de diagnóstico. No entanto precisam ser identificadas pela adição de fluoróforos permitindo a criação de códigos de cor únicos e específicos para detecção de diferentes tipos de doenças. Os fluoróforos usados para a indexação das microesferas foram cianina e esquaraínas.

A polimerização pela técnica ATRP foi escolhida com o objetivo de sintetizar microesferas de poliestireno contendo os fluoróforos ligados covalentemente a matriz polimérica, partindo de um iniciador fluorescente. O polímero obtido apresentou banda de absorção em 635 nm, indicando a fluorescência do mesmo.

Também foram investigadas as melhores rotas no método de coprecipitação magnética na preparação de nanopartículas de ferro para incorporação nas microesferas de poliestireno, a fim de deixá-las com um comportamento superparamagnético apropriado para a aplicação para ensaios de imunodiagnóstico.

O método mais eficiente foi o de emulsificação/evaporação do solvente com microesferas de formato esférico e com tamanho homogêneo apresentando uma incorporação de 92 % de fluoróforo (Esquaraína) na matriz polimérica.

ABSTRACT

In this it is show the synthesis of fluorescent and magnetic polymeric micro-spheres by using the emulsification/evaporation of the solvent method, and also by the in situ radical polymerization, both conventional and atom transfer radical polymerization (ATRP), in emulsion and mini-emulsion systems. Polystyrene micro-spheres of homogeneous size can act as a solid support for capturing different target molecules, be they antibodies, antigens, peptides or nucleic acids, in diagnose systems. These micro-spheres, however, need to be identified by the addition of fluorophores, allowing the creation of unique color codes, specific for the detection of different types of diseases. The fluorophore used for the indexation of the micro-spheres were Cyanines e Squaraines dyes.

The ATRP polymerization was chosen in order to synthesize polystyrene micro-spheres containing fluorophore covalently bonded to the polymeric matrix trough a fluorescent initiator. The polymer obtained presented an absorption band in 635 nm, indicating fluorescence.

We also investigated the best routes for the preparation of the magnetic iron nanoparticles for incorporation in the polystyrene micro-spheres, so that they had the appropriate superparamagnetic behavior for application in imunodiagnostic essays.

The most efficient method was the emulsification/evaporation of the solvent with micro-spheres of spheric shape and homogeneous size presenting 92% of incorporation of fluorophore (Squaraines) in the polymeric matrix.

TRABALHOS GERADOS A PARTIR DA TESE.

Artigos completos publicados em periódicos:

Soares, P.P., Barcellos, G.S., Petzhold, C.L., Lavayen, V.
“Iron Oxide Nanoparticles Modified with Oleic Acid: Vibrational and Phase Determination”
Journal of Physics and Chemistry of Solids

Foti, L., Sionek, A., Stori, E. M., **Soares, P. P.**, Pereira, M.M., Krieger, M. A., Petzhold, C. L., Schreiner, W. H., Soares, M. J., Goldenberg, S., Saul, C. K.,
“Electrospray induced surface activation of polystyrene microbeads for diagnostic applications”. *J. Mater. Chem. B*, v.3, p.2725 - 2731, 2015.

Patente

Saul, C. K., Petzhold, C.L., Stori, E. M., **Soares, P. P.**, Foti, L., Schreiner, W. H., Sionek, A., Krieger, M. A.
“Process for producing polymeric structures that have activated surfaces and activated polymeric structures.”, 2014
Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: European Patent Office. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: PCT/BR2012000386. Data de depósito: 17/06/2014.

Seleção

Missão de Curta Duração - 2012 - Selecionada no EDITAL 001/2012 do Programa de Pós-Graduação da UFRGS - *Max Planck Institute for Polymer Research* . Ackermannweg 10 - 55128 Mainz.

Congressos

Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials,
“Iron Oxide Nanorods: An electron transmission and infrared spectroscopy comparative study.” Espanha, 2015.

International Conference on Nanoscience & Technology, 2012. (Congresso/França)
Preparation of cyanine-stained polystyrene based microbeads for fluorescent sensing and encoding. França, 2012.

3rd International Conference on Multifunctional, Hybrid & Nanomaterials.
“Functional polystyrene beads stained with new carboxylated squaraine dyes for fluorescent sensing.” Itália, 2013.

ÍNDICE GERAL

| | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE GERAL | vii |
| LISTA DE TABELAS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xiii |
| RESUMO | xv |
| ABSTRACT | xvi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVO | 5 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 3.1. Esferas Poliméricas de Poliestireno | 6 |
| 3.2. Microesferas Poliméricas Fluorescentes..... | 8 |
| 3.2.1 Tipo de Fluoróforos | 11 |
| 3.3. Método de Emulsificação/Evaporação do Solvente..... | 15 |
| 3.4. Polimerização em Emulsão..... | 19 |
| 3.5. Polimerização em Miniemulsão..... | 22 |
| 3.6. Polimerização Radicalar por Transferência de Átomo (ATRP)..... | 27 |
| 3.7. Partículas Magnéticas de Ferro..... | 32 |
| 3.7.1 Comportamento Magnético | 35 |
| 3.7.2 Superparamagnetismo..... | 38 |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL | 43 |
| 4.1 MATERIAIS..... | 43 |
| 4.2 MÉTODOS..... | 44 |
| 4.2.1 Quantificação, preparo das soluções e construção das curvas de calibração..... | 44 |
| 4.2.2 Método de Emulsificação Evaporação do Solvente | 44 |
| 4.2.3 Polimerização do Estireno em Miniemulsão | 45 |
| 4.2.4 Polimerização do Estireno com Iniciador Fluorescente via ATRP..... | 46 |
| 4.2.5 Síntese das Nanopartículas Magnéticas de Ferro (NPM) | 47 |
| 4.2.5.1 Ensaio 1 – NPM1..... | 47 |
| 4.2.5.2 Ensaio 2 – NPM2 | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.5.3 Ensaio 3 – NPM3..... | 49 |
| 4.2.6 Microesferas Fluorescentes e Magnéticas | 50 |
| 4.2.6.1 Obtenção de microesferas magnéticas de poliestireno e microesferas magnéticas e fluorescentes de poliestireno pelo método de emulsificação/evaporação de solvente..... | 50 |
| 4.2.6.2 Microesferas magnéticas de poliestireno..... | 50 |
| 4.2.6.3 Microesferas fluorescentes e magnéticas de poliestireno..... | 50 |
| 4.2.7 Microesferas magnéticas de poliestireno e microesferas magnéticas e fluorescentes de poliestireno pela polimerização em miniemulsão..... | 51 |
| 4.2.7.1 Miniemulsão magnética..... | 51 |
| 4.2.7.2 Miniemulsão magnética e fluorescente..... | 51 |
| 4.2.8 Microesferas de poliestireno magnéticas pelo processo de polimerização em emulsão..... | 52 |
| 4.2.8.1 Emulsão do tipo água em óleo (A/O) | 52 |
| 4.2.8.2 Emulsão do tipo óleo em água (O/A) | 53 |
| 4.2.9 Panorama geral dos métodos para a obtenção das microesferas..... | 53 |
| 4.3. MÉTODOS DE ANÁLISE | 54 |
| 4.3.1 MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) | 54 |
| 4.3.2 MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) | 54 |
| 4.3.3 DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico) | 55 |
| 4.3.4 TGA (Termogravimetria) | 55 |
| 4.3.5 CF (Microscopia Confocal) | 56 |
| 4.3.6 Espectroscopia de UV/Vis | 56 |
| 4.3.7 DRX (Difração de Raios-X) | 56 |
| 4.3.8 Curvas de magnetização – Histerese | 56 |
| 4.3.9 GPC (Cromatografia por exclusão de tamanho) | 57 |
| 4.3.10 Espectroscopia Raman | 57 |
| 5. RESULTADOS | 58 |
| 5.1. Microesferas de Poliestireno..... | 58 |
| 5.1.1 Método de Emulsificação/Evaporação do Solvente..... | 58 |
| 5.1.2 Microesferas fluorescentes de poliestireno pelo método de emulsificação/evaporação de solvente. | 62 |

| | |
|--|------------|
| 5.1.3 Percentual de incorporação dos fluoróforos nas microesferas de poliestireno. | 69 |
| 5.2. Polimerização em Miniemulsão. | 70 |
| 5.3. Síntese do Poliestireno fluorescente via ATRP..... | 74 |
| 5.4 Síntese e modificação das partículas magnéticas de ferro com ácido oléico... | 78 |
| 5.4.1 Modificação de partículas magnéticas com ácido oleico – NPMm..... | 79 |
| 5.5 Preparação de microesferas de poliestireno magnetizadas através da polimerização em emulsão..... | 89 |
| 5.5.1 Emulsões do tipo Água/Óleo | 89 |
| 5.5.2 Emulsões do tipo Óleo/Água..... | 90 |
| 5.6 Obtenção de nanoesferas magnéticas e fluorescentes de poliestireno por polimerização em miniemulsão..... | 94 |
| 5.7 Obtenção de microesferas magnéticas e fluorescentes de poliestireno pelo método de emulsificação/evaporação do solvente (EEV)..... | 98 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 104 |
| 7. REFERÊNCIAS | 106 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1. Diferentes estabilizadores na produção de nanoesferas..... | 18 |
| Tabela 2. Polímeros usados na produção de microesferas | 22 |
| Tabela 3. Tipos de iniciadores fluorescentes..... | 47 |
| Tabela 4. Ensaio realizado para a obtenção das nanopartículas magnéticas..... | 49 |
| Tabela 5. Parâmetros utilizados para a obtenção de microesferas de poliestireno pelo método de emulsificação/evaporação de solvente..... | 58 |
| Tabela 6. Dados fotofísicos dos fluoróforos 1-3, dissolvidos em clorofórmio e em suspensão aquosa contendo microesferas de poliestireno (λ_{abs} = comprimento de onda de absorção e λ_{em} = comprimento de onda de emissão)..... | 69 |
| Tabela 7. Reações com iniciadores fluorescentes (IF)..... | 75 |
| Tabela 8. Propriedades fotofísicas em $CHCl_3$ do IF_1 e do polímero fluorescente (entrada 3) | 77 |
| Tabela 9. Diâmetro de partícula a partir da equação de <i>Debye-Scherrer</i> | 82 |
| Tabela 10. Percentual das fases em cada amostra..... | 83 |
| Tabela 11. Tabela dos dados de temperatura máxima e resíduos de TGA..... | 85 |
| Tabela 12. Valores de magnetização de saturação (M_s), magnetização de remanência (M_r) e campo coersivo (H_c) das amostras..... | 88 |
| Tabela 13. Formulações das emulsões do tipo A/O..... | 90 |
| Tabela 14. Formulações das emulsões do tipo O/A..... | 91 |
| Tabela 15. Diâmetro médio das microesferas obtidas por espalhamento de luz.... | 93 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Princípio de funcionamento do Luminex®: (A) feixes de luz laser passando pela placa contendo as amostras (B) e excitação pela luz do laser vermelho dos fluoróforos contidos nas microesferas de poliestireno (C) conjugadas com a biomolécula de interesse..... | 3 |
| Figura 2. Representação esquemática de várias técnicas de preparação de nano e microesferas poliméricas..... | 6 |
| Figura 3. Representação da diferença entre microcápsulas microesferas..... | 7 |
| Figura 4. A) Representação esquemática da ligação de moléculas biológicas nas microesferas de poliestireno fluorescentes. (B) As microesferas entram pela <i>sonda de amostra</i> na máquina, onde passam por dois lasers. Um laser vermelho que detecta e identifica as microesferas e um laser verde que quantifica os números de cada microesfera. (baseado em ilustrações desenvolvidas por Luminex Corp)..... | 8 |
| Figura 5. Esquema das etapas de acoplamento químico de proteína às microesferas de poliestireno. 1) Microesfera modificada com o grupo carboxila; 2) Carbodiimina; 3) Formação do intermediário (o-acilisourea); 4) Microesfera ligada covalentemente a um aminoácido por uma ligação amida..... | 9 |
| Figura 6. Esquema de imobilização da proteína em: A esfera NTA-Ni, B esfera Penta His, C esfera ativada e D esfera carboxilada..... | 10 |
| Figura 7. Ilustração dos efeitos no espectro de absorção..... | 12 |
| Figura 8. Fluoróforo com emissão de fluorescência no infravermelho, estrutura geral das cianinas..... | 13 |
| Figura 9. Fluoróforo com emissão de fluorescência no vermelho, estrutura geral de uma esquaraína..... | 13 |
| Figura 10. Estrutura da Rodamina B usada na obtenção de microesferas..... | 14 |
| Figura 11. Esquema da porfirina funcionalizada para atuar como iniciador fluorescente..... | 15 |
| Figura 12. Diferentes tipos de emulsões em um sistema água e óleo..... | 15 |
| Figura 13. Esquema representativo das etapas de iniciação, propagação e terminação da polimerização em emulsão..... | 21 |
| Figura 14. Esquema do princípio da polimerização em miniemulsão..... | 23 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Esquema dos mecanismos de degradação das miniemulsões..... | 25 |
| Figura 16: Alguns exemplos de iniciadores radiculares para reações ATRP..... | 28 |
| Figura 17: Esquema do mecanismo via ATRP. X e Y são átomos de halogênio. R é um radical orgânico. k_{ativ} . Constante de ativação. $k_{desativ}$. Constante de desativação. k_p constante de polimerização. k_t constante de terminação..... | 29 |
| Figura 18. Aminas alifáticas tridentadas..... | 29 |
| Figura 19. Alguns exemplos de arranjos possíveis de obtenção através das técnicas de polimerização controlada..... | 30 |
| Figura 20. Polimerização do estireno usando porfirina funcionalizada como iniciador via ATRP..... | 31 |
| Figura 21. Esquema da síntese do iniciador e do polímero..... | 32 |
| Figura 22. Esquema ilustrativo microesfera magnetizada e a sua separação por magnetização..... | 33 |
| Figura 23. Representação da estabilização das partículas de magnetita pela interação da extremidade polar das moléculas de ácido oleico com a superfície do óxido..... | 35 |
| Figura 24. Diferentes tipos de comportamento magnético..... | 37 |
| Figura 25. Curva de histerese de materiais magnéticos, em que M é a magnetização, H é o campo magnético aplicado, M_s é a magnetização de saturação, H_c é a força coerciva. No superparamagnetismo a magnetização se saturação (M_s) é muito elevada, então não há remanência ($M_r=0$)..... | 37 |
| Figura 26. Microscopia de TEM (A) PS/AA-NPM e (B) PS/DVB/AA-NPM..... | 39 |
| Figura 27. Esquema da preparação de nanopartículas fluorescente e magnéticas..... | 42 |
| Figura 28. Estruturas do fluoróforo (cianina 1) e dos fluoróforos (esquaraína) 2 - 3 utilizadas na obtenção das microesferas fluorescentes de poliestireno..... | 43 |
| Figura 29. Procedimento para a obtenção de microesferas de poliestireno pelo método de emulsificação/evaporação do solvente..... | 45 |
| Figura 30. Estruturas dos iniciadores fluorescentes (IF) de Esquaraínas..... | 46 |
| Figura 31. Fotografias da NPM (A) logo após a adição de base (B) coloração final..... | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 32. Fotografias da decantação magnética..... | 48 |
| Figura 33. Esquema dos métodos utilizados para a obtenção de microesferas de poliestireno, fluorescentes e magnéticas. | 53 |
| Figura 34. (A) Imagens de MEV das microesferas obtidas nas diferentes condições apresentadas na Tabela 5. (B) Histogramas obtidos a partir das imagens de MEV..... | 59 |
| Figura 35. Imagens de MEV (aumento de x1000 e 10kV) 1A (taxa 5 mL.min ⁻¹) e 1B (taxa de 10 mL.min ⁻¹) e seus respectivos histogramas..... | 61 |
| Figura 36. Imagens de MEV: (A) gotejamento emerso à solução e (B) gotejamento imerso à solução..... | 62 |
| Figura 37. Estruturas dos fluoróforos e imagens de MEV das microesferas contendo o fluoróforo 1,2 e 3 respectivamente..... | 63 |
| Figura 38. Micrografias confocal das microesferas de PS sem fluoróforo (B), e com os fluoróforos <u>1</u> , <u>2</u> e <u>3</u> (aumento de 60 x)..... | 64 |
| Figura 39. Micrografias confocal das microesferas contendo o fluoróforo <u>2</u> em diferentes planos focais: cortes do topo para baixo..... | 64 |
| Figura 40. Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência do a) fluoróforo <u>1</u> em clorofórmio [10 ⁻⁵ M] ¹⁵ e b) das microesferas em suspensão aquosa contendo o fluoróforo <u>1</u> | 66 |
| Figura 41. Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência do a) fluoróforo <u>2</u> em clorofórmio [10 ⁻⁵ M] ¹⁶ e b) das microesferas em suspensão aquosa contendo o fluoróforo <u>2</u> | 67 |
| Figura 42. Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência do a) fluoróforo <u>3</u> em clorofórmio [10 ⁻⁵ M] ¹⁶ e b) das microesferas em suspensão aquosa contendo o fluoróforo <u>3</u> | 68 |
| Figura 43. Imagem do fluoróforo <u>3</u> e da coloração da miniemulsão antes e depois da reação..... | 70 |
| Figura 44. Imagens: (A) AIBN/fluoróforo <u>3</u> em 1h e (B) AIBN/fluoróforo <u>3</u> em 8 h..... | 71 |
| Figura 45. Espectro de excitação (preto) e emissão (vermelho) de fluorescência da reação modelo em CHCl ₃ depois de 8h..... | 71 |

| | |
|--|----|
| Figura 46. (A) Imagem obtidas por MEV (aumento de 500x) e (B) confocal das nanoesferas fluorescentes (aumento de 30 x) obtidas via polimerização do estireno em miniemulsão contendo o fluoróforo 3 | 72 |
| Figura 47. Espectro de absorção na região do UV-Vis em clorofórmio das nanoesferas de PS coradas com o fluoróforo 3 obtidas pelo método miniemulsão ($\lambda_{\text{máx}}= 639\text{nm}$)..... | 73 |
| Figura 48. Polimerização ATRP do estireno empregando diferentes iniciadores fluorescentes..... | 74 |
| Figura 49. Polímero (entrada 3) obtidos a partir do IF 1 via ATRP..... | 76 |
| Figura 50. Espectros de absorção na região do UV-Vis em CHCl_3 do polímero (entradas 3) obtidos via polimerização ATRP..... | 77 |
| Figura 51. Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência: a) IF_1 Puro em CHCl_3 e b) Polímero em CHCl_3 (Entrada 3 da Tabela 7)..... | 78 |
| Figura 52. NPM1(A) e a resposta magnética (B) em tolueno com campo externo..... | 79 |
| Figura 53. Espectro de FTIR NPM de (A) nanopartículas magnéticas e (B) NPMm3 nanopartículas magnéticas modificadas com ácido oleico..... | 80 |
| Figura 54. Espectros de FTIR da região de $900\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ das nanopartículas magnéticas..... | 81 |
| Figura 55. Padrão de DRX das nanopartículas magnéticas..... | 81 |
| Figura 56. Imagens de microscopia eletrônica de varredura: A) NPMm1, B) NPMm2 e C) NPMm3..... | 83 |
| Figura 57. Imagem de TEM das nanopartículas de ferro NPMm3 (A). Padrão de Difração de elétrons da nanopartícula NPMm3 (B). | 84 |
| Figura 58. Termogramas AO e as NPM, NPMm1, NPMm2 e NPMm3..... | 85 |
| Figura 59. Espectros de Raman obtidos das nanopartículas na faixa de $200\text{ a }850\text{ cm}^{-1}$ | 86 |
| Figura 60. Espectros de Raman obtidos das nanopartículas na faixa de $1000\text{ a }2000\text{ cm}^{-1}$ | 87 |

| | |
|---|-----|
| Figura 61. Curva de magnetização para as amostras de NPMm. Em destaque, ampliação da região central da curva..... | 88 |
| Figura 62. Fotografias: (A) - emulsão A/O e (B) - emulsão O/A..... | 91 |
| Figura 63. Micrografias da amostra 2..... | 92 |
| Figura 64. Espectro de EDS da superfície 2..... | 92 |
| Figura 65. Micrografias da amostra 3. | 92 |
| Figura 66. Espectro de EDS da superfície da 3..... | 93 |
| Figura 67. Curvas de Histerese das amostras 2 e 3..... | 94 |
| Figura 68. Estrutura química do fluoróforo 3 e as fotos do frasco reacional mostrando a perda da coloração após duas horas de reação..... | 95 |
| Figura 69. Imagens: (A) AIBN/fluoróforo 3 em 1h e (B) AIBN/fluoróforo 3 em 5h..... | 96 |
| Figura 70. Espectros de absorção no ultravioleta-visível (A) e de emissão de fluorescência (B) do fluoróforo 3 em clorofórmio (—) e após 5 horas de reação com AIBN em tolueno (■)..... | 96 |
| Figura 71. Espectro de emissão de fluorescência em estado sólido da NFM..... | 97 |
| Figura 72. Imagem de MEV (A) e Confocal (B) das NFM..... | 97 |
| Figura 73. Curva de Magnetização para as amostras NM e NFM a partir da polimerização em miniemulsão..... | 98 |
| Figura 74. Imagem das MM e MFM e do fluoróforo 3 | 99 |
| Figura 75. Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência: a) fluoróforo 3 em CHCl ₃ e b) das MFM em CHCl ₃ [4x10 ⁻⁵ M].... | 100 |
| Figura 76. Espectro de absorção na região do UV-Vis em CHCl ₃ das MFM com o fluoróforo 3 e das MM em CHCl ₃ | 101 |
| Figura 77. Espectro de emissão de fluorescência em estado sólido da MFM..... | 101 |
| Figura 78. Imagem de MEV das MFM..... | 102 |
| Figura 79. Micrografias confocal das MFM contendo o fluoróforo 3 em diferentes planos focais..... | 102 |
| Figura 80. Curva de Magnetização para as amostras MM e MFM a partir do método de emulsificação/evaporação do solvente..... | 103 |

LISTA DE ABREVIATURAS

θ : Ângulo de espalhamento.

μm : Micrômetro

$[\text{MM}_0]$: Concentração de monômero

AA: Ácido acrílico

AIBN: 2'2'-azobis(isobutironitrila)

ATRP: *Atom Transfer Radical Polymerization*

AZMA: Metacrilato de 2-aziridinil-1-etila

c^* : Concentração Crítica.

CPDB: Ditiobenzoato de 2-cianopropila

CRP: Polimerização Radicalar Controlada

D_0 : Coeficiente de diluição infinita.

DBTTC: Tritiocarbonato de dibenzila

DHT: Dihidrotestosterona

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico.

DMF: Dimetilformamida

dn/dc : Incremento do índice de refração

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

EDDA: 2,2 (dioxietileno) dietilamina

ETMA: metacrilato de 2,3-epitiopropila

FAZMA: Metacrilato de (1-fenil-2-aziridinil)metila

k_D : Coeficiente virial de difusão.

k_p : Constante de velocidade de polimerização

MA: Acrilato de Metila

MMA: Metacrilato de metila

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

\bar{M}_w : Massa molecular ponderal média

nm: nanômetro

PAA: Poli(ácido acrílico)

PEO: Poli(óxido de etileno)

PS: Poliestireno

PVA: poli(álcool vinílico)

RAFT: Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization

RMN-1H: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SLS: Espalhamento de Luz Estático.

SMA: Metacrilato de solketila

St: Estireno

tBA: Acrilato de terc-butila

TCMTB: Metiltiocianato de benzotiazol

T_g: Temperatura de transição vítrea

TGA: Análise termogravimétrica

THF: Tetrahidrofurano

AGRADECIMENTOS

À minha família que acompanhou minha trajetória (Vera, Vitor e Christian)

Ao Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold, meu orientador, pela paciência e pelo companheirismo em todos os momentos.

A Prof. Dr. Leandra minha coorientadora pela ajuda incondicional, muito obrigada.

À banca, pelas contribuições para meu trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, que acima de tudo, são meus amigos, em especial ao Paulinho da física que me socorreu em todos os momentos complicados.

Aos meus bolsistas, Matheus Fialho e a Géorgia Schiller por todo carinho e atenção.

Ao prof. Dr. Vladimir Lavayen por todo o ensinamento e apoio.

Aos meus amigos, dentro e fora da universidade..... MUITO OBRIGADA.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, e a UFRGS, pela estrutura.

1. INTRODUÇÃO

O trabalho desenvolvido na presente Tese se insere no âmbito do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Diagnóstico em Saúde Pública (INCT-INDI)¹, um dos INCTs mais multidisciplinares em que pesquisadores de diferentes áreas uniram-se para desenvolver reagentes e sistemas de diagnóstico para utilização em saúde pública. O INCT-INDI tem como premissa a nacionalização de insumos (p. ex. microesferas de poliestireno, microesferas magnetizadas, corantes e fluoróforos, preparação de antígenos recombinantes, conjugação de antígenos) e sistemas de diagnóstico relevantes para a saúde pública, envolvendo métodos rápidos para utilização no local de tratamento (*point of care*) e procedimentos de multiteste para o diagnóstico e controle do sangue. Isto porque o Brasil possui um saldo negativo na balança comercial em reativos para diagnóstico na ordem de US\$200 milhões, cenário que revela uma dependência externa do país neste segmento. Dentro deste contexto, o INCT-INDI nasceu com a proposta de dominar a tecnologia diagnóstica envolvendo plataformas para testes de diagnóstico de grande escala, com alta facilidade e precisão, o que impactará diretamente o sistema produtivo de saúde.

Atualmente a busca por métodos analíticos alternativos aos tradicionais tem despertado interesse de muitos pesquisadores². Em particular, a necessidade de métodos rápidos, versáteis e confiáveis, capazes de monitorar em tempo real espécies de interesse biológico. Um dos alvos prioritários é o desenvolvimento de tecnologias de diagnósticos que possam contribuir para ações de saúde pública, como multitestes capazes de testar vários patógenos conjuntamente em uma mesma amostra de sangue para utilização no local de tratamento como, por exemplo, nas unidades de pronto atendimento (UPA)³. A miniaturização e automação de multitestes diagnósticos oferecem vantagens frente ao tradicional teste ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), tais como custo reduzido, maior sensibilidade, redução na quantidade de amostra, possibilitam a análise de diversos alvos simultaneamente e reprodutibilidade⁴. No Brasil, quem desenvolve pesquisas de novas plataformas para ensaios diagnósticos é a FIOCRUZ, com foco principal em doenças como hepatite B, hepatite C, AIDS, doença de Chagas e Sífilis entre outras.

A evolução das técnicas de diagnósticos, desde os primeiros testes de detecção imunológica ELISA até as mais novas ferramentas de biologia molecular, só foi possível devido à melhoria das plataformas existentes e ao desenvolvimento de metodologias para ensaios diagnósticos. Uma destas tecnologias é denominada de microarranjos líquidos,

desenvolvida com base na citometria de fluxo⁵ já bastante conhecida a mais de vinte e cinco anos e que vem sendo mais difundida recentemente a partir do lançamento no mercado do equipamento Luminex®, pela empresa LuminexCorp⁶.

A metodologia dos microarranjos líquidos faz uso da citometria de fluxo e de micropartículas esféricas e vem ganhando popularidade na área de diagnóstico. Esse sistema consiste no emprego de uma mistura de diferentes tipos de microesferas uniformes em tamanho como suporte sólido, mas que emitem intensidades de fluorescência distintas, para diferentes moléculas de captura, sejam elas anticorpos, antígenos, peptídeos ou ácidos nucléicos⁷. É considerada uma técnica de diagnóstico ideal para a avaliação simultânea de diversos alvos em muitas amostras, em um curto período de tempo e principalmente pela necessidade de pouca amostra para detecção.

Microesferas de poliestireno magnéticas contendo corantes fluorescentes (fluoróforos) caracterizam-se como insumo base para a plataforma de microarranjos líquidos. Cada microesfera pode ser identificada pela adição de proporções distintas de corantes fluorescentes, permitindo a criação de códigos de cor únicos e específicos para diferentes doenças⁸.

Existem muitas empresas que oferecem no mercado microesferas de poliestireno com diferentes tamanhos, ligantes terminais, comprimentos de onda de fluorescência, com ou sem propriedades magnéticas⁹. É interessante notar que todas as microesferas disponíveis no mercado são provenientes de um processo de polimerização de estireno em emulsão e que requerem equipamentos de detecção e caracterização sofisticados e caros¹⁰.

O uso de microesferas de sílica ou polímeros para imobilização de moléculas de interesse biológico é conhecido desde os anos 80⁷, tendo alcançado o seu auge a partir do lançamento no mercado do equipamento Luminex®. A tecnologia utilizada neste equipamento envolve um processo de marcação de microesferas de poliestireno com corantes fluorescentes (fluoróforos) distintos (Figura 1). O Luminex® contém um laser no vermelho que promove a excitação de fluoróforos que emitem na região do vermelho do espectro eletromagnético (658 nm e 721 nm). Utilizando proporções adequadas de dois fluoróforos, podem ser criados até 100 conjuntos diferentes de microesferas (Figura 1B), sendo que a cada uma pode-se conjugar uma biomolécula diferente (geralmente um antígeno ou anticorpo, Figura 1C) que será detectada pelo Luminex®¹².

As microesferas para uso nesse sistema precisam, além da fluorescência, da incorporação de um material magnético, pois com a aplicação de um campo magnético externo, podem ser retidas facilitando a purificação e até mesmo a reutilização¹³.

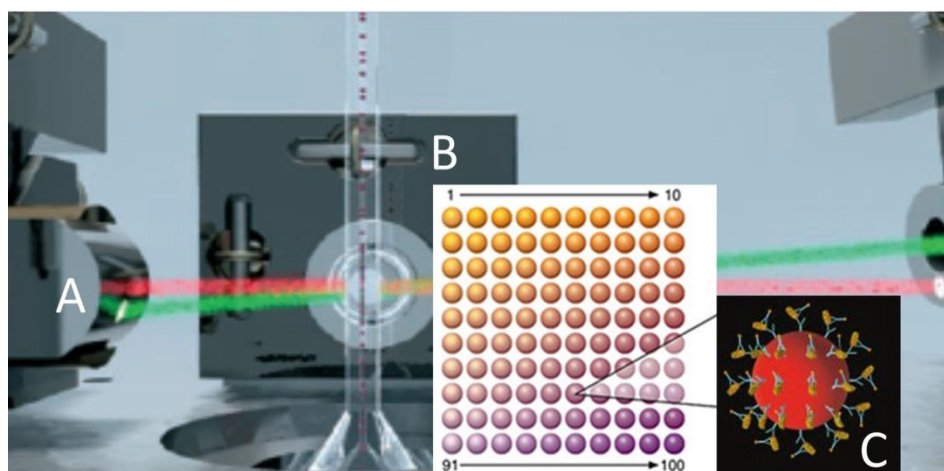


Figura 1: Princípio de funcionamento do Luminex®: (A) feixes de luz laser passando pela placa contendo as amostras (B) e excitação pela luz do laser vermelho dos fluoróforos contidos nas microesferas de poliestireno (C) conjugadas com a biomolécula de interesse¹².

Existem diferentes classes de fluoróforos orgânicos que emitem na região do vermelho e do infravermelho próximo (625 nm a 789 nm e 780 nm a 2500 nm, respectivamente). A escolha do fluoróforo está relacionada à boa biocompatibilidade e pela capacidade de marcação de materiais biomoleculares¹⁴. Exemplos de fluoróforos que apresentam boa emissão na região do vermelho e infravermelho são: as cianinas¹⁵ e esquaraínas¹⁶ classes de fluoróforos que foram utilizadas neste projeto.

Para a preparação de microesferas poliméricas, uma rota possível é o uso de monômeros funcionalizados que podem ser copolimerizados com estireno ou metacrilato de metila para introduzir grupos reativos na superfície das esferas, as quais são utilizadas para imobilizar antígenos ou anticorpos (Figura 1C) com o objetivo de diagnosticar uma determinada doença. A inserção de grupos funcionais nas cadeias poliméricas com auxílio de reações químicas adicionais pode acontecer após ou durante a etapa de polimerização. Dentre as técnicas que podem ser utilizadas para incorporar monômeros funcionalizados diretamente na etapa de polimerização destaca-se a técnica de polimerização em miniemulsão¹⁷, pois favorece modificações específicas na superfície de partículas de polímero, tendo em vista a existência de uma interface com o meio dispersante.

Outro método de preparação de microesferas poliméricas é a partir de polímeros pré-formados, como a técnica de emulsificação/evaporação de solvente¹⁸. Em comparação com os métodos de preparação de nano e microesferas poliméricas a partir da polimerização de monômeros, a utilização de polímeros pré-formados é mais facilmente controlável e de maior rendimento.

As técnicas de miniemulsão e emulsificação/evaporação de solvente possibilitam a obtenção de esferas em escala nano e micrométrica, sendo as microesferas estruturas com diâmetro acima da ordem de 1µm, e as nanoesferas são estruturas com diâmetros entre 50 nm e 1µm¹⁹. A escala micrométrica é a desejada para a preparação das esferas de poliestireno para a aplicação no equipamento Luminex®.

Este projeto de doutorado é uma parte integrante do projeto INCT-INDI, cujo objetivo principal foi produzir microesferas de poliestireno, fluorescentes e magnéticas que serão futuramente incorporados nos kits de diagnósticos multiplex a serem desenvolvidos. A meta foi avaliar diferentes metodologias para a obtenção de partículas esféricas de poliestireno com tamanho homogêneo, utilizando fluoróforos novos para a indexação de cor. A nacionalização desse insumo reduziria custos de importação e a dependência tecnológica brasileira no setor de imunodiagnóstico.

Os métodos empregados explorados e avaliados foram o de emulsificação/evaporação do solvente e miniemulsão. Nesta última, utilizou-se as técnicas de polimerização radicalar convencional e por transferência de átomo (ATRP)²⁰. Moléculas representantes das classes da Esquaraína e Cianina foram usadas como fluoróforos por atenderem a demanda da emissão no vermelho. Também foram investigadas as melhores rotas na preparação de nanopartículas magnéticas^{21,22} para incorporação nas microesferas de poliestireno, com o objetivo de deixá-las com um comportamento magnético, melhorando a aplicação para ensaios de imunodiagnóstico.

2. Objetivo

Obtenção de microesferas de poliestireno fluorescentes na região do vermelho e magnéticas atuando como insumos identificadores de doenças pelo sistema de diagnóstico xMAPLuminex.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliação dos métodos de obtenção de microesferas fluorescentes de poliestireno com propriedades magnéticas: método de emulsificação/evaporação do solvente, polimerização via ATRP e polimerização em miniemulsão.
- Caracterização de microesferas fluorescentes de poliestireno pelo método de polimerização em miniemulsão;
- Síntese e caracterização de microesferas fluorescentes de poliestireno via ATRP usando iniciadores fluorescentes;
- Otimização do método de co-precipitação para a síntese de nanopartículas magnéticas de ferro.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ESFERAS POLIMÉRICAS DE POLIESTIRENO

Nano e microesferas poliméricas são de grande interesse biológico, devido às suas diversas aplicações de uso²³. Várias técnicas podem ser usadas na preparação de polímeros em escala nano e micrométrica, mas a escolha do método depende de alguns fatores como: tamanho desejado da partícula, distribuição de tamanho, área de aplicação entre outros²⁴. Estas podem ser convenientemente preparadas a partir de um polímero pré-formado ou por polimerização direta de monômeros. Métodos como evaporação do solvente, desanilização (*salting-out*), diálise e nanoprecipitação, podem ser utilizados para a preparação de esferas a partir de polímeros pré-formados²⁵. Por outro lado, a emulsão, miniemulsão, microemulsão e a polimerização interfacial são métodos usados para sintetizar estas estruturas a partir da polimerização de monômeros²⁶ (Figura 2).

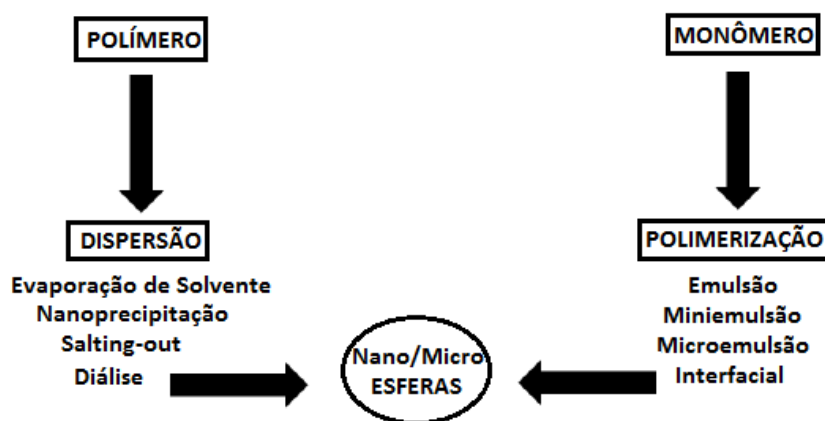


Figura 2: Representação esquemática de várias técnicas de preparação de nano e microesferas poliméricas²⁶.

Nano e microesferas poliméricas estão sendo cada vez mais investigadas por suas propriedades de liberação controlada de fármacos e definidas como partículas sólidas coloidais²⁷. O termo micro ou nanopartículas refere-se a dois tipos de estruturas diferentes de esferas ou cápsulas.

Denominam-se esferas os sistemas em que a substância ativa se encontra homogeneamente dispersa no interior da matriz polimérica. As micro/nanocápsulas constituem sistemas reservatórios, onde é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido²⁸. Sendo assim, partículas poliméricas sólidas coloidais podem

assumir uma forma esférica matricial (microesferas, tamanho entre 1 a 1000 μm) ou reservatória (microcápsulas) que promovem a liberação controlada de fármacos ou substâncias biologicamente ativas, hidrofílicas ou hidrofóbicas²⁹.

Conforme ilustrado na Figura 3, a esfera tipo reservatório apresenta uma estrutura muito elementar: o núcleo, ou núcleos, é bem definido e envolto por um filme polimérico. Por outro lado, as microesferas são sistemas que apresentam uma estrutura do tipo matricial.

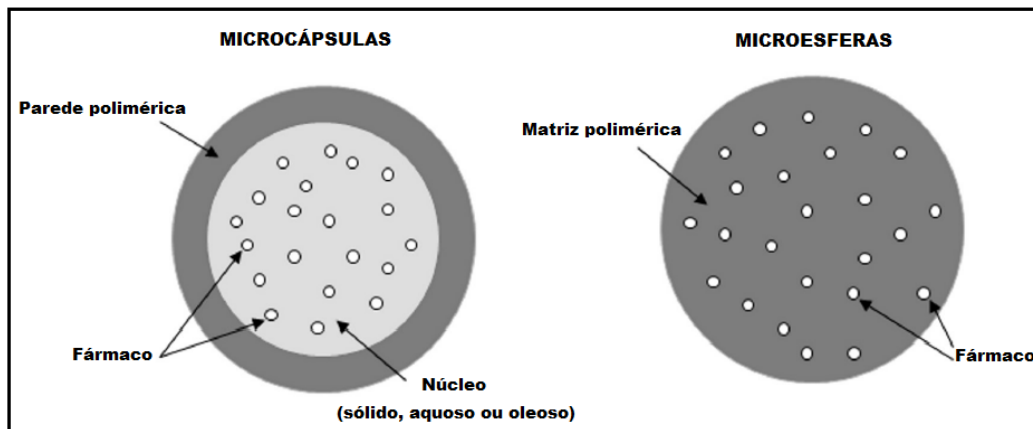


Figura 3: Representação da diferença entre microcápsulas e microesferas²⁹.

Alguns polímeros são usados como matrizes sólidas, na obtenção de esferas, pois são flexíveis, moldáveis, baratos, de síntese relativamente simples e podem assumir diferentes formas. Os polímeros são utilizados como insumo na produção de microesferas e entre eles, destaca-se o poliestireno (PS). São encontrados inúmeros trabalhos na literatura de microesferas poliméricas para aplicações diversas³⁰, principalmente para uso na área biomédica, na liberação lenta e gradual de fármaco, como também para possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo como sítios de inflamação³¹. Além disso, para a obtenção de microesferas, existe uma grande variedade de polímeros biodegradáveis, que podem ser sintéticos ou naturais, embora, poucos sejam biocompatíveis. Entre os sintéticos, os polímeros e copolímeros dos ácidos lático e glicólico, que estão entre os mais utilizados devido a sua segurança e uso autorizado para aplicações em humanos. Entre os naturais podemos citar a albumina³², colágeno³³ e também a quitosana³⁴. A utilização destes copolímeros como precursores nanoestruturados com arquitetura controlada é uma abordagem promissora para obter materiais funcionalizados com aplicações específicas³⁵. As nano/microesferas poliméricas contendo compostos orgânicos fluorescentes e magnéticas podem ser preparadas através dos métodos apresentados na Figura 2, usando uma solução contendo o corante fluorescente de interesse e as nanopartículas magnéticas³⁶.

3.2. MICROESFERAS POLIMÉRICAS FLUORESCENTES

Microesferas poliméricas fluorescentes são amplamente usadas em diferentes campos da medicina destacando-se os testes diagnósticos conhecidos como microarranjos líquidos, capazes de detectar até 20 doenças em apenas alguns minutos³⁷. A metodologia dos microarranjos líquidos emprega usualmente microesferas de poliestireno, embora outros polímeros tenham sido testados, com aproximadamente 5 µm em diâmetro contendo corantes fluorescentes. Estas microesferas atuam como suporte sólido para a captura de diferentes moléculas-alvo, sejam elas anticorpos, antígenos, peptídeos ou ácidos nucleicos³⁸.

Para esse sistema as microesferas coradas com fluoróforos, que emitem luz no infravermelho próximo e que podem ser revestidas com vários tipos de ligantes. Na Figura 4 é uma representação esquemática de como ocorre o processo de detecção. Pois, quando as esferas são adicionadas a uma solução contendo certo tipo de analito (material biológico e ou amostra de paciente), a ligação das moléculas de captura, já acopladas a cada uma das microesferas com seus alvos é detectada através da utilização de um conjugado (molécula repórter) também fluorescente.

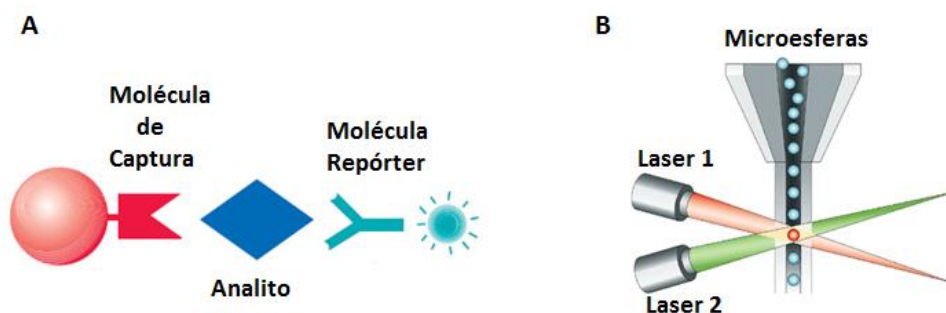


Figura 4: (A) Representação esquemática da ligação de moléculas biológicas nas microesferas de poliestireno fluorescentes. (B) As microesferas entram pela *sonda de amostra* na máquina, onde passam por dois lasers. Um laser vermelho que detecta e identifica as microesferas e um laser verde que quantifica os números de cada microesfera. (modificada em ilustrações desenvolvidas por Luminex Corp)³⁹.

As microesferas, então, passam por um equipamento de citometria de fluxo^{40,41} composto por um processador de sinal digital e dois canais de lasers capazes de excitar os fluoróforos das microesferas. O equipamento de citometria de fluxo permite a identificação de determinadas células em suspensão, ou seja, a identificação de antígenos em células vivas e determina a intensidade da fluorescência de cada microesfera fluorescente em suspensão.

Cada microesfera forma a base de um ensaio individual (suporte sólido), com uma identificação espectral específica. Assim, um feixe de laser lê qual a esfera específica que está passando pelo detector e o segundo feixe lê a reação em sua superfície. Esse sistema facilita o desenvolvimento de ensaios multiplexados, que simultaneamente medem diferentes analitos em um pequeno volume de amostra³⁸.

A imobilização de ligantes ou de biomoléculas de interesse na esfera pode ocorrer pela adsorção física e pela interação covalente entre os grupos com a superfície funcionalizada⁴². A interação covalente permite uma ligação mais intensa e os grupos mais utilizados para esse fim são os radicais: amino, carboxi, hidroxil e o tiol⁴³, a funcionalização da superfície da esfera é necessária para o acoplamento das moléculas de interesse.

Um exemplo é o método de acoplamento químico da proteína do MAYV (*Mayaro* vírus) ao látex de poliestireno modificado contendo grupos carboxila. O látex (CLB-4 Sigma®) apresenta numerosos grupos carboxila na superfície das microesferas de poliestireno, apresentando um diâmetro de 0,4 µm. Esses grupos permitem uma ligação mais estável com grupamentos amina, uma ligação covalente favorecida com a adição da carbodiimida⁴⁴. Na Figura 5 um esquema das etapas de acoplamento químico de proteínas às microesferas de poliestireno.

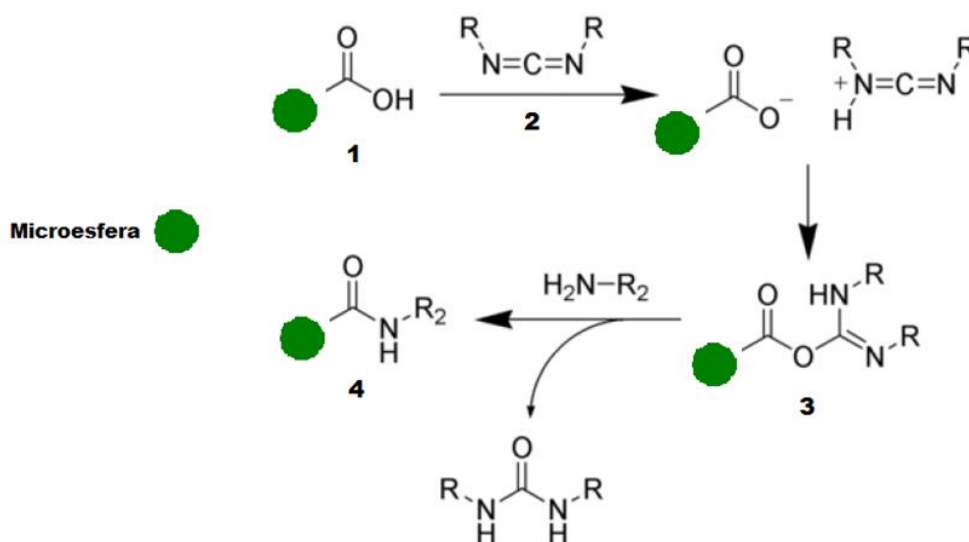


Figura 5: Esquema das etapas de acoplamento químico de proteínas às microesferas de poliestireno. 1) Microesfera modificada com o grupo carboxila; 2) Carbodiimina; 3) Formação do intermediário (o-acilisourea); 4) Microesfera ligada covalentemente a uma aminoácido por uma ligação amida⁴⁴.

Uma modificação de superfície também pode ser exemplificada com a imobilização da proteína 6xhistag nas esferas Ni-NTA e Penta.His que são usadas na imobilização da proteína 6xHis.tag, através de grupos tiol e grupos carboxílicos na superfície que permitem a ligação covalente de proteínas e de outros reagente usando N-(3-dimetilaminopropil), N'etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (S-NHS). Os fluoróforos permanecem dentro das esferas e a reações de acoplamento ocorrem pela superfície permitindo a produção de diversos tipos de esferas como mostra a Figura 6.

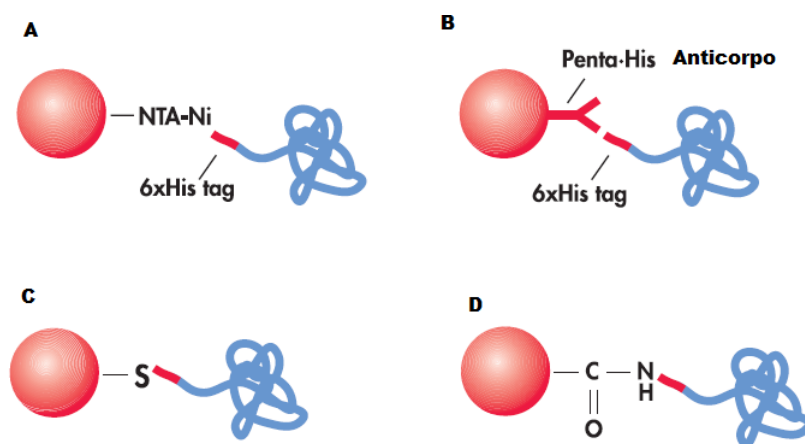


Figura 6: Esquema da imobilização da proteína em: A esfera NTA-Ni, B esfera Penta.His, C esfera ativada e D esfera carboxilada⁴⁴.

Os fluoróforos de interesse empregados neste trabalho foram escolhidos, pois, são de uso comum em metodologias bioanalíticas e em diferentes áreas tais como medicina, farmácia e biologia celular. Também são empregados como marcadores fluorescentes de aminiácidos, peptídeos, proteínas, anticorpos, DNA e outras biomoléculas^{45,46} além de apresentarem emissão de fluorescência na região do vermelho.

Pois, com base nas informações coletadas a respeito do equipamento Luminex® 100 e segundo as especificações encontradas, este aparelho possui um laser no vermelho (635 nm) que promove a excitação de dois corantes chamados de corantes de classificação que emitem na região do vermelho (~658 nm) e do infravermelho (~721 nm). Consequentemente, buscou-se como moléculas alvo fluorescentes com emissão nestas duas regiões^{39, 44,47}.

Embora existam empresas que comercializam microesferas fluorescentes de poliestireno o alto custo, tamanho e os fluoróforos são limitados e menos sensíveis a detecção⁴¹. Os fluoróforos podem também atuar como biomarcadores, quando conjugados com o complexo antígeno-anticorpo, geralmente são hidrofóbicos, não solúveis nas amostras

biológicas à base de água e podem ser modificados com grupos que favoreçam a solubilização⁴⁸.

3.2.1. Tipos de Fluoróforos

Os corantes fluorescentes (fluoróforos) são largamente empregados nas tecnologias atuais, como por exemplo, em células solares, em marcadores fluorescentes, como sondas fluorescentes, ou sensores de pH⁴⁹. Uma área em destaque é a biotecnologia, onde os fluoróforos são empregados como marcadores fluorescentes, ligando-se a estruturas específicas, ou utilizadas como sondas fluorescentes, que através de interações não covalentes permite avaliar, de acordo com a intensidade de fluorescência do corante, determinadas propriedades do analito ou concentrações deste. Atuando também na marcação de proteínas⁴¹, de células ou em partes específicas das células, além da indexação de cor em microesferas poliméricas⁵⁰.

Dentre os fluoróforos, muitas são as faixas de absorção e emissão destes, uma vez que, para cada aplicação, a adaptação ao meio faz-se necessário, podendo variar assim a aplicabilidade de cada corante. A variação da absorção e emissão dos fluoróforos é dada através de fatores como a conjugação presente na estrutura e à presença de grupos cromóforos ou auxocromos que são diretamente ligados às propriedades fotofísicas da molécula.

Os grupos auxocrômicos intensificam a cor em uma molécula e geralmente são grupamentos que possuem pelo menos um par de elétrons não-ligantes. A sua presença na estrutura da molécula acarreta em um deslocamento no máximo de absorção. Caso a sua presença aumente a conjugação na molécula, ocorre um deslocamento para o vermelho, chamado de deslocamento batocrômico (regiões espectrais de menor energia). Caso a sua presença diminua a conjugação da molécula, o deslocamento observado é para o azul e o deslocamento chamado de hipsocrômico. Também podem alterar a intensidade de absorção dos comprimentos de onda, de modo a aumentá-la (efeito hiperocrômico) ou diminuí-la (efeito hipocrômico) como pode ser visualizado na Figura 7.

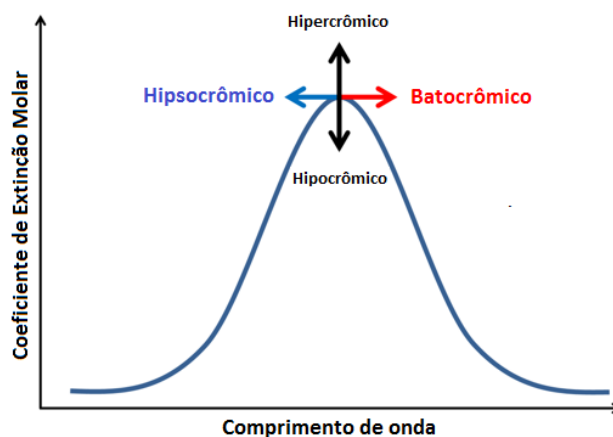
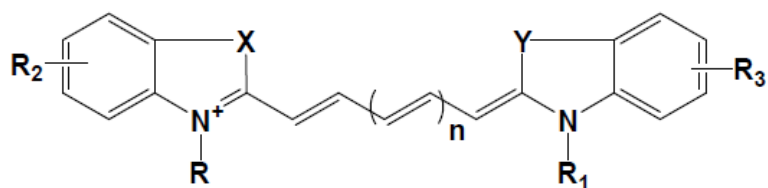


Figura 7: Ilustração dos efeitos no espectro de absorção⁵¹.

Os fluoróforos empregados na preparação das microesferas devem ter certas propriedades como: elevado coeficiente de absorvidade molar, elevada emissão de fluorescência e um bom rendimento quântico, boa fotoestabilidade; boa solubilidade no polímero^{39,40}. Os fluoróforos da classe das cianinas e das esquaraínas são considerados apropriados para a ancoragem nas microesferas de poliestireno, possibilitando a modificação da conjugação e introdução de grupos cromóforos e auxocrômicos e apresentam elevada eficiência de fluorescência e coeficiente de extinção molar.

A síntese dos fluoróforos (cianinas e esquaraínas) é descrita na literatura^{15,16}, bem como os seus comportamento fotofísico em diferentes solventes. A classe das cianinas apresenta uma ampla região de absorção (vermelho e ao infravermelho próximo), possuindo dois grupos heterocíclicos aromáticos unidos por uma cadeia polimetínica de estrutura plana conjugada contendo, geralmente um número ímpar de átomos de carbono (Figura 8). Esse arranjo permite que modificações estruturais sejam realizadas (R1 e R2), principalmente no heteroátomo dos ciclos, nos próprios heterociclos e muitas vezes até na cadeia polimetínica, o que permite uma vasta aplicação, inclusive na dopagem de materiais poliméricos³⁹. Pelo estudo fotofísico apresentam bandas de absorção e emissão de fluorescência na região do vermelho e infravermelho próximo^{15,41}.

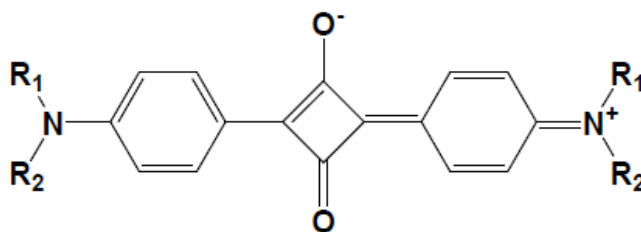


X, Y = O, S, C(CH₂)₂ ou C=CH₂; n = 0-4

R, R₁, R₂ e R₃ = alquil, alquilsulfonil, alquilcarboxil, aminoalquil

Figura 8: Fluoróforo com emissão de fluorescência no infravermelho, estrutura geral das cianinas¹⁵.

Já as esquaraínas dependendo da conjugação eletrônica, da planaridade da molécula e da presença de grupos cromóforos absorvem, de um modo geral, na região do vermelho e emitem na região do vermelho e do infravermelho (680-800 nm), com bons rendimentos quânticos de fluorescência. Estes corantes são utilizados para capturar imagens de moléculas isoladas em células vivas, como marcadores moleculares de ácidos nucleicos para sequenciamento e estudos estruturais, tecnologia de microarranjos e em PCR (Reação em cadeia da polimerase)^{46,47}. As estruturas mostradas na Figura 9 pertencem à classe de corantes esquaraínas.



R₁ = R₂ = (CH₂)₂-OH

R₁ = CH₃, R₂ = (CH₂)₃-COOH

Figura 9: Fluoróforo com emissão de fluorescência no vermelho, estrutura geral de uma esquaraína¹⁶.

Outros tipos de fluoróforos também são usados na obtenção de microesferas fluorescentes, como a Rodamina B que foi colocada em solução de acetona/metanol até a dopagem em microesferas de poli(metil metacrilato) com um tamanho médio de 13 µm. Um

estudo de cavidade óptica foi realizado entre a esfera e o filme de PMMA, ambos contendo a rodamina. A conclusão foi que nas microesferas são capazes de aumentar a absorção quando dopadas de fluoróforo, ampliando o campo de novas aplicações em reações foto-catalisadas⁴⁴.

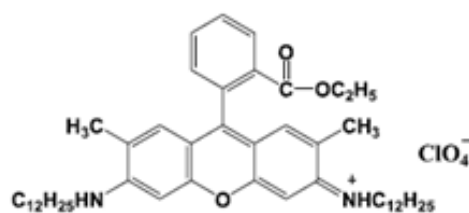


Figura 10: Estrutura da Rodamina B usada na obtenção de microesferas⁴⁴.

As interações entre um corante fluorescente e uma cadeia polimérica ou até mesmo na microesfera podem ser do tipo física ou química. A interação física pode ser obtida pela adição do fluoróforo no meio onde ocorrerá a polimerização, como nas técnicas de polimerização em miniemulsão ou através de uma mistura homogênea do fluoróforo e o polímero formado, como no método de emulsificação/evaporação do solvente. Entretanto, para ocorrer uma interação química, deve existir uma ligação covalente entre o fluoróforo fluorescente e a cadeia polimérica⁴⁷. Neste caso, o fluoróforo deve possuir em sua estrutura um grupo capaz de ligar-se covalentemente à cadeia do polímero, geralmente realizada através da copolimerização radicalar de fluoróforos contendo ligação dupla terminal ou da utilização de iniciadores fluorescentes.

O uso de porfirinas já é descrito na literatura (Figura 11) na obtenção de polímeros funcionalizados, ou seja, atuando como um iniciador fluorescente em reações do tipo ATRP⁵². A porfirina é um fluoróforo de origem natural, formada por 4 anéis pirrólicos, razão pela qual todos os derivados porfíricos absorvem luz a um comprimento de onda próximo de 410 nm. A capacidade para coordenar uma grande variedade de metais (como Cu e Zn) faz com que este grupo de compostos exiba muitas propriedades diferentes. Além de alta estabilidade e da possibilidade de ligações com diferentes tipos substituintes na sua estrutura.

Funcionalizando a porfirina com grupos α -bromo éster para atuar com iniciador da reação ATRP, na presença de 2-bromoisobutirato e trietilamina, o rendimento final foi de 85%.

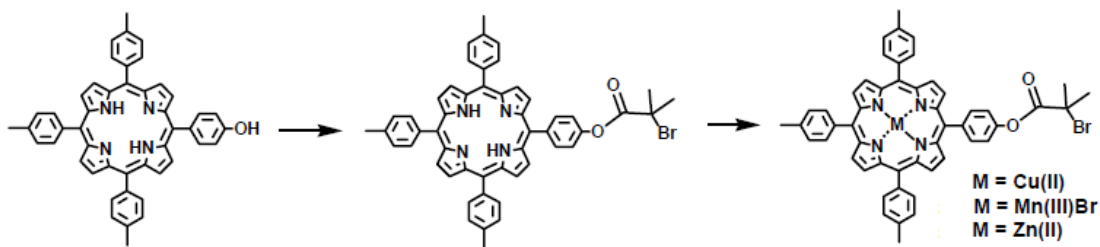


Figura 11: Esquema da porfirina funcionalizada para atuar como iniciador fluorescente⁵².

3.3. MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

A denominação emulsificação/evaporação do solvente é normalmente usada para designar um conjunto de procedimentos nos quais ocorre a formação de uma emulsão que pode ser do tipo óleo/água (O/A) ou óleo/óleo (O/O)⁵³. Em ambos os casos, a fase orgânica, onde o polímero se encontra dissolvido, é um solvente orgânico que apresenta uma solubilidade limitada na fase aquosa, formando uma emulsão o/a, ou na fase óleo, formando uma emulsão o/o. Outros procedimentos que utilizam emulsões múltiplas também têm sido reportados na literatura, tais como os processos água/óleo/água (A/O/A) e óleo/água/óleo (O/A/O)⁵⁴, conforme ilustrado na Figura 12.

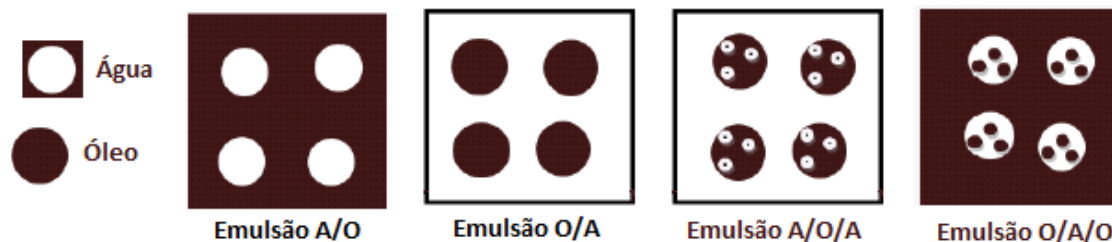


Figura 12: Diferentes tipos de emulsões em um sistema água e óleo⁵⁵ (adaptado).

No método de emulsificação/evaporação do solvente prepara-se, inicialmente uma fase orgânica, constituída por um solvente orgânico apolar no qual é dissolvido o polímero e uma fase aquosa, que contém um agente estabilizante do tipo O/A como, por exemplo, o poli(álcool vinílico) (PVA). Ambas os sistemas são submetidas à emulsificação sendo a etapa seguinte à emulsão recém-preparada, o uso de ultrassom ou a homogeneização a alta pressão. A agitação da emulsão é a etapa determinante para a obtenção das esferas e deve ser realizada antes da evaporação do solvente, de modo a serem obtidas gotículas de fase interna de dimensões coloidais⁵⁵.

A emulsificação de um solvente orgânico numa fase aquosa, por agitação, origina gotículas com dimensões entre 2 a 5 μm ⁵⁶. Para a obtenção de gotículas com dimensões inferiores a 1 μm é necessário submeter à emulsão a uma tensão de cisalhamento bem elevada.

A difusão do solvente orgânico apolar no meio da fase aquosa é muito lenta e limita a concentração do polímero na interface, logo pelo uso de ultrassons ou a homogeneização a alta pressão, é possível reduzir o tamanho das gotículas da fase interna e, ao mesmo tempo, contribuir para o aumento da superfície de contato entre ambas as fases.

Devido à tendência de ocorrer a coalescência na fase aquosa durante a agitação, é necessário o uso de um estabilizante de emulsão, para aumentar a estabilidade da emulsão primária O/A. O estabilizante mais adequado é aquele que promove uma redução maior da energia livre interfacial, diminuindo a tendência à coalescência e à aglomeração das gotículas emulsificadas⁵⁷.

Os estabilizantes mais utilizados na fase aquosa são, geralmente, PVA⁵⁸ e a albumina (BSA sérica bovina)⁵⁹. O primeiro é um dos poucos que evita a agregação das esferas durante a lavagem e a liofilização, embora não possa ser utilizado quando o produto se destina a administração intravenosa. As propriedades do PVA dependem do grau de polimerização e do grau de hidrólise, pois quando completamente hidrolisado, o elevado número de hidroxilas leva à formação de ligações de hidrogênio fortes entre grupos hidroxilas, dificultando sua solubilização em água. O PVA tem sido aplicado em fibras, adesivos, emulsificantes na indústria têxtil e de papel⁶⁰, na obtenção de membranas para imobilização de enzimas⁶¹ e devido às suas propriedades de degradabilidade e não toxicidade tem sido usado cada vez mais na produção de medicamentos⁶².

Por outro lado, a albumina é utilizada em substituição ao PVA devido à sua biodegradabilidade. Quando o estabilizante utilizado apresenta baixa massa molar, as moléculas localizam-se, preferencialmente, na superfície das gotículas emulsificadas. Desta forma o aumento da concentração provoca um aumento na proteção das esferas contra a coalescência, resultando numa emulsificação mais eficaz e em esferas de menores dimensões.

De acordo com a literatura,⁶³ quando se usa um estabilizante de massa molar elevada, como, por exemplo, o PVA, o tamanho das esferas diminui com o aumento da concentração de PVA até a concentração micelar crítica (CMC). Quanto maior for a concentração de PVA, maior será o número de moléculas na superfície das gotículas emulsificadas.

A emulsificação/evaporação do solvente é uma técnica que não requer temperaturas elevadas nem agentes que induzam à separação de fases e é possível atingir tamanho de partículas controlados na faixa nano e micrométrica⁶⁴. Durante a remoção do solvente orgânico ocorre a precipitação do polímero na fase externa aquosa e a formação das nano/microesferas.

As microesferas formadas são submetidas, posteriormente às operações complementares, como separação, lavagem e secagem. Após evaporação completa do solvente orgânico, as microesferas são separadas por meio de centrifugação, lavadas para remoção do agente tensoativo residual e armazenadas como suspensão ou liofilizadas. Este método amplamente empregado para a preparação de micro e nanoesferas é a emulsificação seguida de evaporação do solvente⁶⁵.

Os problemas de estabilidade limitada podem ser minimizados através da secagem das suspensões. A sublimação (liofilização) tem sido bastante utilizada para a desidratação de sistemas coloidais, principalmente lipossomas⁶⁶ e nanoesferas^{67,68}. A secagem das suspensões de nanoesferas, empregando-se liofilização, é uma estratégia para aumentar a estabilidade físico-química destes sistemas.

Outro fator importante é que na maior parte dos casos são usados solventes clorados para solubilizar o polímero, como o diclorometano ou o clorofórmio, devido à sua baixa hidrossolubilidade, ao seu baixo ponto de ebulição e à sua capacidade de solubilização de um grande número de princípios ativos (substâncias que exercem efeito farmacológico). Porém, o problema no uso de solventes orgânicos reside na sua toxicidade. Assim, esses solventes estão sendo substituídos por solventes de menor toxicidade, como o acetato de etila⁶⁹.

No caso de produção de microesferas ou nanoesferas para liberação controlada, o princípio ativo é disperso ou dissolvido com o polímero, que é anteriormente disperso em um solvente orgânico imiscível com água como o diclorometano e o clorofórmio. O solvente orgânico é então removido por evaporação sob agitação, favorecendo a formação de glóbulos poliméricos compactos, nos quais o agente ativo se encontra retido. A remoção do solvente orgânico também pode ser realizada a pressão reduzida.

No final, é obtida uma dispersão aquosa de nanoesferas, que são separadas por centrifugação, ultracentrifugação ou ultrafiltração. Em seguida são lavadas com água deionizada ou com uma solução tampão⁷⁰.

Na técnica de emulsificação/evaporação do solvente, o diâmetro médio final das partículas depende, em grande extensão, da velocidade de agitação e do tipo de equipamento empregado. Outras variáveis geralmente estudadas incluem a proporção do agente emulsificante, o volume da fase dispersa em relação à fase contínua, a concentração do polímero e a relação fármaco/polímero na fase interna da emulsão⁷¹.

Song et al.⁷² prepararam nanoesferas de PLGA poli(L-ácido lático-co-ácido glicólico) com tamanhos entre 60-200 nm empregando uma mistura de diclorometano e acetona (8:2, v/v) como solvente e como agente estabilizador o PVA. Nanoesferas de PLGA também foram sintetizadas utilizando diclorometano 1% (w/v) como solvente, PVA e Span 40 como agentes estabilizadores e foi observado que o aumento da concentração de PVA provocou uma diminuição no tamanho das nanoesferas.

Nanoesferas podem ser preparadas a partir de polímeros e copolímeros usando diferentes solventes e estabilizantes como os exemplos mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Diferentes estabilizadores na produção de nanoesferas.

| Polímero | Solvente Orgânico | Estabilizador | Tamanho (nm) | Ref. |
|----------|-------------------|---------------|--------------|------|
| PLGA | Diclorometano | Span 40 | 200 | [73] |
| PLA | Diclorometano | PVA | 200 | [74] |
| PLGA | Clorofórmio | SDS | 76 | [75] |

A concentração de polímero e solvente usado na preparação da emulsão afetam as propriedades finais das nanoesferas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente⁷⁵. Esse efeito foi estudado em outros trabalhos usando dois solventes orgânicos diclorometano e acetato de etila, na preparação de nanoesferas de PLGA. A conclusão foi de que o tamanho da partícula preparada com diclorometano foi maior que a produzida com acetato de etila.

A técnica de emulsificação/evaporação do solvente é amplamente utilizada para sintetizar esferas magnéticas a partir de um polímero pré-formado. Geralmente, a suspensão orgânica (que contem o material magnético e o polímero) é emulsificada com uma solução aquosa contendo um agente estabilizador. Já é descrito na literatura⁷⁶ a preparação de nanopartículas de PLGA magnéticas com tamanho em torno de 280 nm com incorporação do material magnético comprovada a partir de espectros de FTIR. O material apresentou um comportamento superparamagnético indicando assim um bom sistema de suporte para fármacos.

3.4. POLIMERIZAÇÃO EM EMULSÃO

As reações de polimerização podem ocorrer em sistemas homogêneos, onde todos reagentes e produtos encontram-se solubilizados em uma única fase, ou em sistemas heterogêneos de polimerização com a presença de duas ou mais fases imiscíveis. As vantagens dos sistemas heterogêneos de polimerização é a fácil recuperação do polímero no final do processo com alta massa molar e na forma de partículas sólidas e com tamanho que podem variar de 100 nm até 2.000 μm ⁷⁷.

A polimerização em emulsão é um processo heterogêneo na qual o monômero, de natureza hidrofóbica é disperso em um solvente hidrofílico, geralmente água. As duas fases imiscíveis precisam ser misturadas empregando-se e uma força de cisalhamento que promove a quebra da fase dispersa em pequenas gotas no diluente (fase contínua)⁷⁸.

Para garantir que a fase dispersa permaneça na forma de pequenas gotas durante todo o processo é comum utilizar estabilizadores que atuam na formação da gota, evitando efeitos de coalescência e até mesmo mudanças operacionais fundamentalmente físicas, como a manutenção da agitação vigorosa do sistema⁷⁹. O produto da polimerização em emulsão é uma dispersão estável de um polímero em um meio essencialmente aquoso que recebe o nome de látex⁸⁰.

Uma das grandes vantagens da polimerização em emulsão é a possibilidade de obter látex com diferentes propriedades coloidais (morfologia, distribuição de tamanhos de partículas, concentração de partículas, propriedade de formação de filmes, etc.) empregando polímeros com diferentes propriedades (composição, microestrutura, distribuição de massa molar, grau de cristalinidade, entre outros). Além disso, sob o ponto de vista industrial, a polimerização em emulsão é uma técnica extremamente importante, já que são obtidos polímeros de altas massas moleculares.

O mecanismo da polimerização em emulsão é bem conhecido para monômeros hidrofóbicos e hidrofílicos tais como o estireno e o acetato de vinila. Na presença de monômeros hidrofóbicos, três fases podem estar simultaneamente presentes durante a polimerização em emulsão: a fase aquosa (contendo iniciador, emulsificante, micelas e monômero dissolvido), gotas de monômero dispersas na fase aquosa e estabilizadas pelo emulsificante e partículas de látex (contendo polímero e monômero) estabilizadas por um emulsificante⁷⁹.

Geralmente, partículas menores são formadas e por consequência, um número maior de partículas. Os autores atribuem esse comportamento ao mecanismo de nucleação homogênea que está diretamente relacionado com a solubilidade dos monômeros em água⁸⁰.

A polimerização em emulsão pode ser conduzida utilizando-se o mecanismo clássico radicalar (*via* “Radicais Livres”). Neste método, existem três diferentes etapas reacionais principais: iniciação, propagação e terminação (Figura 13). Na iniciação irá ocorrer a formação de espécies reativas, onde as pequenas partículas são formadas e rapidamente inchadas com o monômero. Este intervalo corresponde ao início da polimerização em emulsão e é conhecido como a etapa de nucleação das partículas^{81,82}.

Na propagação, o núcleo reativo que foi formado na iniciação se adiciona a uma molécula de monômero formando um novo núcleo reativo, de cadeia maior e assim sucessivamente atingindo assim a fase do crescimento da macromolécula⁷⁹.

Uma vez que o sistema é constituído exclusivamente de partículas de polímero inchadas pelo monômero, a velocidade de polimerização diminui progressivamente devido ao desaparecimento do monômero dentro das partículas, sendo chamada de terminação, pois acarreta na terminação do crescimento da macromolécula.

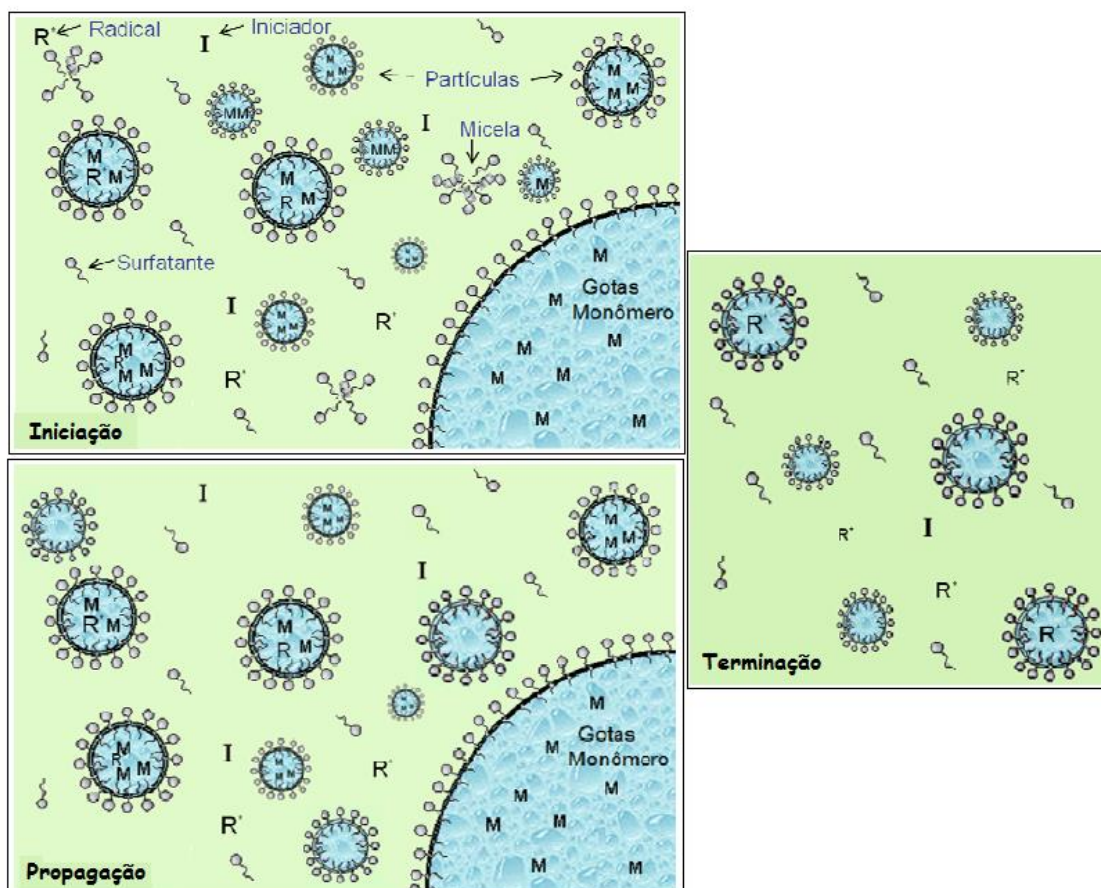


Figura 13: Esquema representativo das etapas de iniciação, propagação e terminação da polimerização em emulsão⁷⁹.

Microesferas de poliestireno fluorescentes de 9,2 μm foram sintetizadas pela polimerização em *seed*⁸³, que consiste em preparar uma emulsão capaz de produzir microesferas com tamanhos maiores, usando estireno como monômero e divinilbenzeno como reticulante⁸¹. Estas microesferas foram coradas a partir do método de emulsificação/evaporação de solvente com os corantes rodamina 101 e acridina, tendo apresentado grande emissão de fluorescência quando comparadas à microesferas de poliestireno comerciais, com possibilidade de uso em análise de citometria de fluxo⁷⁸ e de multiplex.

O uso de PS, poliacrilamida e PDMA para a produção de microesferas permite que a incorporação ocorra simplesmente pela adsorção ao polímero em um solvente que contenha um determinado corante fluorescente. A Tabela 2 mostra exemplos de condições nas quais alguns polímeros têm sido usados na produção de microesferas⁸⁴.

Tabela 2. Polímeros usados na produção de microesferas.

| Polímero | Solvente | Tamanho | Método |
|----------------|---------------------------|--------------|--------------------------|
| Poliestireno | Tolueno/CHCl ₃ | 0,1 -5 µm | Polimerização em Emulsão |
| PDMA | THF/H ₂ O | 0,15-10µm | Polimerização em Emulsão |
| Poliacrilamida | --- | 20 – 100 nm | Polimerização em Emulsão |
| Ormosil* | --- | 100 – 800 nm | Polimerização |

*Silicato organicamente modificado.

Uma alternativa para evitar a lixiviação do fluoróforo é o encapsulamento do mesmo no centro hidrofóbico da nanopartícula polimérica, utilizando para isso processos de polimerização em emulsão. Neste caso o corante pode ser adicionado na fase orgânica⁸⁵. Outras formas eficientes de se obter microesferas poliméricas contendo fluoróforos ligados covalentemente na rede pode se dar através do uso de técnicas de polimerização radicalar, ATRP e RAFT⁸⁶.

Existem vários métodos para a obtenção das microesferas como: copolimerização⁸⁷, dispersão⁸⁸, suspensão⁸⁹, emulsão⁹⁰ e polimerização por miniemulsão^{91,92}. Recentemente muitos artigos discutiram o uso da polimerização em suspensão, pois é considerada mais apropriada, já que promove a produção de microesferas com tamanhos superiores a 20 µm⁹³.

Nas seções seguintes serão apresentados os diferentes métodos de preparação de microesferas poliméricas empregados nesse trabalho.

3.5. POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO

Miniemulsões são classicamente definidas como dispersões aquosas de gotículas de óleo relativamente estáveis dentro de uma faixa de tamanhos de 50-500 nm, preparadas por um sistema contendo óleo, água, um surfactante e um coestabilizador^{93,94}. O princípio da polimerização em miniemulsão é iniciar a polimerização em cada uma das gotículas formadas, isso significa que, a polimerização ocorre em nanogotas ou nanoreatores⁹³.

Como em qualquer sistema heterogêneo, existem pelo menos duas fases: uma fase contínua e uma fase dispersa. A fase contínua normalmente representa a maior fração do sistema, sendo constituída por um líquido dispersante e a fase dispersa é constituída principalmente pelo monômero ou mistura de comonômeros⁹⁵. Na primeira etapa do processo de polimerização em miniemulsão, pequenas gotas estáveis são formadas pela dispersão de um sistema contendo a fase dispersa (fase orgânica), a fase contínua (fase aquosa), um

surfactante e um coestabilizador (normalmente um hidrófobo, ou seja, sem afinidade com a água).

Como as miniemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, faz-se necessário também o uso de um agente surfactante, que diminui a tensão interfacial entre a fase dispersa e a fase contínua. Neste caso, diferentes agentes hidrofóbicos podem ser utilizados para estabilizar as miniemulsões, como por exemplo, alcanos de cadeias longas como o hexadecano. Para que ocorra a dispersão usa-se uma agitação com ultrassom ou homogeneizadores de alta pressão⁹⁶.

Atualmente, o ultrassom é usado especialmente para a homogeneização de quantidades pequenas, ao passo que um sistema dispersor de alta velocidade e um homogeneizador de alta pressão, são mais utilizados para a emulsificação de quantidades maiores.

De acordo com Landfester⁹⁷ a concentração do emulsificante e suas características químicas influenciam no tamanho da gota e na estabilidade do produto final da miniemulsão. Com uso de emulsificantes aniônicos ou catiônicos pode ser obter partículas com distribuição de tamanho entre 30 a 200 nm. Na segunda etapa, estas gotas são polimerizadas sem mudar suas identidades. O tamanho das gotas, diretamente depois da miniemulsão, depende principalmente da quantidade e tipo de surfactante e coestabilizador e das condições de dispersão. O princípio da polimerização em miniemulsão é representado na Figura 14:

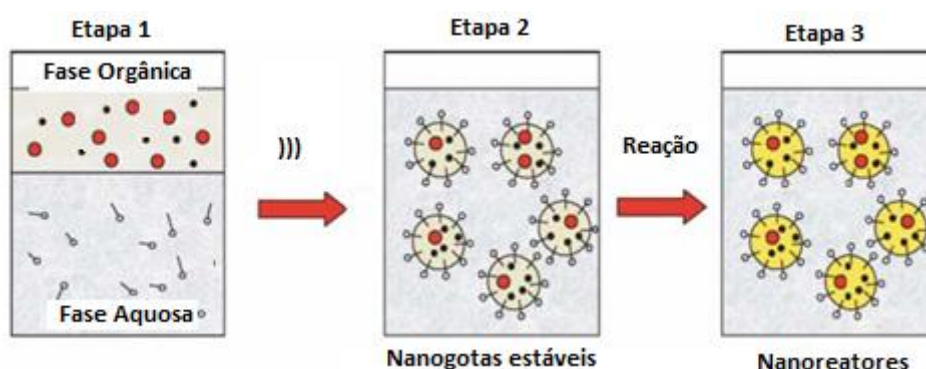


Figura 14: Esquema do princípio da polimerização em miniemulsão⁹⁸.

Na polimerização em miniemulsão, a nucleação ocorre nas gotas de monômero estabilizadas pelo surfactante sem que ocorra nucleação secundária ou transporte de massa das gotas para a fase aquosa. Este é o princípio básico da técnica de polimerização em miniemulsão, onde as gotas de monômero funcionam como “nanoreatores”. A preservação do

número de gotas estabilizadas/partículas e a distribuição de tamanhos de partícula é o principal desafio nesta técnica.

Uma das principais diferenças entre a polimerização em emulsão e a polimerização em miniemulsão está na etapa de nucleação das partículas. Na polimerização em emulsão, a formação das partículas ocorre em dois locais prováveis: nas micelas (nucleação micelar) e na fase aquosa (nucleação homogênea). Já na polimerização em miniemulsão o sistema é constituído exclusivamente por gotas de monômero estabilizadas por surfatantes e um agente hidrofóbico, predominando o mecanismo de nucleação das gotas^{97,98}.

Os primeiros relatos sobre o processo de polimerização em miniemulsão são devidos a Ugelstad e colaboradores⁹⁹, que realizaram a polimerização do estireno em um sistema onde um álcool de cadeia longa era disperso em mistura de água, persulfato de potássio e laurilsulfato de sódio na temperatura de 60°C, com agitação mecânica. O látex formado logo após a polimerização não depositava após vários dias. De acordo com os autores o tamanho da gota de monômero de estireno diminui, à medida que a estabilidade da miniemulsão aumenta a presença de hexadecano na fase dispersa evita a degradação do sistema por coalescência; o mecanismo de nucleação da gota predomina nesse sistema de polimerização por miniemulsão e o aumento de temperatura acelera o processo de degradação.

Em princípio, depois do preparo da miniemulsão, existem dois mecanismos que podem alterar o número e o tamanho das gotículas: a degradação difusional (*Ostwald Ripening*) e a coalescência^{100,101} entre as gotas, conforme Figura 15. Este fenômeno de degradação altera o número e o diâmetro médio das gotas e/ou partículas. A coalescência ocorre quando duas gotas se aproximam o suficiente para formar uma única gota maior. A degradação difusional ou molecular ocorre quando a diferença de pressão resulta em um fluxo de moléculas de monômero das gotas menores para as gotas maiores, originando assim gotas com maiores diâmetros¹⁰⁰.

A energia superficial das gotas pequenas é maior que das gotas grandes, consequentemente as moléculas de monômero das gotas menores entram então nas gotas maiores. Se as gotas não forem estabilizadas contra a degradação difusional, as gotas maiores tendem a crescer em função do desaparecimento das gotas menores, aumentando desta forma o diâmetro médio das gotas.

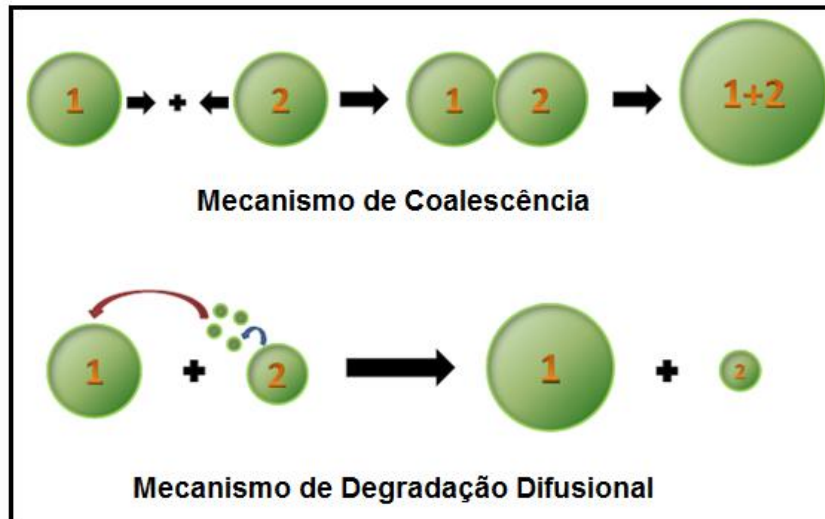


Figura 15: Esquema dos mecanismos de degradação das miniemulsões¹⁰¹.

A principal função de um agente hidrofóbico é tentar equilibrar o potencial químico no interior das gotas e evitar a difusão do monômero através da degradação difusional, prevenindo a difusão das gotas menores para as maiores e gerando assim uma pressão osmótica dentro das gotas de monômero⁹³.

A estabilização ocorrerá utilizando concentrações apropriadas de coestabilizador permitindo assim, uma maior estabilidade eletrostática e/ou estérica às gotas evitando a degradação por coalescência. A adição de 4 % de coestabilizador em relação à massa do monômero pode ser suficiente para reduzir a degradação difusional, conforme Schork et al¹⁰².

Já foi descrito na literatura⁹³ o efeito de estabilização pela adição do agente hidrofóbico. A taxa de degradação difusional depende do tamanho, da polidispersidade e da solubilidade da fase dispersa no meio contínuo, ou seja, um líquido hidrofóbico disperso em água na forma de pequenas gotas e com uma baixa polidispersidade pode apresentar um baixo fluxo de massa por difusão. No entanto a estabilidade destas gotas pode ser ainda aumentada pela adição de uma molécula mais hidrofóbica. Através de cálculos teóricos, verifica-se que a pressão de Laplace nestas gotas geradas após a miniemulsificação e a pressão osmótica gerada pelo agente hidrofóbico ainda não são totalmente contrabalanceadas, de modo que a pressão de Laplace ainda é maior¹⁰².

Por isso a estabilidade da miniemulsão é dita na literatura como sendo *metaestável* ou como um *pseudo-equilíbrio*, devido ao fato de se tratar de um sistema de estabilidade crítica,

ou seja, um estado que não apresenta equilíbrio termodinâmico devido à pressão de gota ser diferente de zero, mas que é caracterizado por apresentar um estado de igual pressão em todas as gotas⁹².

Evitando os mecanismos de degradação, a concentração de surfactante deve ser ajustada de acordo o material usado e o tamanho de gota que é resultante do processo de emulsificação para calcular a concentração de agente tensoativo ideal, além de saber o número de moléculas envolvidas na fase contínua. O comportamento da adsorção do surfactante é muito observado na polimerização em miniemulsão, onde as gotas são transformadas diretamente em partículas e a distribuição de tamanho da gotícula é importante para determinar as propriedades finais dos produtos. Apesar do mecanismo de nucleação de gotas ser a principal característica da miniemulsão, outros mecanismos de nucleação de partículas indesejados podem eventualmente ocorrer, tais como nucleação micelar¹⁰⁴ e a nucleação homogênea¹⁰⁵.

Na polimerização em miniemulsão são usados diferentes tipos de iniciadores que podem ser solúveis tanto na fase aquosa quanto na fase orgânica. Os iniciadores organossolúveis ajudam a minimizar o mecanismo da degradação e favorecem a nucleação das gotas de monômero, esperada nas reações de polimerização em miniemulsão. Por outro lado, pode ocorrer a terminação instantânea dos radicais formados na decomposição dos iniciadores organossolúveis dentro das gotas monoméricas.

Estudos realizados¹⁰⁷ avaliaram diferentes iniciadores organossolúveis como: peróxido de lauroíla (LPO), peróxido de benzoíla (BPO) e 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN) com diferente solubilidade em água e concluíram que os iniciadores com maior solubilidade na água, AIBN e BPO, não impediram a degradação de Ostwald das gotas de estireno.

A polimerização em miniemulsão não é limitada apenas para polimerização radicalar, outros tipos de polimerização também podem ser realizados. Polimerização aniônica pode ser usada para obter a poli(acrilamida), em miniemulsão não aquosa⁹⁵ e na fase aquosa, devido à reatividade de cianoacrilatos e poli(cianoacrilato de butila)⁹⁶. A polimerização catiônica de *p*-metoxiestireno também pode ser realizada em miniemulsão⁹⁷.

Existe já na literatura⁸⁵ a combinação das técnicas de miniemulsão e emulsificação/evaporação do solvente possibilitaram a síntese de nanoesferas biodegradáveis de PLLA- poli(ácido L-lático) e fluoróforo (N-(2,6-diisopropilfenil) perileno-3,4-dicarboximida) carregadas com partículas de óxido de ferro de diferentes tamanhos (10 e 25

nm), utilizadas como reservatório para liberação controlada de fármacos. A combinação das técnicas teve como objetivo alcançar uma maior eficiência de encapsulação dos compostos hidrofóbicos na matriz do polímero.

Os resultados indicaram nanoesferas uniformes e com um tamanho médio entre 80-120 nm, além de que a massa molecular do PLLA influenciava no tamanho das esferas obtidas. As nanopartículas magnéticas usadas exibiram um comportamento superparamagnético e com a incorporação adicional do corante fluorescente ao sistema é possível à aplicação das mesmas como marcadores, a fim de estudar, por exemplo, o mecanismo de captação celular^{85, 110}.

3.6. POLIMERIZAÇÃO RADICALAR POR TRANSFERÊNCIA DE ÁTOMO (ATRP)

As técnicas de polimerização radicalar controlada, consideradas polimerizações “vivas” (CRPs) vêm sendo muito investigadas nos últimos anos e suas inovações são consideradas importantes na nanotecnologia. Polímeros obtidos a partir dessas técnicas apresentam um amplo campo de aplicações, devido ao excelente controle sobre o processo de polimerização, com a possibilidade de obtenção de copolímeros em bloco e outras inúmeras arquiteturas poliméricas¹¹¹.

Essencialmente, as reações de polimerização radicalar livre envolvem um iniciador químico (I) responsável pela geração de espécies reativas (radicais livres, R^{\bullet})¹¹² através da sua decomposição e um monômero (M), que contenha uma dupla ligação reativa. Na sequência, há a combinação do radical primário com um monômero, resultando no início da formação da cadeia polimérica. A polimerização radicalar por transferência de átomo - ATRP é uma das técnicas mais importantes de polimerização radicalar controlada-viva. Desenvolvida pelos pesquisadores Matyjaszewski e Sawamoto em 1995¹¹³ a técnica possibilitou grandes mudanças na síntese de macromoléculas devido à facilidade da síntese. A vantagem da ATRP quando comparada com o processo radicalar convencional é o fato da polimerização se desenvolver com minimização das reações de terminação. Quando comparada com polimerizações iônicas, a ATRP é mais tolerante a monômeros funcionalizados, solvente e impurezas¹¹⁴.

Uma ampla variedade de monômeros pode ser polimerizada pelo processo ATRP, com bons resultados já descritos¹⁰³. Os monômeros mais utilizados são aqueles que possuem

substituinte que estabiliza o radical, para que possa haver a propagação. Isso inclui estireno e seus derivados, (met)acrilatos, (met)acrilamidas e acrilonitrila¹¹⁵.

Os iniciadores típicos de ATRP são derivados de halogenetos de alquilo cujos substituintes vão determinar os grupos terminais do polímero resultante. Assim sendo, o fator principal de reatividade concentra-se na energia de ligação C-X. Desta forma, a facilidade da homólise dessa ligação está na base de um iniciador de ATRP eficiente. Além disso, a ATRP pode ser realizada em meio polar ou apolar ou em sistemas heterogêneos como, por exemplo, em emulsão e suspensão.

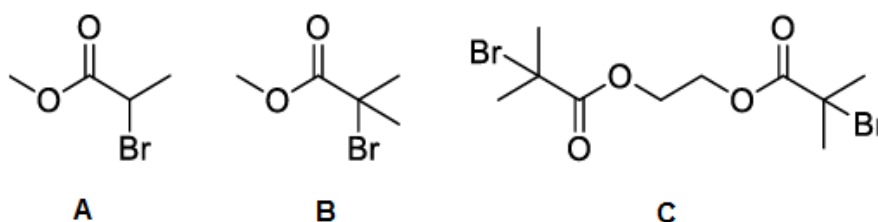


Figura 16: Alguns exemplos de iniciadores radiculares para reações ATRP.

Como se observa na Figura 16, existe uma grande variedade de iniciadores radiculares. Os compostos A e B apresentam o efeito da substituição da ligação C-X, sendo que o radical formado a partir de B é mais estável que o formado a partir de A, pois um radical terciário é mais estável que um secundário. O composto C evidencia a possibilidade de se preparar polímeros bi funcionais, possibilitando a formação de colpolímeros em bloco¹¹⁵.

A polimerização ATRP inicia com a cisão homolítica da ligação carbono-halogênio que é chamada de etapa de ativação e é promovida por um sal de metal de transição, que está coordenado com um ligante, em geral uma amina terciária polifuncional (Figura 17). A coordenação é necessária para tornar o sal de metal de transição solúvel no meio orgânico. O metal, em um estado de oxidação (M^n), se coordena então ao halogênio, provocando a cisão. O composto orgânico passa a ter um radical livre, tornando-se uma espécie ativa, enquanto o metal sofre oxidação em uma unidade. Assim, o radical livre inicia a propagação, provocando o crescimento da cadeia. O crescimento é interrompido quando a espécie ativa encontra um átomo de metal (M^{n+1}). O sal oxidado é denominado espécie desativadora, pois interrompe o crescimento da cadeia, tornando-a mais uma vez numa espécie dormente^{20, 115}.

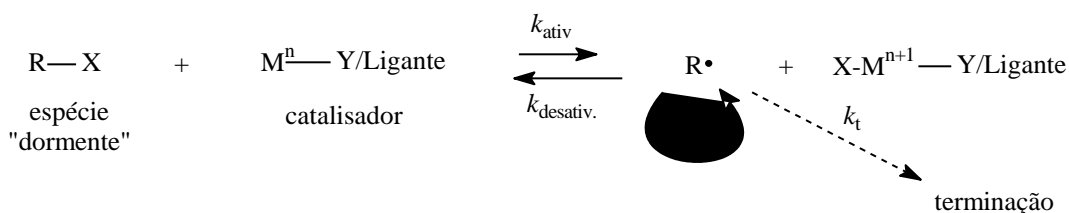


Figura 17: Esquema do mecanismo via ATRP. X e Y são átomos de halogênio. R é um radical orgânico. $k_{\text{ativ.}}$ Constante de ativação. $k_{\text{desativ.}}$ Constante de desativação. k_p constante de polimerização. k_t constante de terminação²⁰.

No caso da ATRP, a chamada espécie dormente é um composto halogenado (α -haloésteres)¹¹⁶. Os mais eficientes são os bromados e clorados. O radical livre formado não pode ser muito estável, pois isso aumentaria sua concentração no meio reacional, assim à polimerização perderia o controle vivo. Devido a isso nem todos compostos organo-halogenados podem ser iniciadores para ATRP.

Os ligantes utilizados no sistema catalítico da ATRP em geral são compostos nitrogenados, como aminas aromáticas e alifáticas. A função do ligante é tornar solúvel o sal de metal de transição, que normalmente não é solúvel em meio orgânico. Além disso, esses ligantes afetam o potencial redox do metal, aumentando ou diminuindo a ativação da espécie radical. Os ligantes nitrogenados são mais aplicados ao cobre e ao ferro e há uma ampla gama de diferentes estruturas, adequadas para cada tipo de sistema ou de monômero. As aminas alifáticas multidentadas são ligantes mais usuais e apresentam propriedades semelhantes e com menor custo de obtenção. Como não possuem um sistema conjugado com anel aromático, sua coloração no complexo é menos intensa que, por exemplo, nos derivados de bipyridina. Exemplos destes ligantes são: tetrametiletenodiamina (TMEDA), N,N,N',N'-pentametildietilenotriamina (PMDETA), e 1,1,4,7,10,10-hexametiltri-etilenotetraamina (HMTETA), conforme estruturas na Figura 18. O uso do PMDETA com o monômero estireno tem apresentado um grande aumento na taxa de polimerização¹¹⁷.

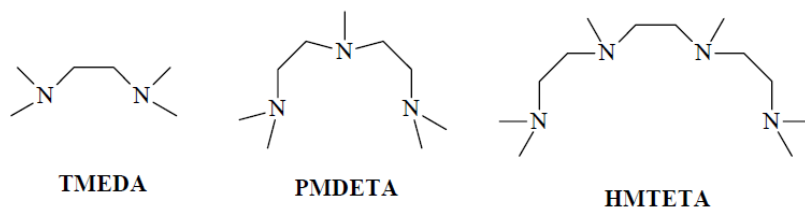


Figura 18: Aminas alifáticas tridentadas.

A técnica ATRP é eficiente no controle da polimerização radicalar de quase todos os tipos de monômeros e possibilita diferentes arquiteturas poliméricas (Figura 19) como: polímeros em dibloco, tribloco, copolímero de enxerto, estrela, entre outros. Dentre as principais desvantagens da técnica destaca-se a contaminação do meio reacional com metais de transição (por exemplo, o cobre e o ferro), o que gera a necessidade de purificação adicional, ou seja, a remoção completa do metal de transição, o que limita a técnica para uma aplicação em grande escala¹¹⁷.

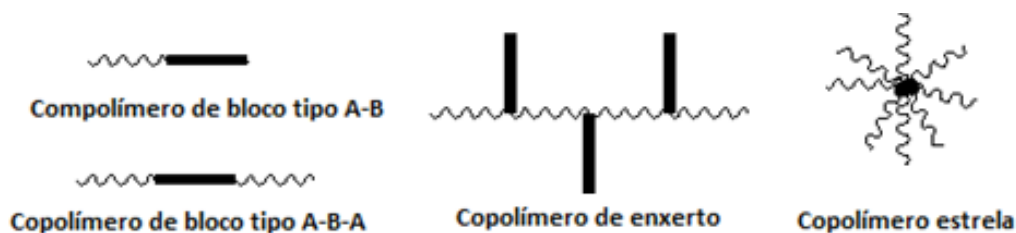


Figura 19: Alguns exemplos de arranjos possíveis de obtenção através das técnicas de polimerização controlada.

Zhang e colaboradores¹¹⁸ estudaram o comportamento de copolímeros de PS-*b*-PAA sintetizados via ATRP através de uma polimerização sequencial do acrilato de terc-butila (tBuA) e estireno. O poli-tBuA obtido foi, posteriormente convertido para poli(ácido acrílico) depois de ser hidrolisado com a adição de HCl.

Polímeros fluorescentes sintetizados via ATRP representam uma nova classe de polímeros e podem ser encarados como uma “impressão digital” do material possibilitando inclusive a identificação da proporcionalidade de um determinado composto em uma mistura de materiais. Polímeros fluorescentes podem ser sintetizados usando vários iniciadores contendo fluoróforos, tais como, 2-(4-clorometil-fenil) benzoazol (CMPB) e porfirinas¹¹⁹.

O uso de porfirinas funcionalizadas como iniciadores ATRP já é descrito na literatura⁵² com a polimerização de estireno na presença de um iniciador fluorescente de porfirina não ocorreu com 1 equivalente de CuBr, devido à inserção preferencial de Cu(II) para o núcleo da porfirina (Figura 20). No entanto, usando 2 e 10 equivalentes de CuBr a polimerização ocorreu, porém, usando 2 equivalentes a polimerização prosseguiu de forma controlada resultando em um poliestireno funcionalizado com porfirina. A polidispersão do polímero foi de 1,39 e a massa molecular ficou em 5.8 Kg.mol⁻¹.

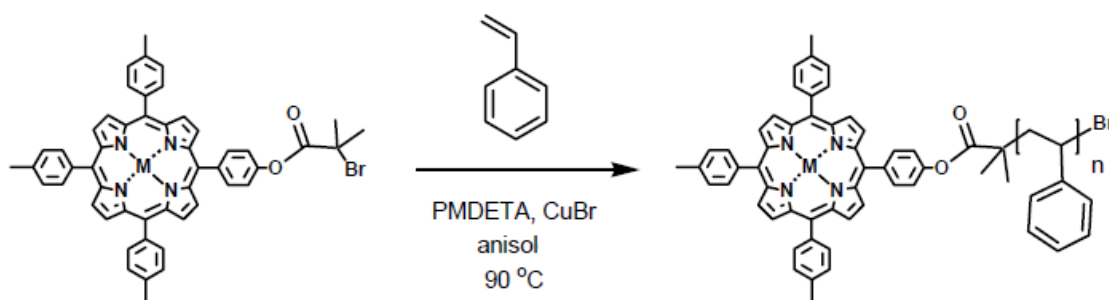


Figura 20: Polimerização do estireno usando porfirina funcionalizada como iniciador via ATRP⁵².

Foi observado massas molares maiores usando 10 equivalentes de CuBr que o esperado na razão entre monômero e iniciador. Além disso, em massas molares menores foi observado bandas de absorção em $\lambda = 420$ nm e uma banda mais fraca em $\lambda = 254$ nm, indicando a presença de uma grande concentração de porfirina que não polimerizou com o monômero. Possivelmente, devido ao aumento da concentração Cu(I) pode gerar um aumento no número de radicais aumentando assim as reações de terminação.

O uso de dimetilamina chalcona é bem conhecido como composto fluorescente, com alto rendimento quântico e amplamente utilizado como sonda fluorescente ou material fotossensível¹²⁰. Os polímeros funcionalizados com dimetilamina chalcona são considerados bons candidatos devido a sua elevada temperatura de decomposição térmica e boa capacidade em formar filmes.

Danko e colaboradores¹²¹ investigaram propriedades de chalconas contendo trifetilamina como unidade estrutural em matrizes de polímeros como: poliestireno (PS), poli(metacrilato de metila) (PMMA) e poli(cloreto de vinila) (PVC). Mostraram que a fluorescência se torna mais intensa quando a molécula está incorporada a uma matriz de polímero. A ideia de colocar um único cromóforo em uma cadeia polimérica e a amplificação desse efeito ao longo dela, motiva as pesquisas na área de ciência de polímeros. Usando a técnica ATRP é possível colocar um fluoróforo numa posição definida na cadeia do polímero¹¹⁵.

A polimerização do estireno foi realizada usando o 4-(3-(4-(dimetilamino-fenil-acril)fenil-2-bromo-2-metilpropanoato (APPBr) como iniciador, em ciclohexano a 80 °C, numa proporção: [St]:[APPBr]:[CuBr]:[PMDETA]=200:1:1:2 (Figura 21). Os resultados mostraram uma linearidade na curva $\ln([Mn]_0/[M])$ versus tempo de polimerização, indicando uma

polimerização de primeira ordem em relação ao monômero. A polidispersão se manteve estreita em todos os casos, indicando que a polimerização foi controlada ($PDI=1,19-1,22$)¹²¹.

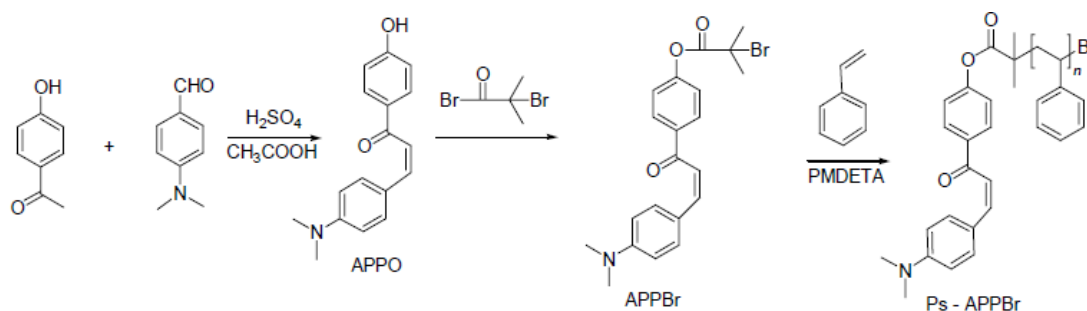


Figura 21: Esquema da síntese do iniciador e do polímero¹²¹.

A síntese de polímeros com composições bem definidas, arquiteturas e funcionalidades é de grande interesse, uma vez que a funcionalidade é muito atrativa por causa das diversas aplicações que pode ser prevista a esse tipo de material.

3.7. PARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO

Partículas em nanoescala têm atraído cada vez mais atenções devido as suas características únicas e são utilizadas em várias aplicações médicas desde os anos 70¹²². Existem diversos tipos de nanopartículas magnéticas constituídas por diferentes metais que podem ser usados para os mesmos fins, como por exemplo, magnetita (Fe₃O₄), magnemita (γ -Fe₂O₃), óxido de ferro cobalto (CoFe₂O₄), ferrita de zinco e cobalto (Co_{0,5}Zn_{0,5}Fe₂O₄), ferrite de bário (BaFe₁₂O₁₉), ferrite de estrôncio (SrFe₁₂O₁₉) entre outros.

Apesar do grande número de nanopartículas magnéticas, a atenção especial é dada para a nanopartícula de magnetita superparamagnética (Fe₃O₄) devido as suas excelentes características como a biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixa suscetibilidade magnética para a oxidação, retenção magnética apenas quando existe aplicação de um campo externo magnético e intenso comportamento ferromagnético¹²³.

Essas nanopartículas de ferro (também conhecidas por SPIONs) têm contribuído para a sua vasta utilização em aplicações biomédicas, pois quando injetadas no organismo, podem atingir uma determinada zona de interesse através da aplicação de um campo magnético

externo. Além de aplicações para a liberação controlada de fármacos, hipertermia, diagnóstico por ressonância magnética de imagem, entre outras¹²⁴.

Microesferas fluorescentes e magnéticas são importantes para a produção de tecnologias de microarranjos líquidos, pois além de serem fluorescentes, as microesferas devem possuir a propriedade magnética a fim de facilitar uma das etapas de purificação do processo de diagnóstico. Desta forma, as microesferas mantem-se aderidas a uma placa magnética enquanto podem ser lavadas para remover os analitos que permanecem em excesso (Figura 22).

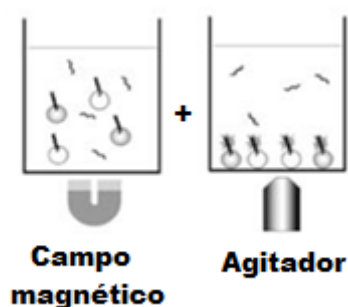
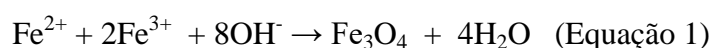


Figura 22: Esquema ilustrativo microesfera magnetizada e a sua separação por magnetização¹²⁵.

O tamanho, forma e composição das magnetitas (Fe_3O_4) dependem do tipo de sal, da razão estequiométrica que não deve ser menor que 2, evitando a oxidação dos íons devido a presença de ar, temperatura e principalmente o pH¹²². As propriedades físicas e químicas uniformes dependem fortemente do tamanho da partícula e da distribuição do tamanho. Várias técnicas podem ser usadas para a preparação das nanopartículas magnéticas como: decomposição térmica¹²⁶, síntese hidrotérmica¹²⁷ e a química de coprecipitação alcalina¹²⁸ de íons Fe^{+2} e Fe^{+3} , considerado um dos métodos mais simples.

Neste contexto, a química de coprecipitação¹²⁶ vem sendo amplamente utilizada na produção de nanopartículas magnéticas devido à facilidade e rendimento na produção. O método de coprecipitação consiste na junção de quantidades estequiométricas de sais Fe^{+2} e Fe^{+3} , em solução básica promovendo assim a precipitação da magnetita conforme a equação:



De acordo com a reação uma razão molar de Fe^{3+} : Fe^{2+} de 2:1 é necessária para que ocorra a produção de Fe_3O_4 ¹²⁹. Entretanto, quando a preparação é realizada ao ar, o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} ($\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}$), então para manter essa proporção usa-se atmosfera inerte

durante a reação, pois o ar dissolvido na água pode levar à oxidação. Além de evitar a oxidação das partículas, reduz a toxicidade, a agregação e o tamanho das partículas¹²².

A magnetita produzida a partir do método de coprecipitação é mais sensível à oxidação ao ar e a presença de ar dissolvido na água. A presença ou não de oxigênio durante o método pode facilitar a formação de outras fases cristalinas como magnemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e hidróxido de ferro III. Já a fase hematita é bem mais difícil de se formar ocorrendo somente em condições de desidratação térmica¹²⁶.

Muitos trabalhos têm investigado o tipo de atmosfera utilizada e a influência da estequiometria nas propriedades das partículas. Kim et al. sintetizaram partículas magnéticas com razão molar de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}=2$, sob atmosfera de nitrogênio e aquecimento. Concluíram que o uso do nitrogênio preveniu a oxidação das partículas e causou uma pequena redução no tamanho, variando de 8 para 6 nm¹³⁰.

Maity et al. estudaram a influência da estequiometria sob atmosfera ambiente e aquecimento na razão molar de $\text{Fe}^{+3}:\text{Fe}^{+2}= 2:1, 1,7:1$ e $1,5:1$. Os resultados mostraram que o aquecimento durante o preparo das nanopartículas e atmosfera oxidante causaram a formação de outras fases cristalinas, principalmente em altas razões e uma diminuição nos valores referentes à magnetização¹³¹.

Na literatura encontra-se a síntese de nanopartículas de magnetita, isentas das outras fases cristalinas, com aproximadamente 13 nm produzidas a temperatura ambiente com estequiometria de $\text{Fe}^{+3}:\text{Fe}^{+2}= 2$ e mantendo as propriedades magnéticas¹³².

O tamanho final das partículas magnéticas é importante, uma vez que precisam permanecer estáveis em meio líquido e para que isso ocorra é necessário vencer as interações do tipo van der Waals e magnéticas. A alternativa para minimizar essas interações é a adição de um agente compatibilizante ou um surfactante às nanopartículas. A modificação da superfície das mesmas é essencial para a inibição da agregação entre elas, para o controle das interações e da dispersibilidade em solvente orgânico¹³³.

Para a produção de nanopartículas de óxido de ferro é importante o cuidado no tipo de surfactante usado, que podem ser: ácidos graxos insaturados (ácido oleico) e saturados (esteárico e palmítico) e sais derivados (surfactantes) (oleato de sódio e oleato de amônio). Estes são usados para a cobertura de partículas que necessitam ser dispersas em meio apolar, enquanto que polímeros a base de ácidos acrílicos tem sido utilizado quando o líquido a ser disperso é a água ou outro meio polar. O ácido oleico tem sido o surfactante mais efetivo para

magnetita, devido a sua hidrofobicidade e a sua conformação, pois é um ácido carboxílico de cadeia longa e insaturada ($C_{18}H_{34}O_2$) e a dupla no meio da cadeia (carbono 9) promove uma maior organização das moléculas do ácido na superfície da partícula^{122,134}. O ácido oleico também é usado para prevenir a aglomeração das nanopartículas e ajuda a manter a sua forma esférica original. É o surfactante mais utilizado para modificar a superfície das nanopartículas magnéticas, uma vez que possui maior afinidade com a superfície da magnetite quando comparado com outros surfactantes¹³⁵.

Ocorre também o envolvimento dos pares eletrônicos que sofrem repulsão eletrônica com os pares eletrônicos de uma cadeia de ácido adjacente, fazendo com que suas moléculas fiquem orientadas de forma radial na superfície da partícula, de acordo com a Figura 18. Devido, ao tamanho da cadeia do ácido oleico acontece uma repulsão estérica entre as cadeias de partículas permitindo a estabilidade destas partículas em um meio orgânico.

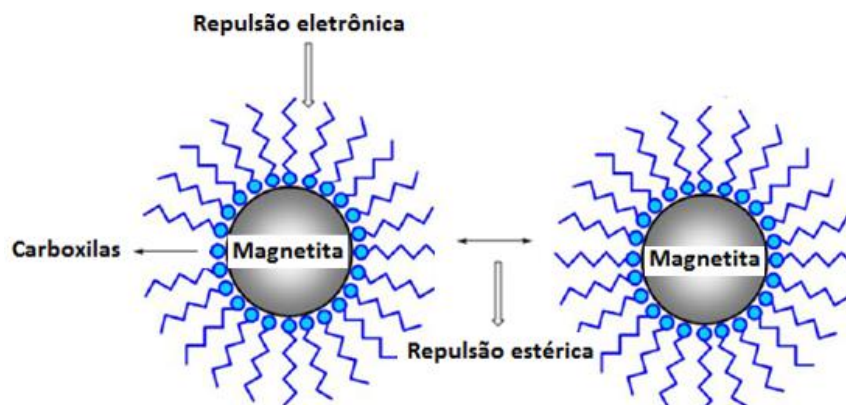


Figura 23: Representação da estabilização das partículas de magnetita pela interação da extremidade polar das moléculas de ácido oleico com a superfície do óxido.

3.7.1 Comportamento Magnético

Os materiais magnéticos reagem ao efeito de aplicação de um campo magnético externo, pois a natureza desses materiais podem ser forças repulsivas ou atrativas, descritas em termos da formação de dipolos magnéticos, que podem ser considerados de forma simples, como minúsculas barras magnéticas que possuem polos opostos. As descrições das orientações magnéticas de um material ajudam a identificar as diferentes formas de magnetismo observadas na natureza. Assim, se o material magnético é colocado em um campo magnético H , ocorre uma indução magnética, descrita pela Equação(1)¹³⁶.

$$B = \mu_0(H + M), \quad (\text{Equação 2})$$

Onde o μ_0 é a permeabilidade do espaço livre, M é a magnetização ($M=m/V$, momento magnético m por unidade de volume V do material). Todos os materiais magnéticos são, em certa medida, resposta em função da sua estrutura atômica e temperatura. Podem ser classificados em termos de sua susceptibilidade magnética, χ ,

$$M = \chi \cdot H, \quad (\text{Equação 3})$$

que descreve a magnetização induzida num material por H. Em unidades SI, χ é adimensional, M e H são expressos em $A \cdot m^{-1}$ (Oe). A maioria dos materiais exibe baixo magnetismo, e, mesmo assim, apenas na presença de um campo aplicado. Os tipos básicos de magnetismo podem ser: paramagnetismo, diamagnetismo, antiferromagnetismo, ferromagnetismo, ferrimagnetismo e superparamagnetismo¹³⁷.

O material será diamagnético quando não tem dipolos magnéticos na ausência de um campo magnético externo, mas pela sua aplicação surgem dipolos magnéticos fracos. A magnetização de um material diamagnético ocorre na direção oposta à do campo, resultando numa força repulsiva fraca. O material é designado paramagnético quando apresenta dipolos magnéticos orientados aleatoriamente, mas que podem ser alinhados por ação de um campo magnético externo. A magnetização do material paramagnético ocorre na mesma direção do campo externo e são caracterizados por uma interação fraca entre os dipolos.

Em materiais ferromagnéticos, os dipolos magnéticos existem mesmo na ausência do campo magnético externo apresentando um momento magnético permanente (Figura 24). Na curva de magnetização desses materiais, a magnetização encontra-se sempre defasada do campo magnético aplicado, o que origina um ciclo de histerese devido à presença de domínios magnéticos no material.

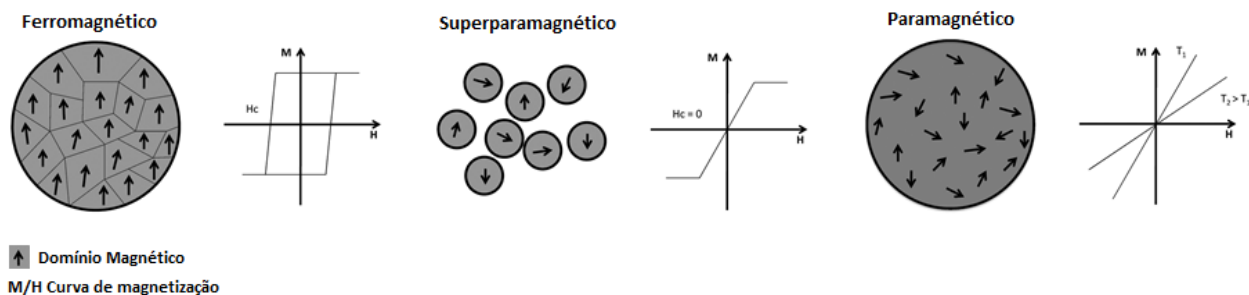


Figura 24: Diferentes tipos de comportamento magnético.

A partir da análise da curva de magnetização é possível obter o valor da magnetização de saturação, M_s , ou o valor máximo de M , a magnetização remanescente, M_r , ou a magnetização residual na ausência de campo, a coercibilidade, H_c , ou o valor do campo externo que é necessário para reduzir a magnetização de volta a zero (Figura 25).

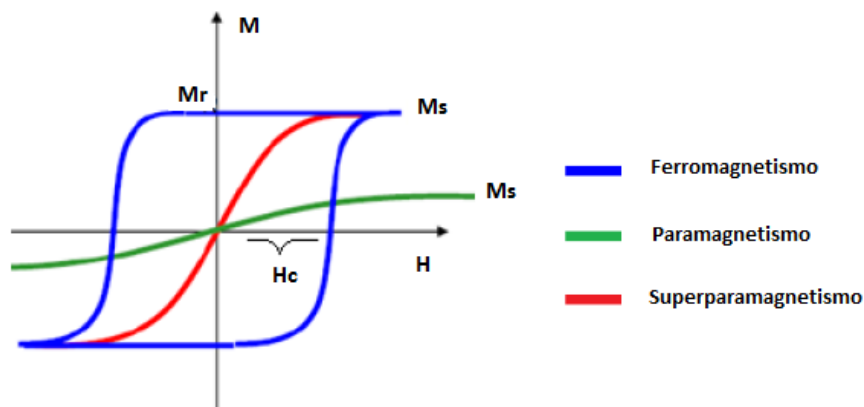


Figura 25: Curva de histerese de materiais magnéticos, em que M é a magnetização, H é o campo magnético aplicado, M_s é a magnetização de saturação, H_c é a força coerciva. No superparamagnetismo a magnetização de saturação (M_s) é muito elevada, então não há remanência ($M_r=0$). (adaptado¹³⁸)

A diferença na origem do momento magnético permanente pode também ser usada para distinguir ferromagnetismo de ferrimagnetismo e de antiferrimagnetismo. No material ferrimagnético existem sempre dipolos magnéticos mais fracos alinhados antiparalelamente com os dipolos magnéticos mais fortes adjacentes, na ausência de campo magnético externo. Alguns exemplos de materiais ferrimagnéticos são os óxidos de ferro como: magnetita, Fe_3O_4 e a magnemita, $\gamma-Fe_2O_3$. Para materiais antiferrimagnéticos, os dipolos adjacentes são antiparalelos na ausência de um campo externo, cancelando-se mutuamente.

3.7.2 Superparamagnetismo

As nanopartículas magnéticas exibem propriedades muito interessantes, principalmente, na medicina e biologia com a imobilização de ácidos nucleicos, proteínas e enzimas e na liberação controlada de drogas. O objetivo desses sistemas é manter a concentração do fármaco e principalmente o direcionamento do mesmo a sítios-alvos específicos no organismo. Esse objetivo só é atingido através do encapsulamento do fármaco pelo polímero e o revestimento magnético. Pois esses compósitos são injetados nos vasos sanguíneos e direcionados para regiões específicas com um campo magnético externo e só então o medicamento é liberado. A principal vantagem do revestimento das partículas magnéticas por uma camada polimérica é a prevenção do material inorgânico não entrar em contato direto com o corpo, reduzindo assim sua toxicidade^{85,139}.

Essas propriedades magnéticas interessantes dependem do comportamento superparamagnético das nanopartículas que ocorre com nanopartículas ferromagnéticas ou ferrimagnéticas que possuem domínio único. Os domínios são grupos de spins que giram apontando na mesma direção e agindo cooperativamente, separados por paredes de domínio que possuem uma energia associada. A diminuição do tamanho das partículas magnéticas com multidomínios resulta na formação de partículas com monodomínios que originam o fenômeno do superparamagnetismo. Em uma partícula monodomínio, a mudança na orientação da magnetização ocorre através de uma rotação coerente de spins, o que origina uma coercibilidade (H_c) relativamente elevada. Se o tamanho da partícula for muito reduzido à energia de agitação térmica é suficiente para desalinhar a orientação do componente da magnetização, de tal forma que na ausência de um campo magnético externo a magnetização resultante é nula¹⁴⁰.

No comportamento superparamagnético o material só deve possuir magnetismo enquanto o campo H_e é aplicado e no momento em que o campo é retirado o magnetismo deve cessar¹⁴¹. No caso, por exemplo, de resinas poliméricas magnéticas e microesferas magnéticas o comportamento superparamagnético é muito importante, pois se a magnetização após a aplicação do campo não cessar, as microesferas podem permanecer aglomeradas, dificultando o processo de regeneração.

Microesferas poliméricas com propriedades magnéticas à base de estireno, divinilbenzeno e acetato de vinila foram obtidas via polimerização em suspensão. O copolímero com 90% de acetato de vinila e isento de estireno, apresentou maior

magnetização de saturação ($73,75 \text{ meu.g}^{-1}$) e o maior teor de ferro incorporado (31,1 %). O copolímero com 50 % de acetado de vinila apresentou menor curva de magnetização de saturação ($22,62 \text{ meu.g}^{-1}$) e o menor teor de ferro incorporado (12,7 %) ¹⁴¹.

O sucesso para a produção de nanocompósitos magnéticos depende fundamentalmente da compatibilidade das nanocargas magnéticas com a matriz do polímero, em particular em polímeros hidrofóbicos onde a superfície de modificação de partículas nanomagnéticas hidrofílicas desempenha um papel importante na morfologia final do material magnético-polímero. ¹³¹

Já é descrito na literatura nanopartículas poliméricas magnéticas homogêneas e funcionalizadas com ácido acrílico. A síntese utiliza o método de coprecipitação com NH_4OH a temperatura ambiente sob atmosfera de N_2 e com a técnica de polimerização em miniemulsão, misturando os monômeros estireno e ácido acrílico ¹⁴². O resultado foram nanopartículas magnéticas modificadas com ácido oleico com um tamanho médio de 9 nm e com 80,5% de teor magnético, usando uma proporção de $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ (2: 1) durante o preparo.

Nanopartículas magnéticas já foram dispersas em estireno/ácido acrílico (St/AA) e estireno/divinilbenzeno/ácido acrílico (St/DVB/AA) e polimerizadas por miniemulsão ¹⁴³. O DVB agiu como um agente reticulante, aumentando a viscosidade das partículas durante o processo de polimerização. Os resultados mostraram que o uso do DVB promoveu a produção de nanopartículas com a carga magnética mais bem distribuída do que sem o uso do mesmo (Figura 26).

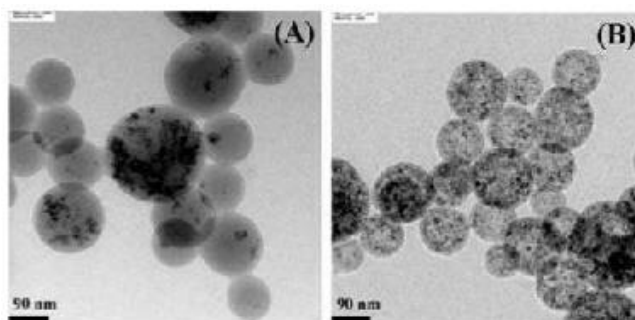


Figura 26: Microscopia de TEM (A) PS/AA-NPM e (B) PS/DVB/AA-NPM ¹⁴³.

Além disso, as nanopartículas magnéticas apresentaram 53% de carga magnética e um comportamento superparamagnético, sendo assim, adequadas a aplicações biomédicas após a modificação de superfície.

A técnica de miniemulsão e de microemulsão tem sido amplamente usada devido à facilidade para obtenção de superfície funcional. Liu et al. prepararam com sucesso microesferas magnéticas com grupos NH_2 localizados na superfície usando microemulsão e prepararam nanoanéis superparamagnéticos de poliestireno e Fe_3O_4 por polimerização em miniemulsão, mas não explicaram como foi realizado o controle da morfologia¹⁴⁴.

Joumaa et al. demonstraram o uso da polimerização em miniemulsão para encapsular nanopartículas de óxidos de ferro em partículas de poliestireno submicrométricas. Os resultados mostraram que a polimerização em miniemulsão não foi capaz de encapsular as partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, levando a uma distribuição heterogênea das partículas com a matriz do polímero, provavelmente devido ao fenômeno de agregação das partículas magnéticas com o resultado do baixo grau de compatibilização entre o agente compatibilizante utilizado para a modificação da superfície das nanopartículas e a matriz polimérica¹⁴⁵.

Estudos sobre o controle da morfologia e do tamanho das microesferas magnéticas com superfícies funcionalizadas foram realizados usando método simples de um passo e com grupo NH_2 localizado na superfície das partículas. Produziram microesferas magnéticas de poli(estireno-co-ácido acrílico-co-acrilato de metila) com grupos aminos. As morfologias tipo sólidas, esféricas, anel e cavidade foram obtidas ajustando as quantidades de monômeros na copolimerização. A viscosidade da fase aquosa pode ser o principal fator de formação das microesferas e morfologias. A presença do grupo amino possibilita a imobilização de proteínas ou enzimas e a morfologia cavidade é favorável para o carregamento e liberação de drogas¹⁴⁶.

Microesferas magnéticas com tamanho em torno de $50\ \mu\text{m}$, com diferentes grupos funcionais foram preparadas a partir de uma etapa de copolimerização em suspensão com os monômeros: estireno, divinil benzeno e metacrilato de metila na presença de nanopartículas magnéticas modificadas com ácido oleico. Todas as amostras apresentaram formato esférico e tamanho uniforme, além da viabilidade de grupos NH_2 e COOH na superfície das microesferas magnéticas¹⁴⁷.

O estudo da morfologia de microesferas magnéticas de estireno ($\text{PS}/\text{Fe}_3\text{O}_4$) usando AIBN como iniciador via polimerização em miniemulsão. Observaram uma mudança na morfologia com a concentração do surfactante SDS ou tipo de coestabilizador usado, além da taxa de amplitude do ultrassom durante a homogeneização. À medida que a quantidade de surfactante SDS foi aumentada em 20, 35 a 70 mmol, ocorreu um aumento da estabilidade na

interface e os monômeros formaram gotículas menores. Como essas gotículas atuam como minireatores, a taxa de polimerização aumentou e o tamanho das partículas diminuiu¹⁴⁷.

Quando foi usada uma alta amplitude para homogeneização o material magnético ficou localizado sobre a superfície do PS e em baixa amplitude distribuído mais uniformemente na matriz do polímero. Concluíram também que devido à presença do íon Fe^{+3} e do Fe_3O_4 , a taxa de polimerização diminuiu, pois atuaram como inibidores dos radicais livres, ou seja, quanto maior o teor de Fe_3O_4 menor o rendimento da polimerização.

Investigaram, também, a possibilidade de ligar covalentemente o anticorpo na superfície da microesfera empregando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxisucinimida éster em solução. As microesferas magnéticas foram marcadas com IgG-FITG (marcador fluorescente usado para conjugar proteínas via grupo amino) e mostraram grande potencial tecnológico, principalmente na citometria de fluxo¹⁴⁸.

Para mapeamento de imagens e em termos de comparação com o modelo de detecção de sensor fluorescente tradicional, desenvolveram uma nova estratégia para a obtenção de nanopartículas magnéticas, fluorescentes e ativas na região do infravermelho próximo. Empregaram com sucesso a técnica de polimerização radicalar de transferências de átomos de superfície iniciada (Si-AGET-ATRP) para preparar nanopartículas fluorescentes. As nanopartículas de óxido de ferro foram modificadas com tetraetoxissilano e 3-aminopropil-trietoxissilano contendo grupos de iniciadores ATRP ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Br}$) e tiveram sua superfície grafitada (1) e posteriormente funcionalizada com grupos carboxilas (2) para finalmente, a inserção da benzo[a]fenoxazina (3) formando uma ligação estável (Figura 27)¹⁴⁹.

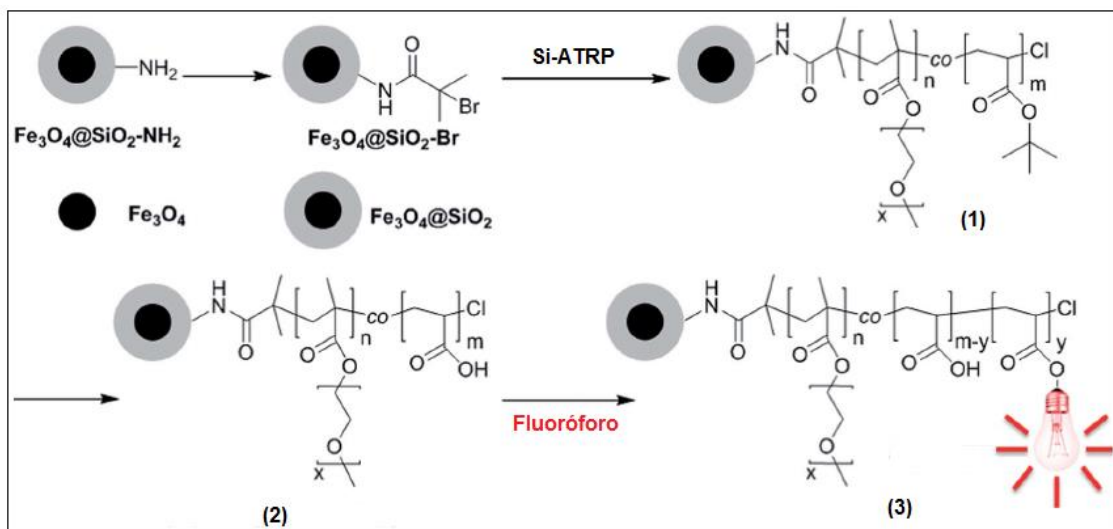


Figura 27: Esquema da preparação de nanopartículas fluorescente e magnéticas¹⁴⁹.

Após de todo processo as nanopartículas apresentaram grande solubilidade e estabilidade além de boa dispersão em meio aquoso, devido principalmente ao uso do metacrilato de metila.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

Todos os materiais foram adquiridos de fornecedores locais e usados conforme recebidos, ao menos quando descrito. Poliestireno comercial foi fornecido pela empresa INNOVA, com massa de 137.500 g/mol e polidispersão (PDI) 2,0 e usado conforme fornecido.

O monômero estireno (St) foi cedido pela empresa INNOVA e purificado por destilação antes do uso. Para a destilação, usou-se em um balão de 500 mL, cerca de 150 mL de estireno com hidreto de cálcio sob agitação durante 24 h. Antes de iniciada a destilação foi adicionada uma pequena quantidade de antioxidante BHT (hidroxitolueno butilato) para evitar a polimerização do St (estireno). A primeira alíquota de 10 mL foi descartada.

O iniciador 2'2 azobisisobutironitrila -AIBN (Merck) foi recristalizado antes do uso para evitar impurezas. Aproximadamente 1 g de AIBN foi dissolvido em 40 mL de metanol comercial e deixado em agitação por 3 h e filtrado a solução foi armazenada em geladeira por 24 h para a cristalização do AIBN. O excesso de metanol foi retirado e o AIBN seco em estufa a vácuo a temperatura ambiente.

Os fluoróforos e os iniciadores fluorescentes (IF) utilizados neste trabalho foram sintetizados pelo Grupo de Pesquisa em Fotoquímica Orgânica Aplicada do Instituto de Química desta Universidade conforme procedimentos descritos na literatura^{15, 16}. A Figura 28 mostra a estrutura da Cianina **1** e das Esquaraínas **2-3** empregadas nesse trabalho para a obtenção das microesferas fluorescentes.

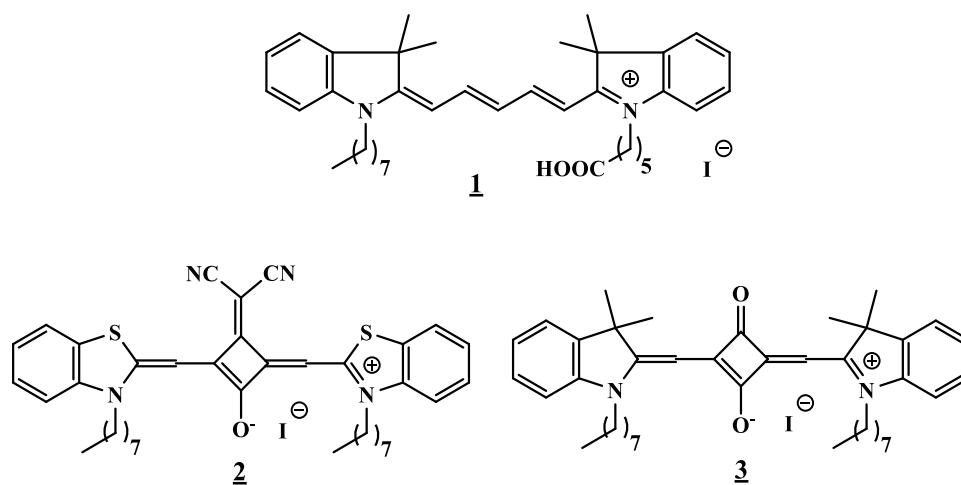


Figura 28: Estruturas do fluoróforo (cianina **1**) e dos fluoróforos (esquaraína) **2-3** utilizadas na obtenção das microesferas fluorescentes de poliestireno.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 QUANTIFICAÇÃO, PREPARO DAS SOLUÇÕES E CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.

Para o cálculo de incorporação dos fluoróforo, utilizou-se a espectrofotometria (UV-VIS) com aplicação de Lei de Lambert-beer. Para isso, os fluoróforos e as amostras foram solubilizados em solventes orgânicos para a determinação espectrofotométrica. A incorporação foi calculada através da equação de Lambert-Beer após a leitura da absorção das amostras em solução no comprimento de onda específico para cada fluoróforo, utilizando assim os valores de suas absorvidades molares.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Equação 4})$$

A relação em que A é a Absorbância (da solução no comprimento de onda λ); ε é a absorvidade molar; b, o percurso da luz em solução em cm; e c, a concentração da substância de interesse (mol/L).

4.2.2 MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE.

O método emulsificação/evaporação do solvente foi usado para a produção das microesferas de poliestireno e fluorescentes, técnica conhecida como emulsão óleo em água (O/A).

O método consiste na emulsificação de uma solução polimérica de 0,5g poliestireno ($M_w = 137000 \text{ g/mol}^{-1}$, PDI = 2,0) em 30 mL de clorofórmio - (Fase orgânica A). A fase aquosa consiste de uma solução de 100 mL água e 2,5g de poli(álcool vinílico) (PVA, $M_w = 50.000 - 31.000 \text{ g/mol}^{-1}$, 87,6% hidrolisado). Após solubilização completa dos polímeros, a solução orgânica foi adicionada, manualmente via pipeta Pastuer, gota a gota, à solução aquosa, na temperatura de 40 °C e mediante agitação intensa (entre 6000 – 10000 rpm) utilizando-se um agitador Ultra Turrax® T25, durante 5 min, como representado na Figura 29.

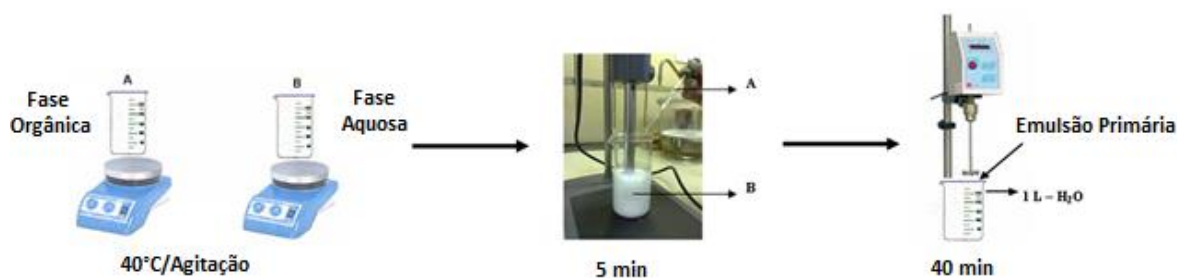


Figura 29: Procedimento para a obtenção de microesferas de poliestireno pelo método de emulsificação/evaporação do solvente.

À emulsão resultante foi adicionada meio litro de água deionizada sob agitação mecânica de 600 a 800 rpm, por 40 minutos. A solução leitosa resultante foi centrifugada e o precipitado, é seco em estufa a 40 °C por 8 horas. As microesferas no final do processo foram decantadas, centrifugadas, lavadas em água destilada para a remoção do agente tensoativo e do agente anticoalescente em excesso. No final foram secas e armazenadas.

O método de emulsificação/evaporação do solvente também foi usado na obtenção das microesferas de poliestireno fluorescentes contendo o fluoróforo (cianina) **1** e o fluoróforo (esquaraína) **2** (Figura 28). Para isso, uma solução de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L de cada fluoróforos **1** e **2** em clorofórmio foi adicionada na solução de poliestireno mantendo-se uma razão de 10^{-5} mol corante/mol PS.

4.2.3 POLIMERIZAÇÃO DO ESTIRENO EM MINIEMULSÃO

Para a polimerização em miniemulsão foi preparada uma solução contendo 53 mL de água (MilliQ) em 0,195 g de dodecilsulfato de sódio (SDS) e agitada até total homogeneização em um béquer. Outra solução foi preparada com 0,1 mL de hexadecano, 28 mg de AIBN (iniciador), 2,3 mg ($3,7 \times 10^{-3}$ mol) do fluoróforo **3** em 2,31g (0,022mol) do monômero estireno. As soluções permaneceram em agitação magnética por aproximadamente uma hora. Após, a solução de monômero foi vertida na solução de SDS e a solução final foi então selada com Parafilm e deixada com agitação constante por mais 30 min.

Na etapa seguinte foi realizada a sonificação da solução, sob banho de gelo, utilizando um equipamento de ultrassom (Branson Ultrasonics - Sonifier 450) com uma amplitude de 70%, por 120 s, com um programa de pulso de 10 s e 10s de pausa, para minimizar o aumento da temperatura durante a dispersão. Após essa etapa a solução foi transferida para um balão de 150 mL na temperatura 72°C em agitação por 13 horas.

Depois do resfriamento do sistema até a temperatura ambiente adicionou-se 3 mL de uma solução saturada de NaCl o sólido final foi centrifugado e lavado com 3 porções de 20 mL de água deionizada e armazenado em água a temperatura ambiente.

4.2.4 POLIMERIZAÇÃO DO ESTIRENO COM INICIADOR FLUORESCENTE, VIA ATRP.

As reações de polimerização do estireno com os iniciadores fluorescentes (IF): **1-3** (Figura 24) foram realizadas com diferentes proporções de ligante e brometo de cobre I (CuBr) para uma massa molecular teórica (M_n) de 1.000 g.mol^{-1} de polímero.

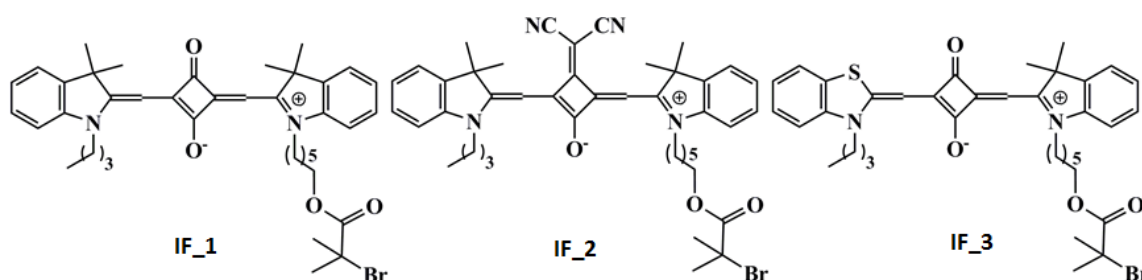


Figura 30: Estruturas dos iniciadores fluorescentes (IF) de Esquaraínas.

Em um balão com capacidade de 15 mL colocou-se o estireno previamente destilado e o brometo de cobre (I) a mistura foi homogeneizada por alguns minutos até a adição do ligante PMDETA juntamente com o anisol quando realizada em solvente. A solução foi degaseificada com argônio e colocada na temperatura da reação seguido da adição de 20 mg dos iniciadores fluorescentes (IF) **1, 2 e 3** dissolvidos em 0,54g de estireno. A polimerização ocorreu com agitação magnética, sob atmosfera inerte na temperatura de 90°C em tempos de reação variando entre 22, 48 e 168h.

Tabela 3: Tipos de iniciadores fluorescentes:

| Iniciador | MM (g/mol) | m (mg) | mol |
|-----------|------------|--------|-----------------------|
| IF_1 | 700,29 | 20 | $2,85 \times 10^{-5}$ |
| IF_2 | 748,30 | 20 | $2,67 \times 10^{-5}$ |
| IF_3 | 691,71 | 20 | $2,89 \times 10^{-5}$ |

O produto final foi precipitado em aproximadamente 100 mL de etanol, filtrado em papel filtro e lavado com 60 mL de etanol por centrifugação.

4.2.5 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO – NPM

As nanopartículas magnéticas foram preparadas empregando três diferentes ensaios conforme descrito a seguir e na Tabela 4:

4.2.5.1 Ensaio 1 - NPM1

As partículas magnéticas foram preparadas pelo método de coprecipitação, a partir aquosa de Fe^{+2} e Fe^{+3} de sais de ferro, em solução de NH_4OH (50mL). Inicialmente 24g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($88,7 \times 10^{-3}$ mol) e 9,82 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($49,3 \times 10^{-3}$ mol) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada sob agitação a 80°C. Após foi adicionado rapidamente 50 mL de NH_4OH na solução dos sais. A cor da solução mudou de marrom (Figura 31) imediatamente para preta.

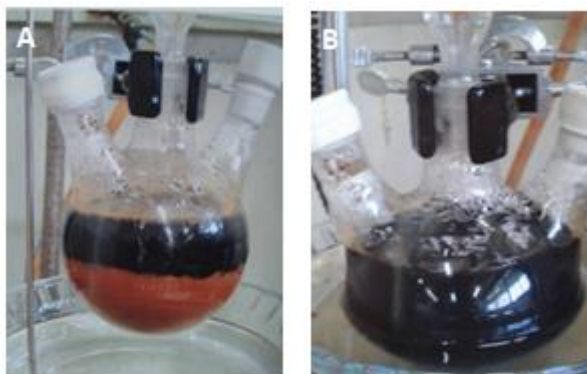


Figura 31: Fotografias da NPM (A) logo após a adição de base (B) coloração final.

Após 30 min adicionou-se 3,76 g ($13,1 \times 10^{-3}$ mol) de ácido oleico. A suspensão foi mantida a 80°C durante 1,5 horas em pH 9. Em seguida, as nanopartículas foram decantadas magneticamente e lavadas com 30 mL de água deionizada. As nanopartículas magnéticas modificadas – NPMM foram secas em estufa a 40°C .



Figura 32: Fotografias da decantação magnética.

4.2.5.2 Ensaio 2 – NPM2

O ensaio foi realizado colocando-se 6,1 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($88,7 \times 10^{-3}$ mol) e 3,1 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($49,3 \times 10^{-3}$ mol) em 100 mL de água destilada sob agitação, a 80°C . Após completa dissolução foram adicionados 5 mL de HCl, agitado por mais alguns minutos até a adição rápida de 50 mL de NH_4OH na solução de sais. A cor da solução mudou de marrom para preta imediatamente após a adição do NH_4OH . O produto foi decantado e lavado por três vezes (30 mL) com água destilada e etanol (30 mL) e armazenado no mesmo.

Após 30 min adicionou-se 3,76 g ($13,1 \times 10^{-3}$ mol) de ácido oleico (pH = 8) e a suspensão foi mantida a 80°C durante 1,5 horas. As nanopartículas foram lavadas com 30 mL de água deionizada usando centrifugação e armazenadas em etanol.

4.2.5.3 Ensaio 3 – NPM3

O ensaio 3 também usou sais de Fe^{+2} e Fe^{+3} , porém a base usada na precipitação foi o NaOH (1,5 mol/L). Inicialmente 6,1g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($22,5 \times 10^{-3}$ mol) e 3,1g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($15,5 \times 10^{-3}$ mol) foram dissolvidos em 125 mL de água destilada, após completa dissolução foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico e a mistura mantida numa temperatura de 60°C sob atmosfera inerte. A solução de sais e a solução básica foram misturadas e agitadas rigorosamente (950 rpm) por 30 minutos a 60 °C sob atmosfera inerte. Nanopartículas magnéticas de cor preta (pH \cong 3) foram isoladas por decantação magnética e lavadas com água destilada (1 litro) até um pH \cong 6. Após o produto foi centrifugado e lavado com 30 mL de etanol por três vezes.

Após secas, 2,5 g das NPM foram dispersas com agitação mecânica (700 rpm) em 85 mL de água destilada, sob uma atmosfera de argônio a 85 °C. Cerca de 2,8 g de ácido oleico foram adicionados imediatamente na solução, livre de oxigênio. A reação foi mantida durante 30 min a 85 °C. Após decantação magnética foram lavadas com água destilada e etanol. As nanopartículas com superfície modificada foram armazenadas em etanol.

Tabela 4: Ensaio realizados para obtenção das nanopartículas magnéticas.

| Síntese | Proporção $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ | Bases | Agitação (rpm) | Atmosfera | Armazenagem |
|---------|--|------------------------|-------------------|--------------|---------------------|
| NPM | 1:1,5 | NaOH | 950 | Inerte | Estufa 40°C/Etanol |
| NPM1 | 1:1,8 | NH_4OH | 950 | O_2 | Centrifugado/Etanol |
| NPM2 | 1:1,5 | NH_4OH | 700 | Inerte | Centrifugado/Etanol |
| NPM3 | 1:1,5 | NaOH | 700 | Inerte | Centrifugado/Etanol |

4.2.6 MICROESFERAS FLUORESCENTES E MAGNÉTICAS

4.2.6.1 Obtenção de microesferas magnéticas de poliestireno e microesferas magnéticas e fluorescentes de poliestireno pelo método de emulsificação/evaporação de solvente:

4.2.6.2 Microesferas magnéticas de poliestireno:

A emulsificação consiste em uma fase orgânica contendo 0,5g poliestireno ($M_w = 137000 \text{ g/mol}^{-1}$, PDI = 2,0) em 30 mL de clorofórmio e na fase aquosa de uma solução constituída de 100 mL água e 2,5 g de poli(álcool vinílico) (PVA, $M_w = 50.000 - 31.000 \text{ g/mol}^{-1}$, 87,6% hidrolisado). As soluções foram mantidas sob agitação a uma temperatura de 40 °C até completa homogeneização. Na fase orgânica, 10 mg de nanopartículas magnéticas modificadas foram adicionadas e para garantir a dispersão homogênea das mesmas a mistura permaneceu em banho de ultrassom por 10 min.

Após o tempo no ultrassom a fase orgânica foi adicionada gota a gota manualmente com ajuda de uma pipeta Pasteur à fase aquosa sob agitação constante de um homogeneizador de alta velocidade (Ultra Turrax® T25) com rotação de 6000 rpm por 5 minutos.

À emulsão obtida foi adicionada a 500 mL de água deionizada sob agitação mecânica de 600 rpm por 40 min. O produto resultante de coloração marrom permaneceu em repouso até total decantação, sendo recolhido, lavado e centrifugado com água deionizada, seco e armazenado.

4.2.6.3 Microesferas fluorescentes e magnéticas de poliestireno:

O procedimento de emulsificação é idêntico ao descrito anteriormente permanece o mesmo (mesmas concentração na solução aquosa), porém na fase orgânica foram adicionados 3 mg do fluoróforo. Após completa dispersão do fluoróforo foram adicionados 10 mg de nanopartículas magnéticas modificadas e a mistura colocada em banho de ultrassom por 10 min.

Após o tempo no ultrassom a fase orgânica contendo o fluoróforo e as nanopartículas magnéticas foi adicionada gota a gota manualmente via pipeta Pasteur à fase aquosa sob agitação intensa de 6000 rpm utilizando-se um agitador Ultra Turrax durante 5 minutos.

À emulsão obtida foi adicionada a 500 mL de água deionizada sob agitação mecânica de 600 rpm por 40 min. A solução azulada resultante permaneceu em repouso até total decantação. O produto foi recolhido lavado e centrifugado com água deionizada e etanol, seco e armazenado.

4.2.7 Microesferas magnéticas de poliestireno e microesferas magnéticas e fluorescentes de poliestireno pela polimerização em miniemulsão

4.2.7.1 Miniemulsão magnética

Para a polimerização em miniemulsão magnética foi preparada uma fase aquosa contendo 53 mL de água (MilliQ) em 0,195 g de dodecilsulfato de sódio (SDS) e agitada até total homogeneização em um béquer. A fase orgânica foi preparada usando 0,1 mL de hexadecano, 28 mg de AIBN como iniciador em 2,31 g do monômero estireno e após aproximadamente 1 h de agitação foram adicionados 10 mg de nanopartículas magnéticas modificadas e homogeneizadas em banho de ultrassom por aproximadamente 15 min.

Após a homogeneização a fase orgânica foi vertida na fase aquosa e realizada a sonificação da solução utilizando um ultrassom (Branson Ultrasonics - Sonifier 450) com uma amplitude de 70%, em 120 s, com um programa de pulso de 10 s e 10s de pausa em banho de gelo. Após essa etapa a solução foi colocada em um balão de 150 mL na temperatura 70°C em agitação por 8 horas.

Depois do resfriamento da reação a temperatura ambiente, o produto final de coloração marrom foi centrifugado juntamente com a adição de 3 mL de uma solução saturada de NaCl. O produto foi lavado com 3 porções de 20 mL de água deionizada e armazenado em água a temperatura ambiente.

4.2.7.2 Miniemulsão magnética e fluorescente

Para a polimerização em miniemulsão magnética e fluorescente foi preparada uma fase aquosa contendo 53 mL de água (MilliQ) em 0,195 g de dodecilsulfato de sódio (SDS) e agitada até total homogeneização em um béquer. A fase orgânica foi preparada usando 0,1 mL de hexadecano, 28 mg de AIBN como iniciador, 2,1 mg do fluoróforo IF₃ em 2,31g do monômero estireno. Aproximadamente, após 1 h de agitação foram adicionados 10 mg de

nanopartículas magnéticas modificadas e homogeneizadas em banho de ultrassom por aproximadamente 15 min.

Após a homogeneização a fase orgânica foi vertida na fase aquosa e realizada a sonificação da solução utilizando equipamento de ultrassom (Branson Ultrasonics - Sonifier 450) com uma amplitude de 70%, em 120 s, com um programa de pulso de 10 s e 10s de pausa em banho de gelo. Após essa etapa a solução foi colocada em um balão de 150 mL na temperatura 70°C em agitação por 8 horas.

Depois do resfriamento da reação à temperatura ambiente, o produto final de coloração marron foi centrifugado juntamente com a adição de 3 mL de uma solução saturada de NaCl. O produto foi lavado com 3 porções de 20 mL de água deionizada e armazenado em água a temperatura ambiente.

4.2.8 Microesferas de poliestireno magnéticas pelo processo de polimerização em emulsão.

4.2.8.1 Emulsão do tipo água em óleo (A/O)

Visando simplificar as etapas de produção das microesferas fluorescentes e magnéticas fez-se vários testes usando emulsões do tipo A/O (água em óleo). Foram usadas nanopartículas magnéticas não modificadas dispersas em ácido acrílico (AA) com o interesse de realizar uma funcionalização das mesmas. Também foram testados diferentes surfactantes, entre eles: SDS (dodecilsulfato de sódio), PGPR (poliglicerol poliricinoleato), Span 80 (monoleato de sorbitan) e o Tergitol TMN 3 (éter de polietileno glicol).

As emulsões foram realizadas adicionando as nanopartículas de ferro, água (MilliQ) e ácido acrílico e um tubo Falcon e dispersas em ultrassom. Após a dispersão foram adicionados o estireno, cicloexano (solvente) e o surfactante e então sonicados por 2 min com uma frequência de 40 Hz. A emulsão foi transferida para um balão de vidro e adicionado o iniciador AIBN (2'2-azobis(isobutironitrila) a reação ficou por 2 h a uma temperatura de 70 °C.

4.2.8.2 Emulsão do tipo óleo em água (O/A)

A emulsão foi realizada dispersando em ultrassom as nanopartículas magnéticas modificadas com ácido oleico e em seguida com adição de 1,5g estireno (monômero) e do hexadecano (HD) (coestabilizador) mantido em agitação durante 1 h para a preparação de uma pré-emulsão. Após foram adicionados 0,05 g de AIBN (iniciador), água (MilliQ), SDS (surfactante) e ácido acrílico (AA) que foram homogeneizados em ultrassom com uma amplitude de 50 %, em 2 min, com um programa de pulso de 5 s e 5s de pausa. A homogeneização realizada em Turrax (homogeneizador de alta velocidade) foi usada uma rotação de 800 rpm em 5 min. A emulsão foi polimerizada com agitação mecânica durante 18 h a 70 °C.

4.2.9 PANORAMA GERAL DOS MÉTODOS PARA A OBTENÇÃO DAS MICROESFERAS.

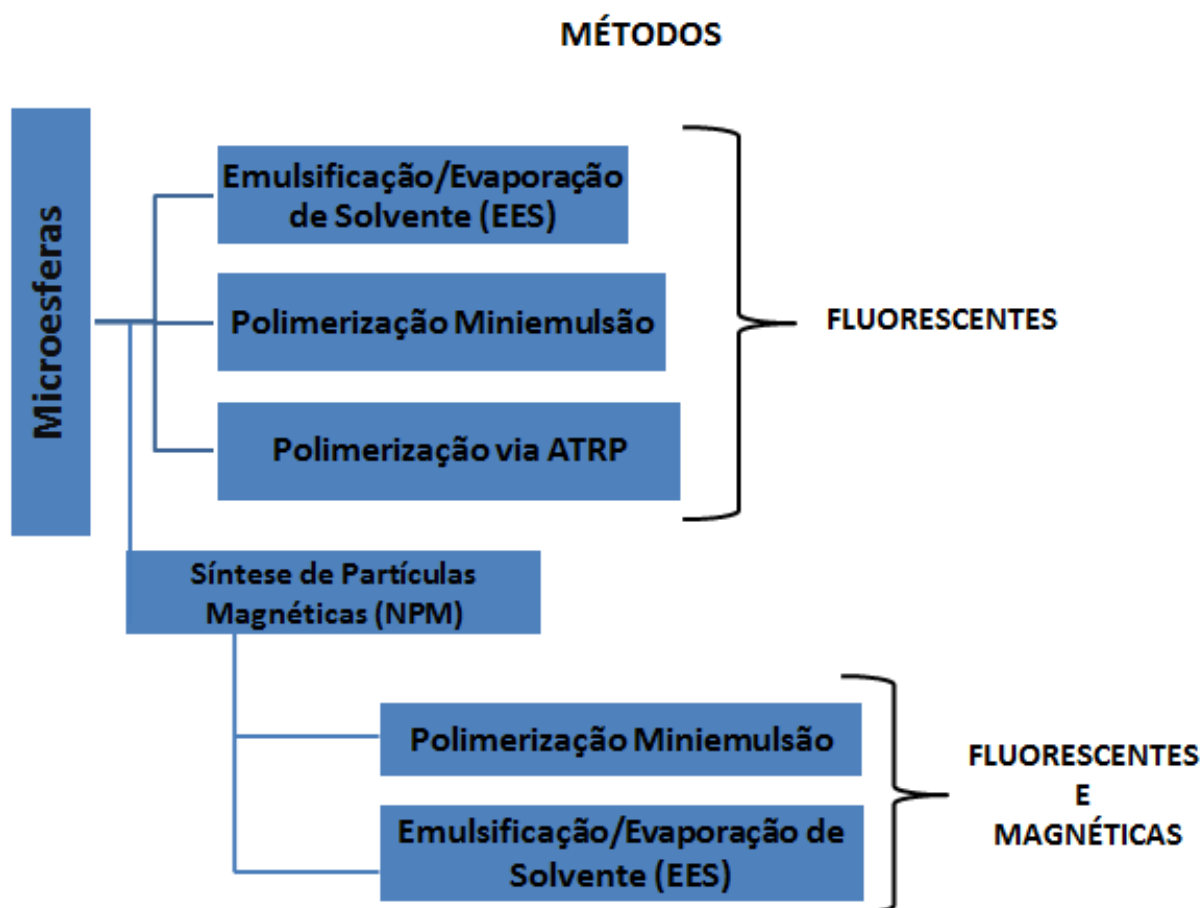


Figura 33: Esquema dos métodos utilizados para a obtenção de microesferas de poliestireno, fluorescentes e magnéticas.

4.3. MÉTODOS DE ANÁLISE

As análises foram realizadas com equipamentos alocados no Instituto de Química e no Centro de Microscopia da UFRGS. A metodologia utilizada em cada uma dessas análises será descrita a seguir:

4.3.1 MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura)

Nesse aparelho, a superfície do material é varrida ponto a ponto por um feixe de elétrons. A imagem é formada a partir de elétrons secundários que partem da amostra quando a mesma é atingida pelo feixe de elétrons. Os elétrons secundários são captados e, após passagem por um amplificador, são transformados em imagem visível em um monitor¹⁵⁰.

As amostras foram caracterizadas em um microscópio JEOL modelo JSM 6060 operando a uma aceleração de 1000 volts. Durante a caracterização utilizou-se uma voltagem entre 10 e 20 kV e as amostras em pó foram depositadas em uma fita condutora de carbono dupla face fixada em *stubs* (suporte porta-amostras) de alumínio e, posteriormente, metalizadas com filme fino de Pd (30 nm).

Para análises realizadas com o uso de EDX (Energia de Dispersão de Raios-X) para identificação elementar foi utilizado o MEV Zeiss EVO 50 um microscópio de varredura convencional de filamento de tungstênio que opera em tensões de 0.2kV até 30kV. O microscópio está equipado com detectores de elétrons secundários de câmara, e detector de raios- X característicos (EDS).

Inicialmente, quando um feixe de elétrons incide sobre um material os elétrons mais externos dos átomos e dos íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. E quando retornam para sua posição inicial, liberam a energia adquirida, que é então medida através de um detector instalado no aparelho. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local.

4.3.2 MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão)

Um feixe de elétrons alta tensão passa através de uma amostra e a recombinação dos feixes difratados e transmitidos em diferentes intensidades resulta na diferença de contraste da imagem formada¹⁵⁰. Foi utilizado um aparelho ZEISS modelo Libra 120 para obtenção de imagens e de EDX para certas amostras. Para esta análise algumas gotas da amostra dispersa a

2% foram colcadas sobre grade de cobre de 300 mesh. Após a secagem das amostras numa estufa a vácuo por 24h, as mesmas foram recobertas com um filme de carbono (*sputter-coating*) para minimizar a degradação da amostra sob o feixe de elétrons.

O tratamento das imagens digitais adquiridas (MEV e MET) e para a extração das informações utilizou-se o software de processamento e análise de imagens digitais *Image J*¹⁵¹ como ferramenta para medição das microesferas e das partículas magnéticas. Para a determinação da distribuição de diâmetro utilizando entre 50 a 100 contagens.

O ImageJ é um software para processamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA, em linguagem Java. No ImageJ, o cálculo das áreas e diâmetros é realizado pela contagem de pixels das regiões selecionadas pelo usuário ou por um algoritmo específico. A conversão dos resultados em pixels, para unidade de medida que deverá ser utilizada. Como a imagem original possui uma barra de escala, através de uma ferramenta do próprio software, pode-se realizar a medida deste comprimento em pixels e sua conversão, para unidades de medidas como nanômetros (nm) e micrometros (μm).

4.3.3 DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico)

A medida do diâmetro de partícula foi realizada utilizando equipamento de Dispersão Dinâmica de Luz Brookhaven (goniômetro BI-200M e correlador digital BI9000AT, utilizado para obtenção de funções de correlação temporal - FCT) e uma fonte de luz monocromática laser He-Ne emitindo luz a 632,8 nm, com uma potência de 15 mW. O sistema possui uma fotomultiplicadora (PMT modelo: EMI 9863/350b04) ligada a um discriminador e amplificador do sinal e também um porta amostra apropriado às cubetas óticas imersas em um líquido corretor de índice de refração (decalina). Para análise do diâmetro médio das partículas formadas a partir da polimerização em miniemulsão, 0,5 mL de amostra foram diluídas com água.

4.3.4 TGA (Termogravimetria)

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas a fim de se avaliar a temperatura de decomposição das amostras. Cerca de 5 mg de nanopartículas magnéticas

foram analisadas em um analisador termogravimétrico TGAQ5000IR (TA *Instruments*), com uma taxa de aquecimento de 20°C/min, de 40 a 600°C, sob um fluxo de nitrogênio ultra puro.

4.3.5 CF (Microscopia Confocal)

As imagens de microscopia óptica (MC) foram efetuadas para avaliar a fluorescência dos fluoróforos utilizados durante a produção das microesferas. O aparelho usado foi um microscópio Olympus FluoView modelo TM 1000 operando com um laser a 635 nm.

4.3.6 Espectroscopia de UV/Vis

Os espectros de absorção e fluorescência foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu UV-2450 e espectrofluorímetro Shimadzu RF- 5301PC, respectivamente.

4.3.7 DRX (Difração de Raios-X)

A técnica de DRX baseia-se no espalhamento de radiação por um cristal no qual os elétrons de seus átomos funcionam como fontes secundárias, reemitindo a radiação incidente em todas as direções. As ondas reemitidas reforçam-se mutuamente em algumas direções e se cancelam em outras, formado assim os padrões de difração.

As medidas foram registradas a partir de amostras em pó das nanopartículas magnéticas à temperatura ambiente. O difratômetro utilizado para as medidas é da marca Rigaku D-Max 2000 com fonte de radiação de Cu α (1.518 Å com corrente de 30 Kv e voltagem 15 mA. O ângulo de difração (2θ) variou de 10 a 90 ° em intervalos de 0,05°.

4.3.8 Curvas de magnetização - Histerese

O comportamento magnético pode ser comprovado e sua magnitude medida através da curva de magnetização, quando o material inicialmente não magnetizado é submetido ao aumento progressivo de uma força magnetizante de zero até um valor máximo, e reduzindo-se em seguida até zero novamente. Este procedimento é repetido algumas vezes e a curva de magnetização é obtida¹²⁹.

O comportamento magnético avaliado através de curva de magnetização, realizados no equipamento VSM - Magnetômetro de amostra vibrante a temperatura ambiente, modelo EV9 microsense, campo máximo de 2Tesla (20 KOe) e sensibilidade de 10^{-6} emu , disponível no Laboratório Magnetismo de Física da UFRGS.

4.3.9 GPC (Cromatografia por exclusão de tamanho)

O cromatógrafo utilizado foi um aparelho de cromatografia de permeação em gel marca Viscotek GPC MAX, modelo TODA 302 –Triple Detector Array. As amostras, aproximadamente 10 mg de material, foram solubilizadas em 4 mL de THF destilado. As análises foram realizadas tendo como eluente o THF, na vazão de 1 mL/min, a 45°C de temperatura interna. Para calibração utilizaram-se amostras padrão de poliestireno monodisperso.

4.3.10 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos em um espectrofotômetro da Jobin Yvon modelo iHR - 320 com detector de CCD. Os espectros foram adquiridos num tempo de 60 s (para aumentar a relação sinal/ruído) usando uma fonte de laser He-Ne, com energia do feixe de 10 mV e foco em um ponto de ± 3 mm de diâmetro.

5. RESULTADOS

5.1 MICROESFERAS DE POLIESTIRENO

5.1.1 Método de Emulsificação/Evaporação do Solvente.

Microesferas de poliestireno foram obtidas primeiramente, pelo método de emulsificação/evaporação do solvente a fim de avaliar as melhores condições para a formação de microesferas com distribuição homogênea de tamanho. Essa condição de homogeneidade é importante para a aplicação que se pretende, com resultados mais precisos, já que cada microesfera forma a base de um ensaio individual.

Uma vantagem dessa metodologia é a sua simplicidade de execução, requerendo apenas a seleção adequada dos solventes, emulsificantes e condições de agitação⁸². Na Tabela 5 são apresentadas as diferentes condições testadas utilizando PVA poli(álcool vinílico) (PVA) e polivinilpirrolidona (PVP) como agentes anticoalescentes, dodecilsulfato de sódio (SDS) como emulsificante e diferentes velocidades de agitação (rpm). O diâmetro médio das microesferas foi obtido pelo programa *Image J*.

Tabela 5: Parâmetros utilizados para a obtenção de microesferas de poliestireno pelo método de emulsificação/evaporação de solvente.

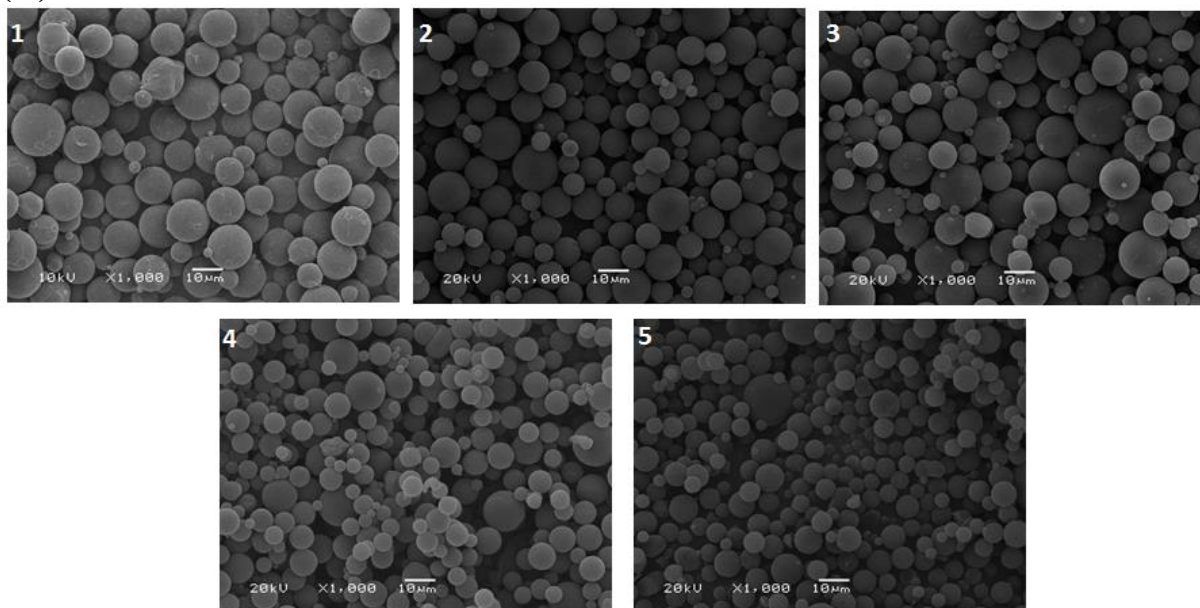
| Amostra | Agente anticoalescente/emulsificante | Turrax (rpm/5min) | Agitação mecânica (rpm/40min) | Diâmetro médio μm ^(a) | σ ^(b) |
|---------|--------------------------------------|-------------------|-------------------------------|---|-------------------------|
| 1 - M1 | PVA | 6000 | 600 | 10,4 | 2,4 |
| 2 - M2 | PVA-20% SDS | 6000 | 600 | 7,0 | 2,9 |
| 3 - M3 | PVP | 6000 | 600 | 8,5 | 3,3 |
| 4 - M4 | PVA | 8000 | 800 | 7,6 | 3,6 |
| 5 - M5 | PVA | 10000 | 600 | 5,9 | 2,2 |

(a) Determinado pelo software *Image J* a partir das imagens de MEV.

(b) Desvio padrão(σ).

Os histogramas de distribuição de tamanho (diâmetro) das amostras foram determinadas através da contagem individual (em torno de 100 contagens) das microesferas a partir das imagens de MEV (Figuras 33 A e B).

(A)



(B)

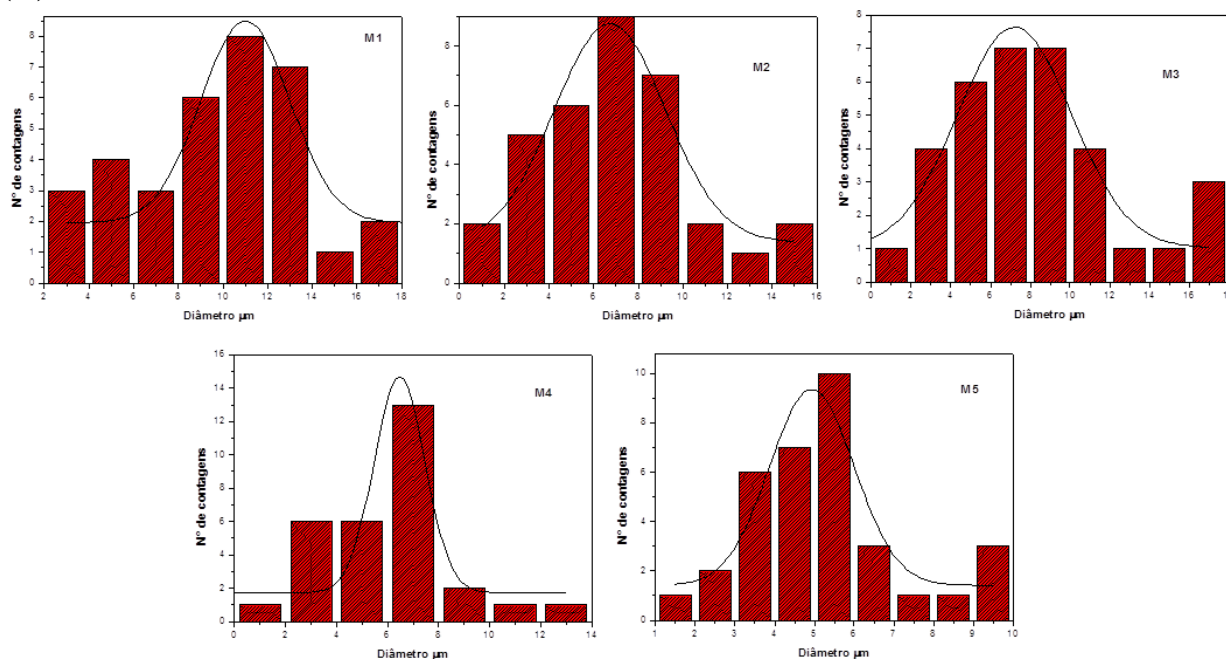


Figura 34: (A) Imagens de MEV das microesferas obtidas nas diferentes condições apresentadas na Tabela 5. (B) Histogramas obtidos a partir das imagens de MEV.

O diâmetro das micropartículas é influenciado, principalmente, pelo tipo de emulsificante/agente coalescente e pela velocidade de agitação utilizada durante o processo. Além do PVA, foram empregados o SDS e PVP para o processo de emulsificação, já que são

citados na literatura⁵⁸. Nas mesmas condições de agitação (entradas 1-3) não foi observado nenhuma mudança significativa (considerando o desvio padrão) no diâmetro das microesferas para os diferentes agentes anticoalescentes.

O aumento na velocidade de agitação durante a homogeneização (Turrax) (entradas 1 e 5) promoveu uma distribuição mais homogênea de diâmetro e, conforme esperado, uma diminuição no diâmetro da microesfera. A velocidade de agitação é responsável pelo balanço contínuo entre a quebra das gotas da fase orgânica e a sua coalescência⁵⁷.

Assim, a Entrada 1 da Tabela 5 foi escolhida como a melhor condição a ser adotada na preparação, das microesferas de poliestireno, pois o diâmetro médio obtido é próximo ao necessário para a aplicação que se pretende, além de apresentar uma distribuição mais homogênea de tamanho.

A variabilidade no tamanho das microesferas também pode estar vinculada ao não uso de um dosador no momento da adição da fase orgânica (fase dispersa) à solução aquosa contendo um agente tensoativo. Por esse motivo foi utilizado um dosador automático durante a adição das soluções nas condições da entrada 1, visando a homogeneização do tamanho das microesferas. A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa numa razão de 5 e 10 mL.min⁻¹ durante a agitação no Turrax. Observa-se na Figura 34 que a menor taxa de adição (1A) levou a uma distribuição de tamanho das microesferas mais homogênea.

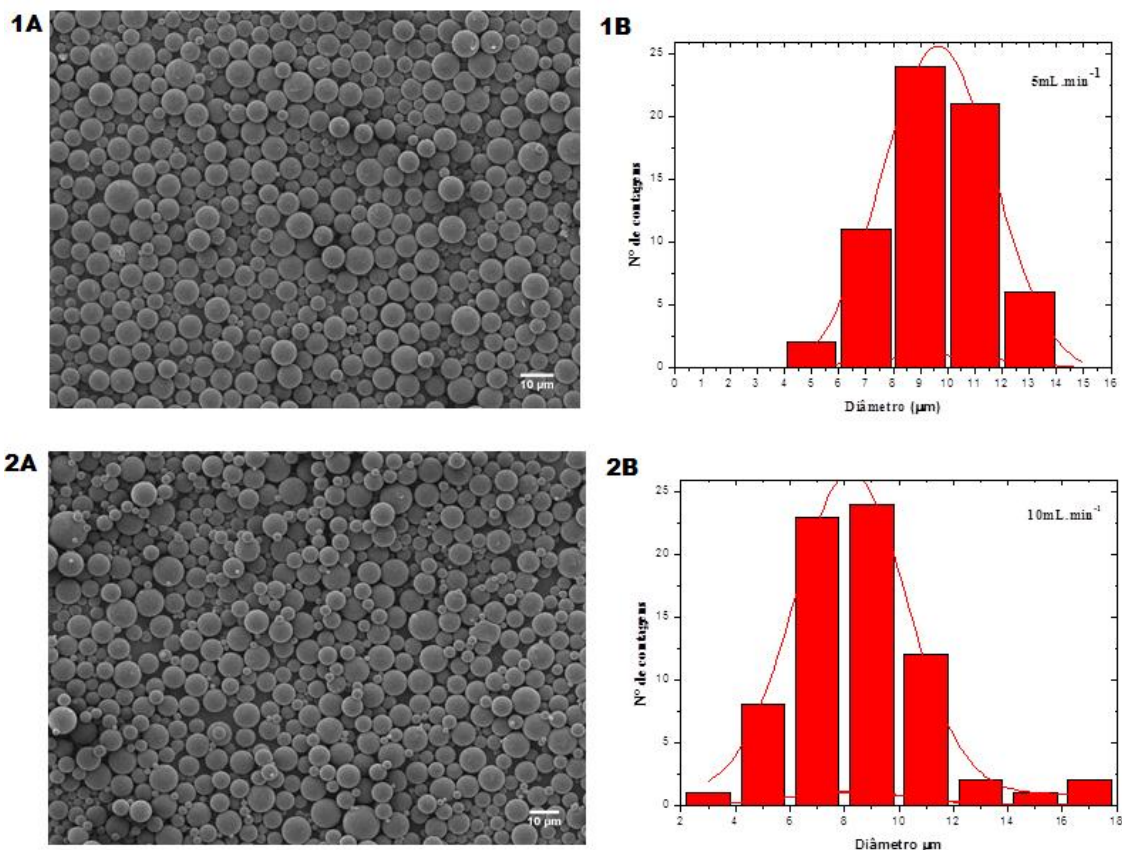


Figura 35: Imagens de MEV (aumento de x1000 e 10kV) 1A (taxa 5 mL.min⁻¹) e 1B (taxa de 10 mL.min⁻¹) e seus respectivos histogramas.

As microesferas com a taxa de gotejamento menor apresentaram uma polidispersão mais estreita e tamanho médio em torno de $9 \pm 1,6 \mu\text{m}$, enquanto que com a taxa de adição maior foi $7,0 \pm 3,5 \mu\text{m}$.

Por fim, foi possível ainda observar na Figura 35 que o gotejamento da fase orgânica numa razão 5 mL.min⁻¹ realizado externamente à solução aquosa (emersa à solução - Figura 35 A) produziu microesferas com dimensões em torno de $9,6 \pm 1,9 \mu\text{m}$ e melhor distribuição de tamanho, enquanto que o gotejamento realizado internamente à solução (imersa à solução Figura 35 B) o diâmetro médio diminuiu para $6 \pm 4,3 \mu\text{m}$ e a distribuição aumentou.

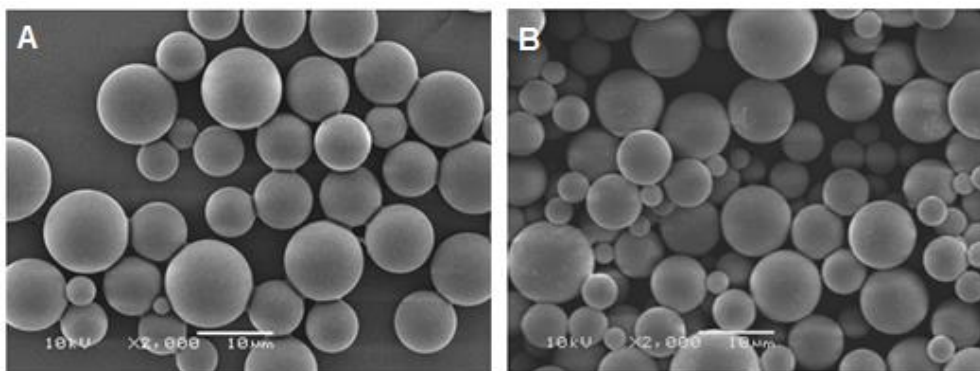


Figura 36: Imagens de MEV: (A) gotejamento emerso à solução e (B) gotejamento imerso à solução.

Apesar de o gotejamento manter a distribuição de tamanho mais homogêneo, ocorreu um aumento no diâmetro das microesferas de 5 μm para 9 μm e a escolha da ponteira de adição no gotejamento também influencia no diâmetro.

5.1.2 Microesferas fluorescentes de poliestireno pelo método de emulsificação/evaporação de solvente.

Tendo sido escolhida a melhor condição para a obtenção de microesferas de poliestireno (Entrada 1 da Tabela 5), a próxima etapa do trabalho foi a incorporação dos fluoróforos (Figura 28) durante a preparação das microesferas. Para isso, uma solução de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L dos fluoróforos em clorofórmio foi adicionada na solução de poliestireno (PS), mantendo-se uma razão de 10^{-5} mol fluoróforo/mol PS.

As esquaraínas e cianinas utilizadas neste trabalho como fluoróforos foram escolhidas por exibirem propriedades de absorção e emissão de fluorescência na região do vermelho e do infravermelho próximo devido a transições eletrônicas do tipo $\pi-\pi^*$, com elevados coeficientes de extinção molar ($\epsilon \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^{15,16}.

A figura 37 mostra as micrografias obtidas para as microesferas de PS quando foram utilizados os fluoróforos 1, 2 e 3. Os diâmetros médio destas microesferas (obtido pelo programa *Image J*) foram de 6,0 μm ($\sigma = \pm 2,8$), 9,5 μm ($\sigma = \pm 2,5$) e 8,8 μm ($\sigma = \pm 1,5$) para os fluoróforos **1**, **2** e **3**, respectivamente. Embora a razão molar utilizada entre os fluoróforos e o PS tenha sido pequena (10^{-5} mol), as imagens de MEV mostraram que a presença dos fluoróforos afetou o diâmetro médio das microesferas, principalmente no caso do fluoróforo

1. Provavelmente este fato não esteja relacionado à estrutura do fluoróforo, mas sim a falta de controle da vazão durante a adição entre as fases, ocasionando a diminuição do diâmetro.

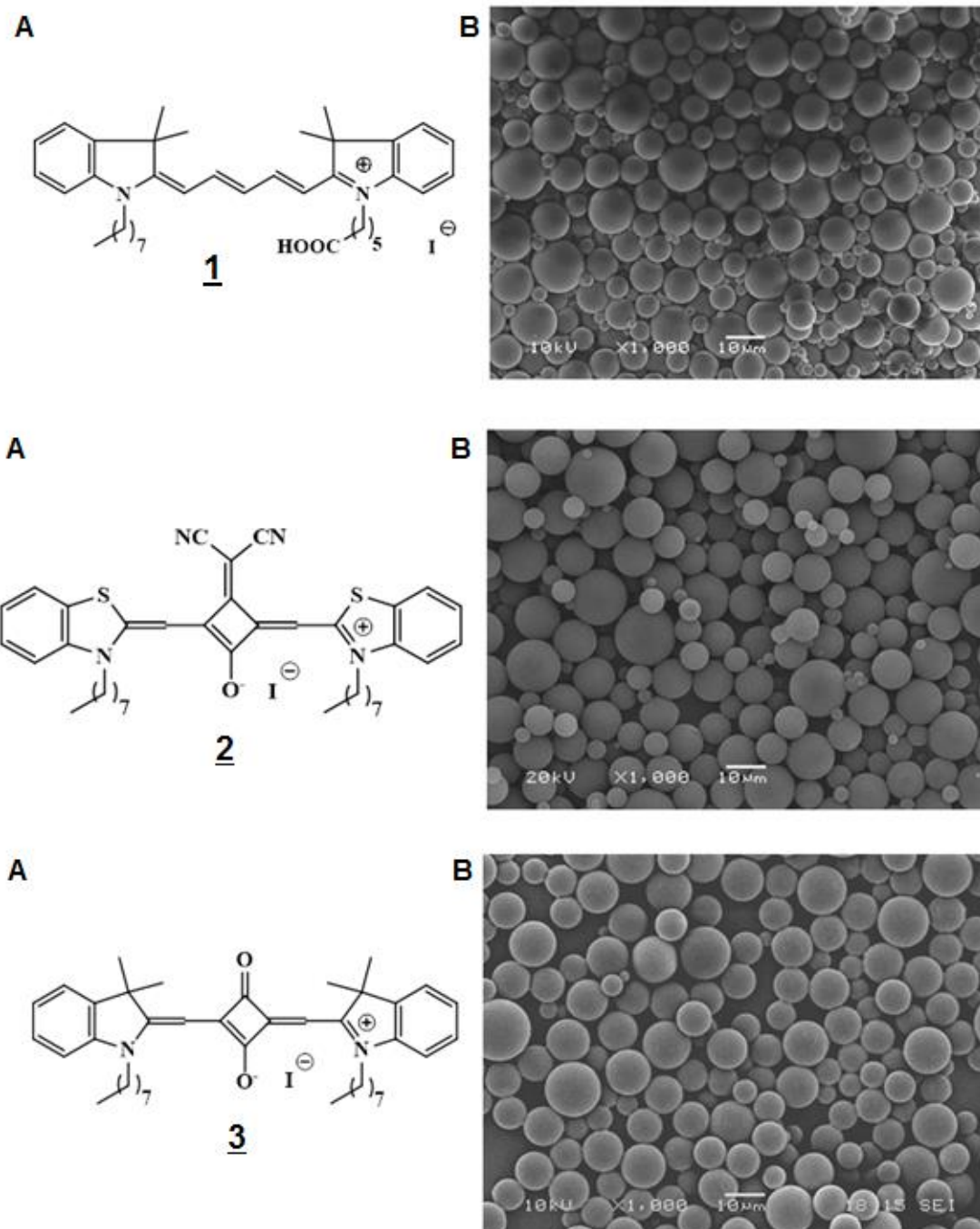


Figura 37: Estruturas dos fluoróforos e imagens de MEV das microsferas contendo o fluoróforo 1,2 e 3 respectivamente.

Na Figura 38 são apresentadas às imagens de microscopia confocal das microesferas obtidas com os fluoróforos 1, 2 e 3 mostrando a emissão na região do vermelho. Para o fluoróforo 2, independente do plano focal, observa-se que a fluorescência encontra-se distribuída por todo o interior das microesferas e em diferentes profundidades (Figura 39). As microesferas contendo o fluoróforo 1 mostraram um perfil semelhante. Além disso, a análise por microscopia confocal das microesferas mostrou que os fluoróforos estão presentes mesmo após sucessivas lavagens das microesferas com etanol. Tanto para a fluoróforo 1 quanto para o fluoróforo 2, as microesferas apresentaram uma distribuição de fluorescência homogênea, sem pontos de aglomeração, indicando que as moléculas de fluoróforo tiveram uma boa compatibilidade com o PS.

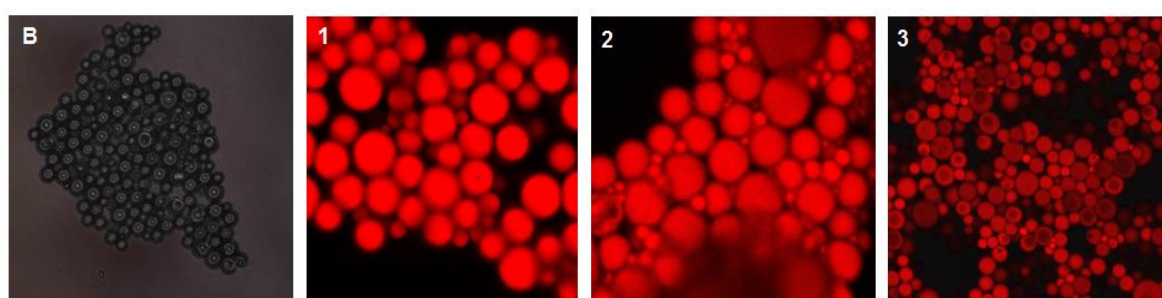


Figura 38: Micrografias confocal das microesferas de PS sem fluoróforo (B), e com os fluoróforos 1, 2 e 3 (aumento de 60 x).

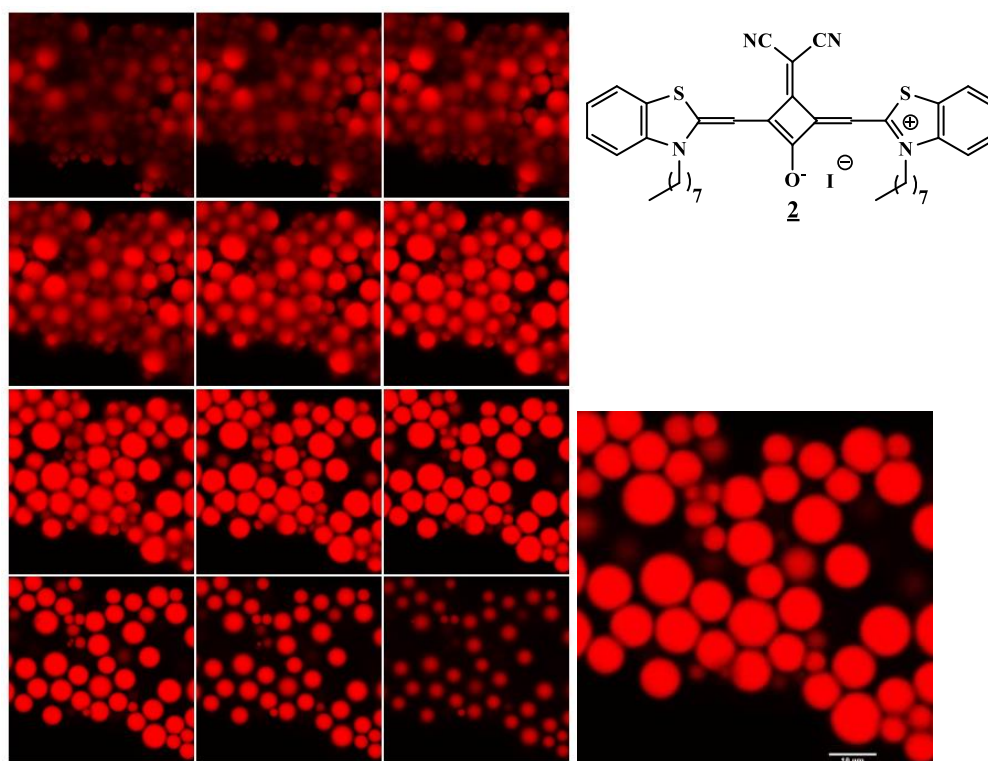


Figura 39: Micrografias confocal das microesferas contendo o fluoróforo 2 em diferentes planos focais: cortes do topo para baixo.

As plataformas de sistemas de diagnósticos utilizam-se das propriedades de fluorescência de microesferas em suspensão aquosa, sendo essas a base do sistema de detecção para uma determinada doença. Os lasers usados como detectores operam juntamente, na região espectral do visível, mais especificamente na região do vermelho. Sendo assim, as propriedades fotofísicas das microesferas de poliestireno coradas com os fluoróforos **1**, **2** e **3** foram determinadas em suspensão aquosa. Para fins de comparação, as propriedades fotofísicas das microesferas foram analisadas frente aos fluoróforos em solventes como etanol e clorofórmio.

As Figuras 40 a) e b) mostram os espectros das microesferas fluorescentes dispersas em água. As microesferas contendo o fluoróforo **1** apresentaram emissão de fluorescência na região do vermelho (660 nm), enquanto que as microesferas contendo o fluoróforo **2** apresentaram fluorescência na região mais aproximada do infravermelho próximo (720 nm), quando excitadas em seu comprimento de onda máximo de absorção.

O fluoróforo **1** não teve as suas propriedades fotofísicas modificadas quando confinado nas microesferas, uma vez que os comprimentos de onda dos máximos de absorção e emissão de fluorescência mantiveram-se praticamente inalterados ao se comparar os valores em etanol ($\lambda_{\text{abs}} = 646 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{fl}} = 664 \text{ nm}$ - Figura 33a) e em uma suspensão aquosa contendo as microesferas dispersas ($\lambda_{\text{abs}} = 647 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{fl}} = 660 \text{ nm}$).

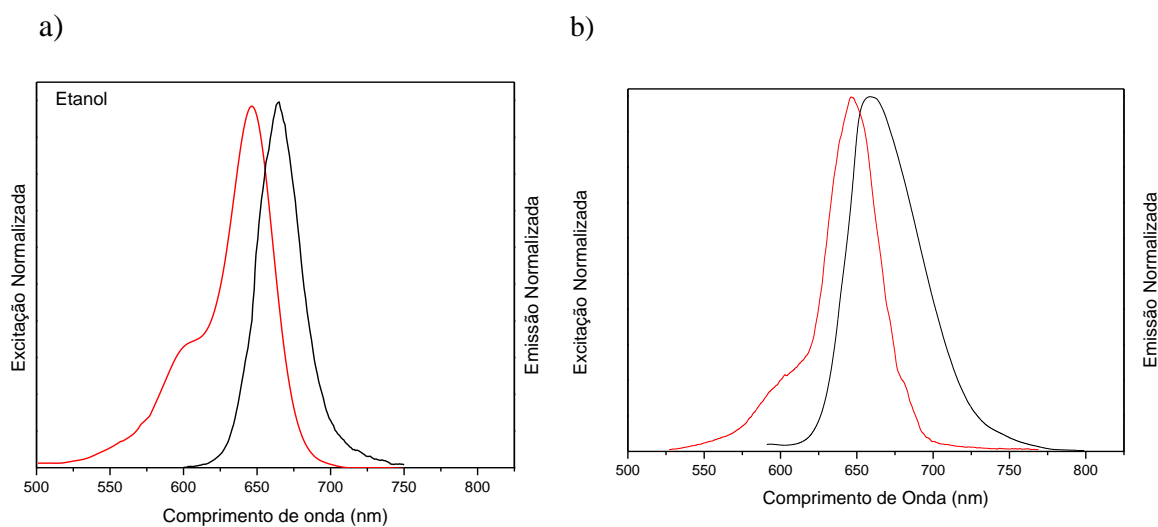
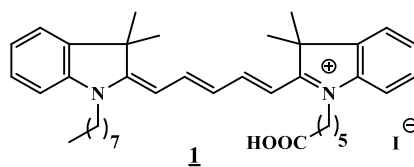
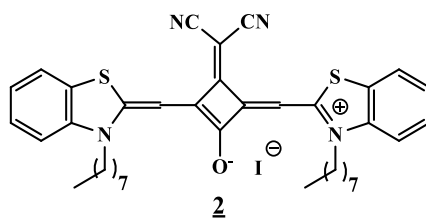


Figura 40: Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência do a) fluoróforo **1** em clorofórmio [10^{-5}M]¹⁵ e b) das microesferas em suspensão aquosa contendo o fluoróforo **1**.

As propriedades fotofísicas do fluoróforo **2** mostraram mudanças mais significativas quando as moléculas foram confinadas no ambiente das microesferas. Um deslocamento hipsocrômico foi observado tanto para o comprimento de onda do máximo de absorção quanto para o de emissão, quando comparados com o fluoróforo em uma solução de clorofórmio (em CHCl_3 : $\lambda_{\text{abs}} = 704 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{fl}} = 724 \text{ nm}$, em suspensão aquosa: $\lambda_{\text{abs}} = 693 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{fl}} = 718 \text{ nm}$, Figura 41).



a)

b)

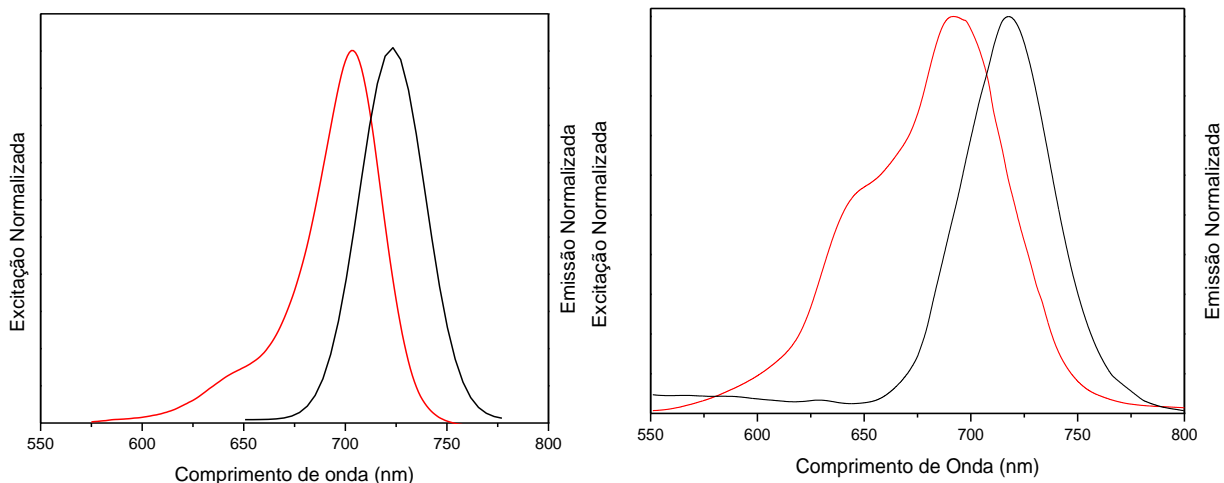


Figura 41: Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência do a) fluoróforo 2 em clorofórmio [10^{-5}M]¹⁶ e b) das microesferas em suspensão aquosa contendo o fluoróforo 2.

As propriedades fotofísicas do fluoróforo 3 nas microesferas de PS mostraram que houve um deslocamento batocrômico, ou seja, um aumento no comprimento de onda do máximo de absorção quanto para o de emissão, quando comparados com o fluoróforo puro em uma solução de clorofórmio (em CHCl_3 : $\lambda_{\text{abs}} = 636 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{fl}} = 648 \text{ nm}$, em suspensão aquosa: $\lambda_{\text{abs}} = 650 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{fl}} = 667 \text{ nm}$, Figura 41, Tabela 6).

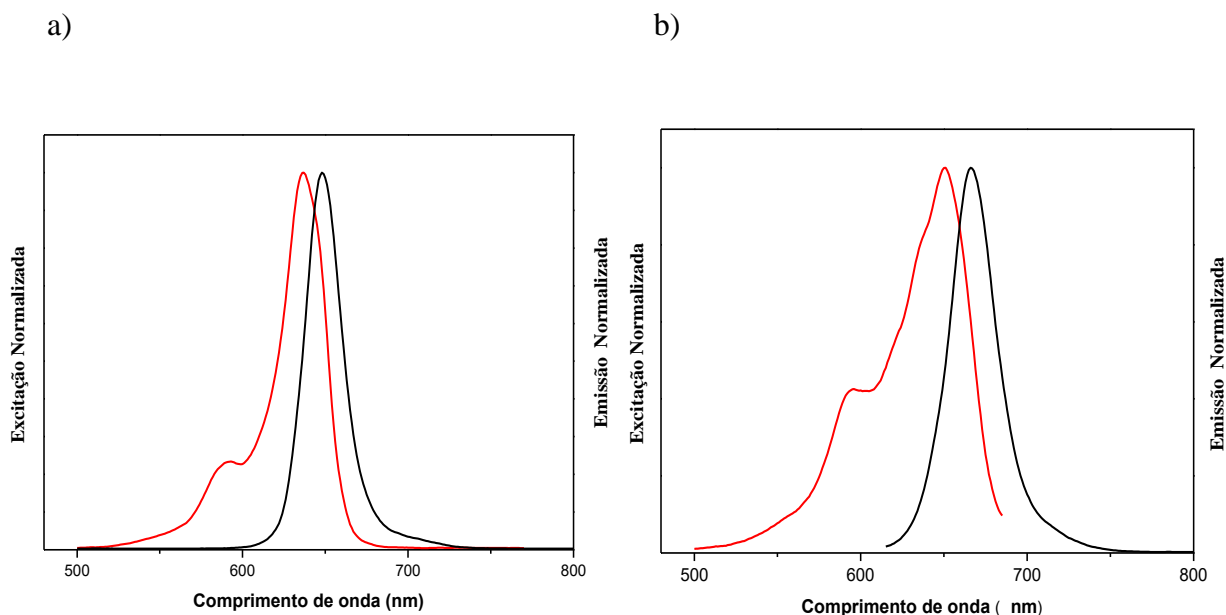
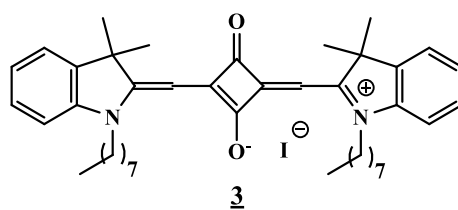
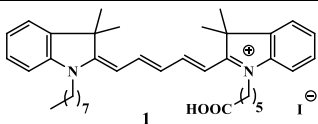
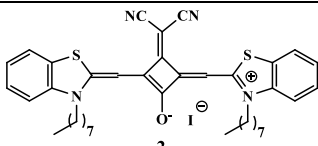
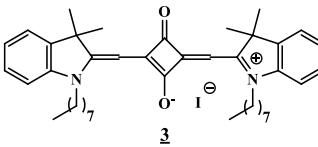


Figura 42: Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência do a) fluoróforo **3** em clorofórmio [10^{-5}M]¹⁶ e b) das microesferas em suspensão aquosa contendo o fluoróforo **3**.

Embora os dados de microscopia confocal tenham mostrado que os fluoróforos 1-3 emitem no vermelho quando inseridos nas microesferas de PS (Figura 37), os espectros de absorção e emissão mostram com mais detalhes as diferenças fotofísicas entre essas três moléculas (Tabela 6). Entre os três fluoróforos, a Cianina 1 foi a que teve as propriedades fotofísicas menos alteradas quando incorporada nas microesferas.

Já os fluoróforos, esqaraínas 2 e 3 tiveram deslocamentos nos seus espectros (hipsocrômico e batocrômico, respectivamente) quando se faz uma comparação entre os seus espectros puros em clorofórmio e quando incorporadas nas microesferas. Porém, em todos os casos observou-se que as bandas de absorção e de emissão sofreram um alargamento quando em suspensão aquosa comparativamente ao composto dissolvido em clorofórmio (Figuras 39, 40 e 41). Este alargamento das bandas está associado ao espalhamento de luz proveniente da suspensão aquosa, tendo em vista que as microesferas não são solúveis em água.

Tabela 6: Dados fotofísicos dos fluoróforos 1-3 dissolvidos em clorofórmio e em suspensão aquosa contendo as microesferas de poliestireno (λ_{abs} = comprimento de onda de absorção e λ_{fl} = comprimento de onda de emissão).

| Fluoróforo | λ_{abs} (nm) CHCl ₃ | λ_{abs} (nm) suspensão PS | λ_{fl} (nm) CHCl ₃ | λ_{fl} (nm) suspensão PS |
|---|--|---|---|--|
|  <p>1 Cianina</p> | 646 | 647 | 664 | 660 |
|  <p>2 Esquarína</p> | 704 | 693 | 724 | 718 |
|  <p>3 Esquaraína</p> | 636 | 650 | 648 | 667 |

5.1.3 Percentual de incorporação dos fluoróforos nas microesferas de poliestireno

No processo de purificação das microesferas foi realizado vários procedimentos de lavagem e posterior centrifugação com água/etanol, com o propósito de eliminar o excesso de fluoróforo adsorvido nas microesferas. A lavagem foi interrompida quando a solução não se apresentava visualmente corada.

Após realizar o procedimento de purificação das microesferas fluorescentes, a porcentagem de fluoróforo que permaneceu incorporado nas mesmas foi avaliada através de leituras das absorbâncias em espectrofotômetro UV-Vis, uma vez que elas seguem a lei de *Lambert-Beer*, que relaciona de forma linear a concentração da solução com a absorbância.

E a partir de uma curva de calibração de absorção no UV dos fluoróforo **1**, fluoróforo **2** e fluoróforo **3** em clorofórmio (Anexo I) uma vez que tanto os fluoróforos quanto o PS são solúveis neste solvente.

As microesferas de PS foram dissolvidas em clorofórmio e a absorção no UV da solução foi medida e usada na equação de Lei de *Lambert-Beer* juntamente com o coeficiente de extinção molar de cada fluoróforo e os resultados obtidos indicaram um teor de 11 % de incorporação para a fluoróforo **1** (cianina), 93 % para o fluoróforo **2** (esquaraína) e 75 % com o fluoróforo **3** (esquaraína). O baixo grau de incorporação do fluoróforo **1** nas microesferas de poliestireno em relação ao fluoróforo **2** pode ser explicada pela presença do grupo carboxila na estrutura do fluoróforo **1**.

Este grupo torna o fluoróforo mais polar e favorece a interação através de ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila do PVA que está presente na solução aquosa, assim como com a água, durante o procedimento de obtenção das microesferas.

5.2. POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO

Para os testes de polimerização em miniemulsão foi escolhido o fluoróforo **3** que apresentou uma incorporação intermediária em relação aos outros nas microesferas obtidas pelo método de emulsificação/evaporação de solvente e também pela maior quantidade disponível para os testes. Foram preparadas microesferas *via* polimerização do estireno em miniemulsão contendo o fluoróforo **3** ($3,6 \times 10^{-3}$ mol/L), que absorve na região de 639 nm e emite na região de 645 nm em solução de CHCl_3 . A polimerização em miniemulsão foi realizada conforme descrito em 4.3. Observou-se que durante a polimerização ocorria à descoloração da solução, conforme mostrada na Figura 43, indicando possível degradação do fluoróforo.

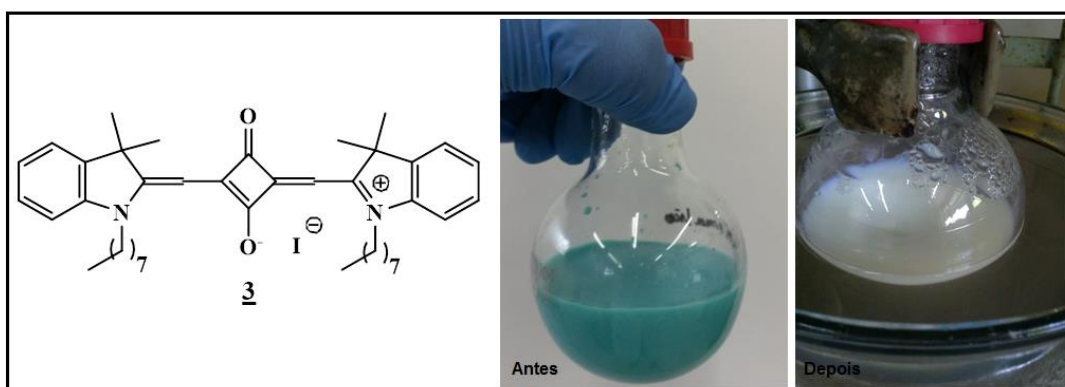


Figura 43: Imagem do fluoróforo **3** e da coloração da miniemulsão antes e depois da reação.

Como a perda de coloração aconteceu depois de 2 h de reação, uma alternativa testada para evitar a degradação do fluoróforo foi à adição do iniciador AIBN, somente após a reação atingir a temperatura de 90°C, ou seja, todo processo de homogeneização foi realizado sem a adição do AIBN. Mesmo empregando esse procedimento, a perda da cor característica do fluoróforo ocorreu cerca de 1h30 min após a adição.

Para confirmar um possível processo de degradação do fluoróforo na presença do AIBN foi realizada uma reação modelo entre AIBN e fluoróforo na razão molar 1:1 em tolueno a 90°C. A reação foi acompanhada em espectrofotômetro UV-Vis e observou-se a perda de coloração após 8h de reação (Figura 44). Na Figura 45 são apresentados os espectros de emissão e excitação do meio reacional após 8h de reação.

O teste também foi realizado à temperatura ambiente em uma solução de fluoróforo e de AIBN em CHCl₃, e após 24 h ocorreu também a mudança de cor, confirmando a instabilidade do fluoróforo na presença do iniciador AIBN.

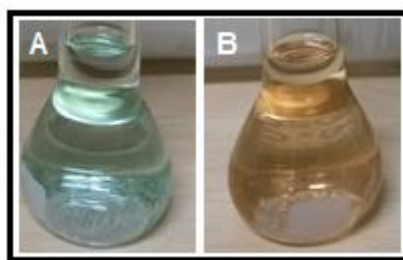


Figura 44: Imagens: (A) AIBN/fluoróforo **3** em 1h e (B) AIBN/fluoróforo **3** em 8 h.

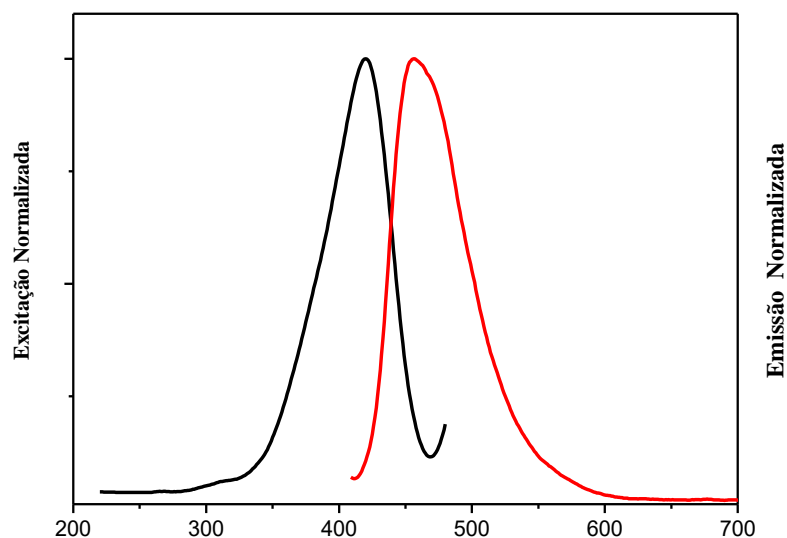


Figura 45: Espectro de excitação (preta) e emissão (vermelho) de fluorescência da reação modelo em Tolueno depois de 8h.

As propriedades fotofísicas mostraram mudanças significativas quando o fluoróforo **3** foi colocado para reagir com o AIBN na temperatura de 90 °C por 8h. Foram observados deslocamentos em ambos espectros. O fluoróforo puro em CHCl₃ apresenta máximos em $\lambda_{\text{abs}} = 639$ nm e $\lambda_{\text{fl}} = 645$ nm e após 8h de reação com AIBN ocorreu um deslocamento para menores comprimentos de onda ficando em $\lambda_{\text{abs}} = 419$ nm e $\lambda_{\text{fl}} = 456$ nm. Esse deslocamento configura uma desestabilização do sistema com perda de conjugação.

Além disso, as bandas de emissão localizadas em torno de 450 nm e 550 nm (Indol) podem estar associadas à decomposição do fluoróforo, que mesmo não mantendo sua estrutura conjugada inicial, apresenta como decomposição outros fluoróforos menos conjugados. Devido a isso foi possível observar fluorescência pela microscopia confocal das nanoesferas obtidas na polimerização do estireno em miniemulsão na presença do fluoróforo **3**, como mostra a Figura 51 B.

As imagens de MEV (Figura 46) mostram esferas na escala nanométrica com distribuição homogênea de tamanho e diâmetro médio de $148 \pm 1,3$ nm determinado por espalhamento de luz dinâmico.

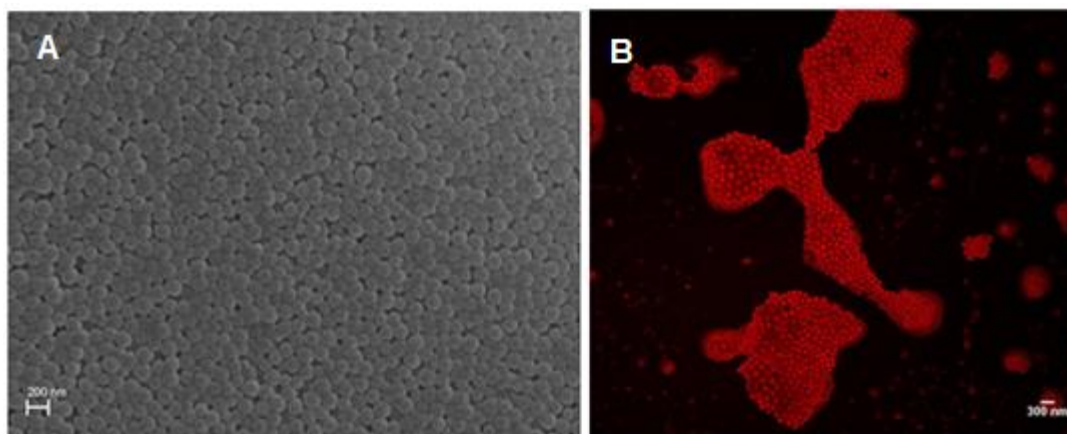


Figura 46: (A) Imagem obtidas por MEV (aumento de 500x) e (B) confocal das nanoesferas fluorescentes (aumento de 30 x) obtidas via polimerização do estireno em miniemulsão contendo o fluoróforo **3**.

Este tamanho de esfera era uma característica esperada com o emprego da polimerização em miniemulsão. Entretanto, cabe ressaltar que para aplicação em ensaios de imunodiagnósticos, o diâmetro das esferas é muito inferior ao pretendido (5 μm), assim seria necessária uma nova etapa de polimerização em emulsão para o crescimento das esferas até o tamanho desejável⁸³.

A incorporação do fluoróforo foi investigada por espectroscopia de UV/Vis. O espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) das nanoesferas de PS dissolvidas em clorofórmio (Figura 47) não apresentou a banda de absorção do fluoróforo **3** ($\lambda_{\text{máx}} = 636 \text{ nm}$)¹⁶, indicando que a quantidade de incorporação deste fluoróforo foi muito baixa, possivelmente por causa de decomposição ocorrida na estrutura do fluoróforo. O resultado obtido foi de apenas 2,8 % de incorporação do fluoróforo **3**, logo o método de miniemulsão e suas condições não possibilitaram uma incorporação eficiente desse fluoróforo, pois o mesmo sofre decomposição para estruturas menos conjugadas na presença do iniciador AIBN.

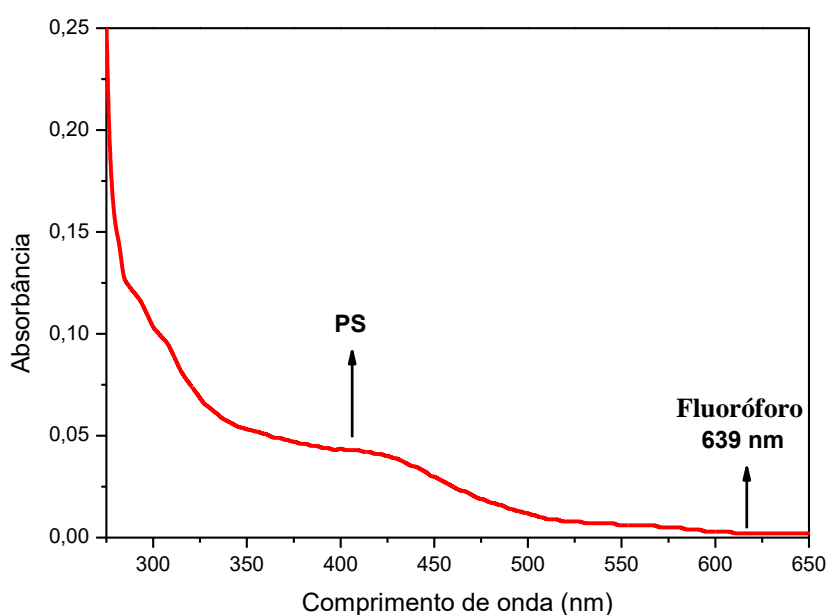


Figura 47: Espectro de absorção na região do UV-Vis em clorofórmio das nanoesferas de PS coradas com o fluoróforo **3** obtidas pelo método miniemulsão ($\lambda_{\text{máx}} = 639 \text{ nm}$).

A polimerização em miniemulsão produziu esferas em tamanhos manométricos e fluorescentes de acordo com a microscopia confocal. No entanto, a incorporação do fluoróforo investigada por espectroscopia de UV/Vis mostrou uma baixa incorporação, possivelmente devido à decomposição do fluoróforo frente ao AIBN como foi comprovado no teste realizado à temperatura ambiente. O uso da técnica de miniemulsão para a obtenção de microesferas para o uso como insumo de diagnóstico não se mostrou tão eficiente, pois seria necessário um novo estudo de iniciadores que não atacassem a estrutura ressonante do fluoróforo além de uma nova etapa de polimerização para o crescimento das esferas no diâmetro desejado.

5.3 SÍNTESE DO POLIESTIRENO FLUORESCENTE VIA ATRP

Devido a parcial incorporação do fluoróforo através dos métodos de emulsificação/evaporação e a decomposição do fluoróforo durante a polimerização radicalar convencional em miniemulsão partiu-se para a utilização do método de polimerização radicalar controlada ATRP usando um iniciador contendo o fluoróforo como substituinte (Figura 48). Este método foi escolhido com o objetivo de sintetizar microesferas de poliestireno contendo os fluoróforos ligados covalentemente à matriz polimérica. Para isso, foram utilizadas estruturas de esquaraínas modificadas quimicamente para atuarem como iniciadores no processo de polimerização via ATRP (Figura 47). Todos os iniciadores fluorescentes apresentaram boa solubilidade no monômero (estireno), descartando assim qualquer possibilidade de precipitação ao longo da polimerização.

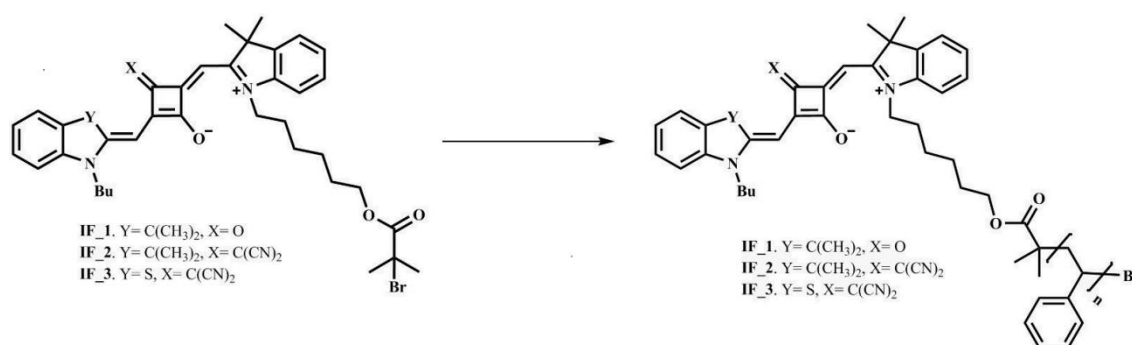


Figura 48: Polimerização ATRP do estireno empregando diferentes iniciadores fluorescentes.

Os fluoróforos (grupo das esquaraínas) precursores dos iniciadores, são pouco reportados na síntese de polímeros fluorescentes via ATRP. Porém, são compostos importantes em síntese orgânica devido aos grupos terminais doadores de elétrons, que apresentam elevado coeficiente de extinção, intensa fluorescência e boa fotocondutividade.

Foram realizadas diferentes sínteses com os iniciadores fluorescentes e as condições de polimerização são resumidas na Tabela 7. As reações foram testadas com e sem o solvente anisol (Entradas **1-3** e **5-10**, respectivamente) na temperatura de 90°C e todos os sistemas foram purgados com argônio e seguindo a mesma ordem de adição dos reagentes (seção 4.2.4).

Tabela 7: Reações com iniciadores fluorescentes (IF).

| Entrada | IF | CuBr/ PMDETA | Anisol (mL) | Tempo (h) | Conv ^(a) . (%) | PDI ^(b) | Mn ^(b) (g/mol) | Mn _{teórico} ^(c) (g/mol) |
|-----------|-----------------|-----------------|----------------|--------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|---|
| 1 | <u>1</u> | 1:1 | - | 48 | 12 | 1,5 | 27740 | 12000 |
| 2 | <u>1</u> | 1:1 | - | 22 | 9 | 1,7 | 25470 | 9000 |
| 3 | <u>1</u> | 1:1 | 5 | 96 | 7 | 2,2 | 22077 | 7300 |
| 4 | <u>1</u> | 10:20 | 5 | 48 | 20 | 1,5 | 63695 | 20000 |
| 5 | <u>2</u> | 1:1 | 5 | 22 | - | - | - | - |
| 6 | <u>2</u> | 2:2 | 5 | 22 | - | - | - | - |
| 7 | <u>2</u> | 10:20 | 5 | 168 | - | - | - | - |
| 8 | <u>2</u> | 10:20 | 2,5 | 22 | - | - | - | - |
| 9 | <u>3</u> | 1:1 | 3 | 22 | - | - | - | - |
| 10 | <u>3</u> | 10:20 | 3 | 48 | - | - | - | - |

(a) Determinado por RMN-¹H (b) Valores obtidos por GPC. (c) Calculado com base na conversão.

A polimerização ATRP do estireno foi realizada com os iniciadores IF **1**, **2** e **3** na razão monômero:CuBr:Ligante:Iniciador igual a 1000:1:1:1 e na ausência de solvente (*bulk* ou em massa) (entradas 1, 5 e 9). Conforme observado na tabela somente para o iniciador IF **1** ocorreu a polimerização. Para os iniciadores IF **2** e **3**, mesmo após 22 h de reação nenhum polímero foi obtido. De acordo com a literatura¹² é possível que a polimerização do estireno não tenha ocorrido devido à complexação do cobre no núcleo da esquaraína, retirando o desativador do equilíbrio da polimerização ATRP. Para evitar essa complexação foi realizada a polimerização do estireno na presença de excesso de cobre e ligante (entradas 6,7,8 e 10). Entretanto mesmo com o aumento na quantidade do sistema catalítico de 2 para 10 equivalentes a polimerização também não ocorreu (entradas 6-8).

Considerando as estruturas dos iniciadores (Figura 30) pode-se supor que, além da presença dos anéis heterocíclicos nitrogenados, a presença do grupo vinilideno dinitrila (IF **2**) e enxofre (IF **3**) interfiram na complexação do metal impedindo a polimerização ATRP. Outra explicação possível é que estes grupos atuem como inibidores da polimerização.

No caso do iniciador IF **1**, devido a ausência destes grupos, a polimerização ocorreu (entradas 1 e 2) porém o rendimento da reação foi baixo ($\cong 10\%$) e o controle da

polimerização ATRP não foi observado, já que a massa molar foi superior ao valor teórico e a polidispersidade superior a 1,2. Testou-se então a polimerização na presença do solvente anisol (entrada 3 – Figura 49) e em diferente proporção de CuBr/PMDETA (entrada 4). Em ambos os casos o controle da polimerização não foi alcançado. Na entrada 4, a $M_{n,exp}$ observada foi superior ao valor teórico (para um rendimento de 20%) e a polidispersidade mais estreita (1,5).

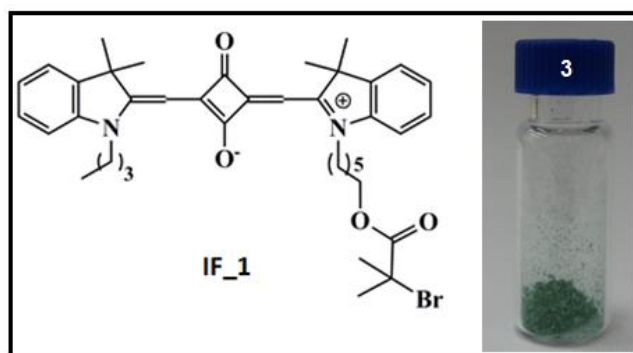


Figura 49: Polímero (entrada 3) obtidos a partir do IF 1 via ATRP.

Conforme observado no caso da polimerização em miniemulsão, é importante salientar que o fluoróforo 3, que possui a mesma estrutura conjugada do iniciador IF 1 sofre ataque do radical livre gerado pela decomposição do iniciador AIBN. Como no caso da ATRP a concentração de radical livre no meio reacional é muito pequena, supõe-se que a polimerização do estireno ocorra antes do iniciador sofrer a decomposição.

Para verificar esta hipótese foi realizada a análise fotofísica, utilizando cerca de 5 mg do polímero fluorescente (entrada 3) que foi lavado com 3 porções de 20 mL de etanol comercial para confirmar que não há perda de fluoróforo. A leitura de UV-Vis foi realizada em cada uma das lavagens e não mostrou nenhum sinal referente ao fluoróforo, evidenciando a ligação covalente existente entre o fluoróforo e a cadeia polimérica.

A medida de absorção UV do polímero lavado foi analisada em solução de $CHCl_3$ de forma a avaliar a fluorescência do mesmo. A emissão na região do UV-Vis apresentou uma banda entre 450 a 600 nm, que corresponde ao polímero e uma banda de absorção em 635 nm (Figura 49), indicando a presença de um polímero fluorescente. O polímero em solução de $CHCl_3$ foi excitado e apresentou comprimento de onda máximo de absorção em 635 nm quase o mesmo em relação ao IF_1 puro e no mesmo solvente que é de $\lambda_{abs} = 639$ nm.

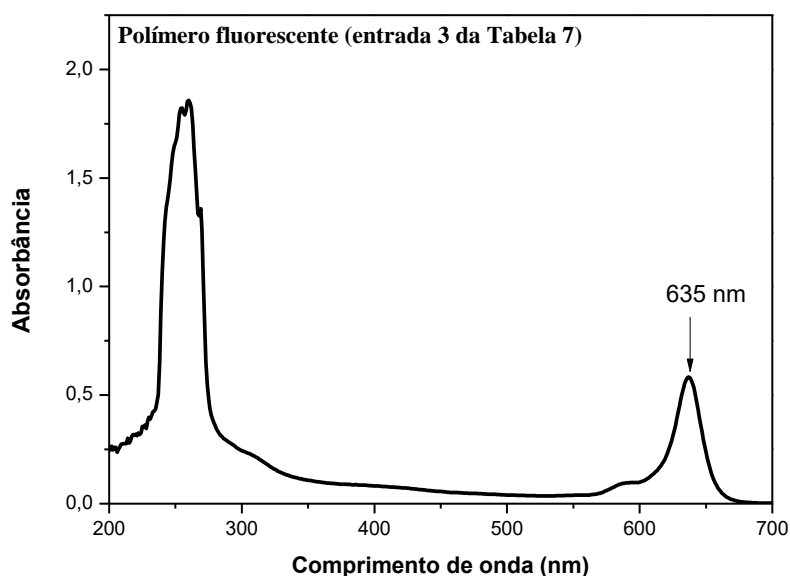


Figura 50: Espectros de absorção na região do UV-Vis em CHCl_3 do polímero obtidos *via* polimerização ATRP.

Comparando o comportamento fotofísico do iniciador IF_1 e do polímero obtido a partir da solução em clorofórmio (Tabela 8), observa-se um deslocamento hipsocrômico tanto para o comprimento de onda do máximo de absorção quanto para o de emissão, comparados em um mesmo solvente.

Tabela 8: Propriedades fotofísicas em CHCl_3 do IF_1 e do polímero fluorescente.

| Amostra | λ_{abs} (nm) | λ_{fl} (nm) |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|
| IF_1 | 636 | 644 |
| Polímero Fluorescente | 635 | 636 |

Analisando os valores de comprimento de onda do máximo de absorção, nota-se um pequeno efeito solvatocrômico em solvente aprótico (3-7 nm) que pode ser explicado ao efeito da polarizabilidade entre o solvente e a molécula. Ocorreu um deslocamento para comprimento de onda de menor energia, possivelmente gerado pela desestabilização eletrostática da carga positiva do cromóforo em relação ao solvente ser aprótico de acordo com a Figura 50.

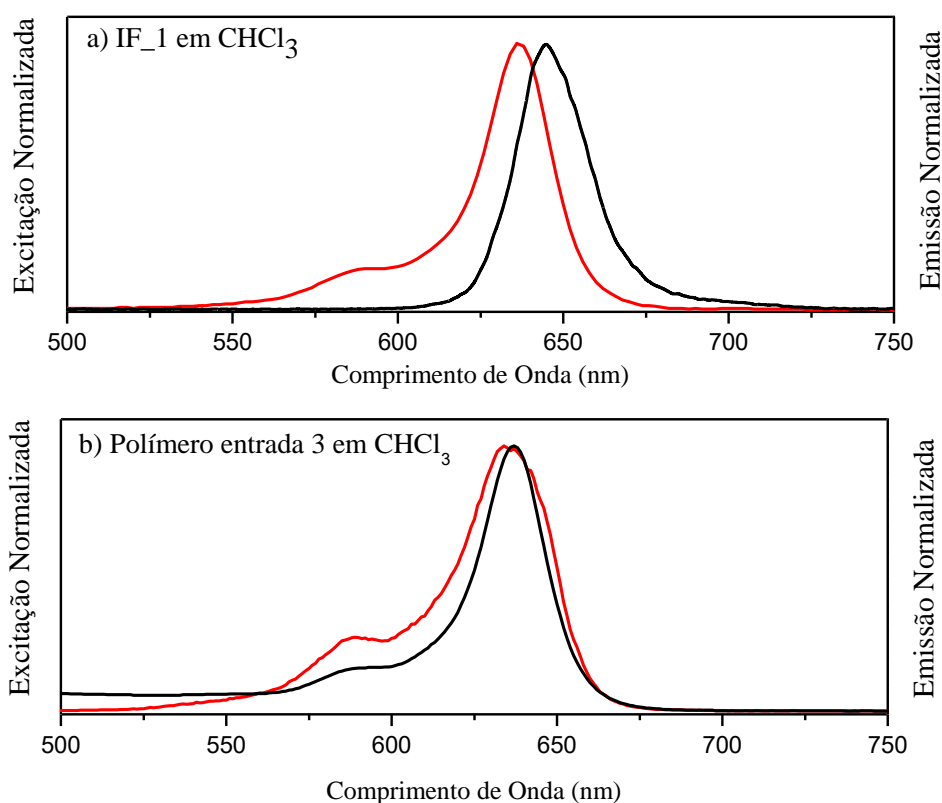


Figura 51: Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência: a) IF_1 Puro em CHCl_3 e b) Polímero em CHCl_3 (Entrada 3 da Tabela 7).

Usando a técnica de polimerização ATRP foi possível sintetizar polímero fluorescente a partir de um iniciador fluorescente, em um sistema com baixa concentração radicalar.

5.4 SÍNTESE E MODIFICAÇÃO DAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO COM ÁCIDO OLÉICO

A síntese de nanopartículas magnéticas de ferro (NPM) também é um objetivo deste trabalho, visando posteriormente à preparação de microesferas de poliestireno fluorescentes e magnéticas. Neste capítulo será apresentada a síntese de NPM modificadas e a caracterização das mesmas por espectroscopia no infravermelho, raman difração de raios-X, e propriedades magnéticas.

5.4.1 Modificação de partículas magnéticas com ácido oléico – NPMm

Utilizando o método descrito na literatura, mas com algumas modificações durante o processo, foi investigada a preparação de nanopartículas de óxido de ferro modificadas com ácido oleico. Foram realizadas 3 sínteses de nanopartículas partindo do método de coprecipitação (ver procedimento experimental). As amostras foram identificadas como: NPMm-1, NPMm-2 e NPMm-3 e NPM (nanopartículas magnéticas sem adição de ácido oleico). Para todos experimentos foi mantida a proporção de $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ constante e a mesma velocidade de agitação. Após a produção das nanopartículas foi adicionado ácido oleico e o pH final ajustado em torno de 7. Foi possível observar uma resposta magnética da suspensão e do pó das NPM e NPMm1-3 com uma simples aproximação de um campo magnético, como ilustrado na Figura 52.

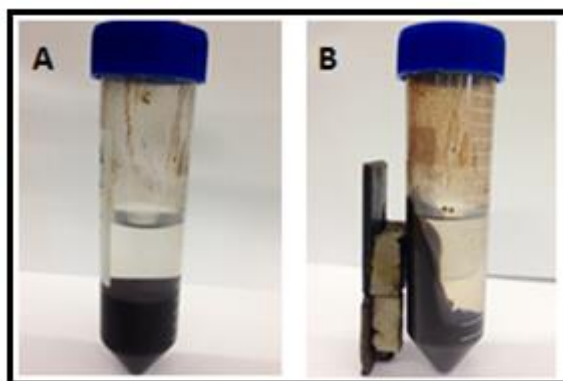


Figura 52: NPM1(A) e a resposta magnética (B) em tolueno com campo externo.

As nanopartículas foram caracterizadas por DRX, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e infravermelho por transformada de Fourier (IV).

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) fornece informações importantes sobre a composição das fases de óxidos metálicos nas nanopartículas e também com relação à interação da molécula de ácido oleico na superfície das partículas de óxido de ferro.

Na Figura 53 são mostrados os espectros das NPM e NPMm3 (com ácido oleico). As bandas de absorção características da vibração do grupo $-\text{CH}_2$ da cadeia alquílica do ácido oleico aparecem em 2920 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} e 1435 cm^{-1} e são claramente observadas no espectro das nanopartículas magnéticas modificadas com ácido oleico - NPMm3 e, conforme

esperado, não aparecem no espectro das NPM. A presença das bandas em 1520 e 1425 cm^{-1} são atribuídas aos modos de vibração do grupo carboxílico e mostram que o ácido oleico está interagindo com o óxido de ferro através de seus ânions, possivelmente por adsorção química do surfactante com a superfície do óxido de ferro.

Devido ao método de coprecipitação ser realizado em meio aquoso, a superfície das nanopartículas magnéticas não modificadas é revestida por grupos hidroxilas e as bandas características dos grupos hidroxila-OH são observadas em aproximadamente em 1460 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} .

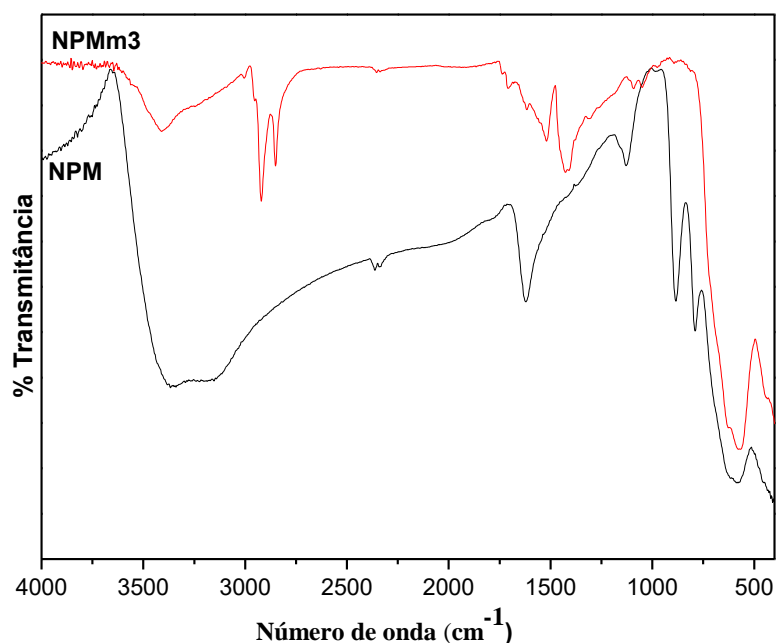


Figura 53: Espectro de FTIR NPM de (A) nanopartículas magnéticas e (B) NPMm3 nanopartículas magnéticas modificadas com ácido oleico.

Na Figura 54 são apresentados os espectros de FTIR da região de 900-500 cm^{-1} das nanopartículas magnéticas. A banda em aproximadamente 585 cm^{-1} corresponde à vibração da ligação Fe-O, confirmando a presença de óxido de ferro nas amostras, que pode ser tanto magnetita, magnemita ou de outras espécies de óxido de ferro. De acordo com a literatura¹³⁰ a magnetita apresenta bandas na região de 600 a 550 cm^{-1} . Para caracterização destas fases foi realizada a difração de raios-X das amostras (Figura 55).

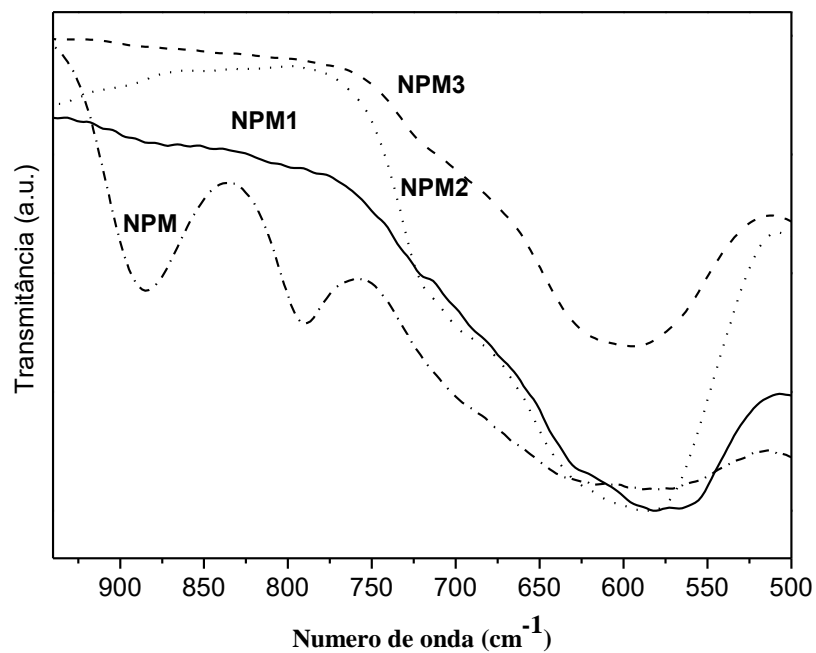


Figura 54: Espectros de FTIR da região de 900-500 cm^{-1} das nanopartículas magnéticas.

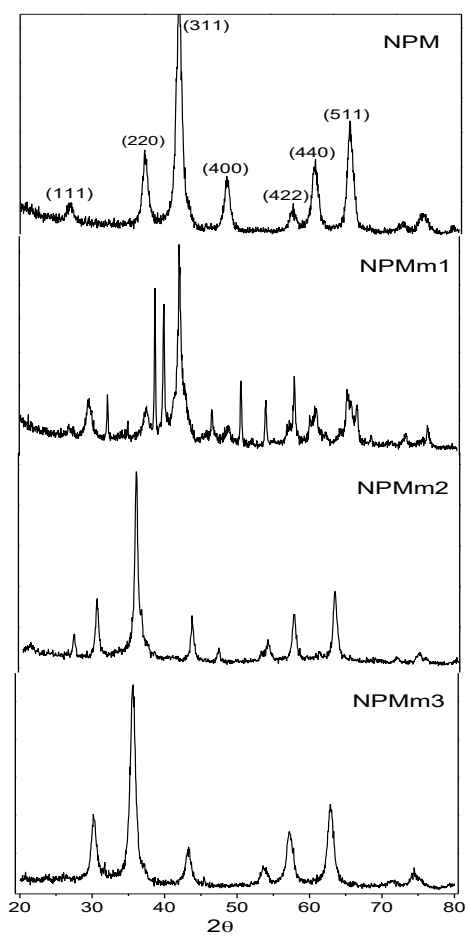


Figura 55: Padrão de DRX das nanopartículas magnéticas.

A amostra designada como NPM é o produto preparado nas mesmas condições que a NPMm3 sem qualquer adição de surfactante orgânico e considerado como referência. Na Figura 54 os padrões de DRX (*JPDS-19-629*)¹⁵⁴ mostram a presença da magnetita em todas as amostras com picos observados em $2\theta = 25, 30.2, 35.5, 43.5, 53.6, 57.3$ e 62.7° , correspondendo às fases em (111), (220), (311), (400), (422), (440) e (511). Além da magnetita, observa-se também a fase magnemita.

De acordo com os padrões (*JPDS 39-1346*)¹⁵⁵, as amostras NPMm3 e NPMm2 produziram em maior porcentagem a fase de magnetita com alto grau de cristalinidade. Já a amostra NPMm1 apresenta as fases de magnetita, magnemita e hematita. Usando um cálculo semi-quantitativo de Relação Intensidade de Referência (RIRs)⁸⁸ pode-se estabelecer os percentuais de cada uma das fases existentes.

Para determinar o diâmetro médio das nanopartículas de ferro modificadas (Tabela 9) foi calculado através do pico mais intenso presente nos difratogramas, de acordo com a equação de *Debye-Scherrer*:

$$D_{hkl} = k\lambda/\beta\cos\theta \quad (\text{Equação 4})$$

Onde D_{hkl} é o tamanho médio das nanopartículas, β expressa a largura a meia altura da linha de difração (FWHM) do pico (311), k é a constante de Boltzmann (0,89), λ é o comprimento de onda do $Cu_{k\alpha}$ ($\lambda=0,15406$ nm), θ é ângulo de difração em 2θ .

Tabela 9. Diâmetro de partícula a partir da equação de *Debye-Scherrer*.

| Amostra | Diâmetro (nm) |
|---------|---------------|
| NPMm | 16,3 |
| NPMm1 | 35 |
| NPMm2 | 21 |
| NPMm3 | 26,2 |

A proporção de cada fase foi calculada usando uma metodologia semi-quantitativo de Relação Intensidade de Referência (RIRs)⁸⁸ pode-se estabelecer os percentuais de cada uma das fases existentes (Tabela 10).

Tabela 10. Percentual das fases em cada amostra.

| Amostra | Magnetita (%) | Magnemita (%) | Hematita (%) |
|---------|---------------|---------------|--------------|
| NPM | 85 | 8 | 6 |
| NPMm-1 | 59 | 13 | 27 |
| NPMm-2 | 72 | 18 | 8 |
| NPMm-3 | 73 | 21 | 5 |

Com base em dados de XRD, foi possível determinar a composição das nanopartículas magnéticas modificadas nas diferentes sínteses. A diferença no percentual das fases pode estar relacionada a uma combinação de fatores tais como: o tipo de base usada (NaOH ou NH₄OH), atmosfera inerte ou ao ar, temperatura e o valor de pH das reações.

No entanto, uma quantidade muito grande de hematita foi obtida na amostra NPMm-1 no qual durante a síntese não foi usado o HCl. O uso do HCl em solução de cloreto de ferro é para evitar um valor muito alto de pH (superior a 11), logo após a adição da base. De acordo¹⁵⁶, com a literatura a fase magnemita é formada em pH entre 9,7 -10,6, enquanto a magnetita em pH superior a 11.

A diferença nas composições entre as amostras de NPM e NPMm-3, preparadas utilizando o mesmo procedimento foi devido, principalmente à presença de ácido oleico, que diminui o pH promovendo a formação da fase magnemita.

As imagens obtidas por MEV (Figura 55) mostram a morfologia superficial das NMPs, onde se observa aglomerados de partículas, lembrando a forma esférica. Os aglomerados podem ser formados durante o processo de secagem à temperatura média de 100°C. O fenômeno de agregação entre as nanopartículas é, então, atribuído ao crescimento por coalescência dos núcleos, resultando em partículas que tendem a se agregar, na direção de um estado de menor energia livre, pela redução de interfaces com o meio.

A amostra NPMm-3 apresentou a melhor morfologia entre as sínteses, mostrando a presença de partículas de óxido de ferro com textura mais regular e homogênea.

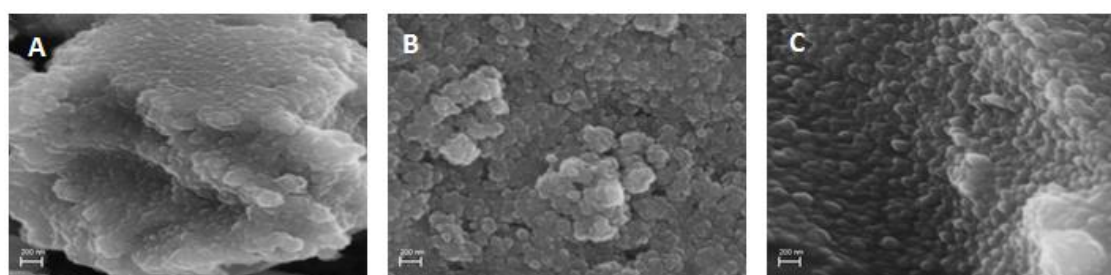


Figura 56: Imagens de microscopia eletrônica de varredura: A) NPMm1, B) NPMm2 e C) NPMm3.

Na Figura 57 (A) observa-se a amostra NPMm3 e ao redor da partícula (coroa) a presença de material orgânico, proveniente do ácido oleico – surfactante. Os padrões de difração, *spots* referentes à estrutura cristalina ordenada (núcleo), são mostrados na Figura 62 (B).

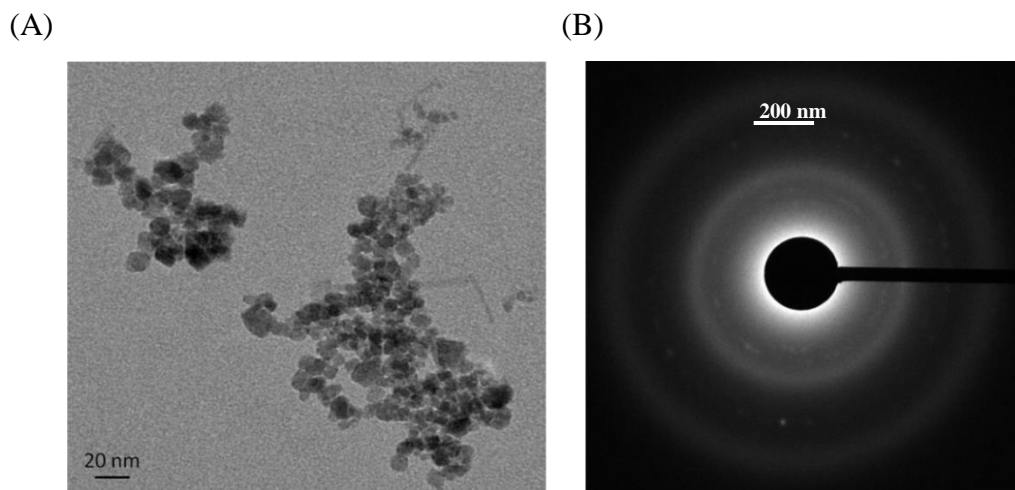


Figura 57: Imagem de TEM das nanopartículas de ferro NPMm3 (A). Padrão de Difração de elétrons da nanopartícula NPMm3 (B).

A avaliação termogravimétrica da estabilidade das NPMs pode ser observada na Figura 58. A amostra NPM, nanopartículas de Fe_3O_4 sem modificação, apresentou uma perda de massa de aproximadamente 6,8% atribuída provavelmente à evaporação de água e etanol utilizados na preparação da mesma. O ácido oleico puro apresentou uma grande perda de massa na temperatura de 171 °C.

As amostras NPMm modificadas com ácido oleico apresentaram três processos de perda de massa: uma pequena perda de massa até 200 °C, provavelmente devido a compostos voláteis (solventes e água) e duas entre 200 e 455 °C correspondendo a dessorção de ácido oleico da superfície das nanopartículas magnéticas (Tabela 11). De acordo com *Yan et. al.*¹⁵⁷ a primeira perda (260 °C) está associada à adsorção física e a segunda (455°C) à adsorção química.

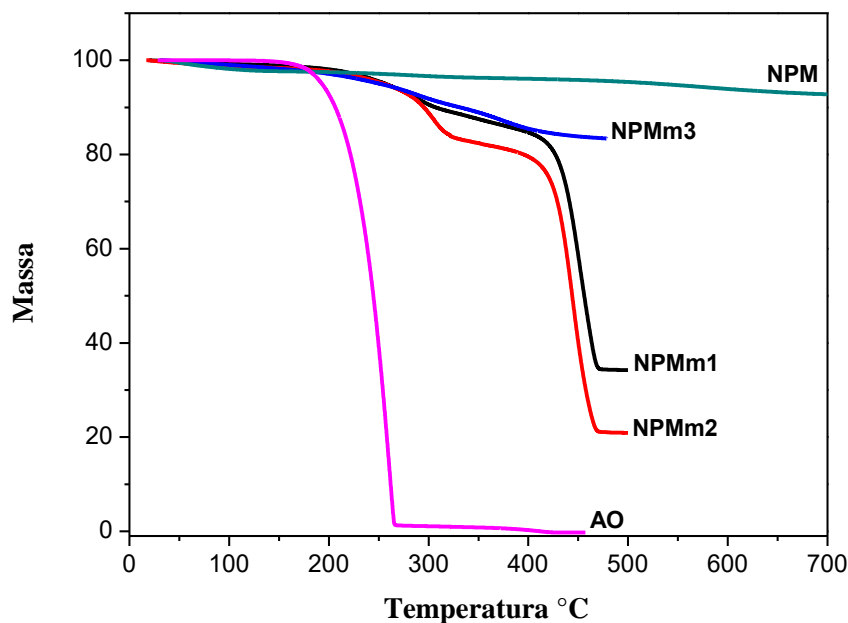


Figura 58: Termogramas AO e as NPM, NPMm1, NPMm2 e NPMm3.

As amostras NPMm1, NPMm2 e NPMm3 apresentaram na segunda perda de massa respectivamente, 17,5%, 9,3% e 5,5%, aproximadamente, correspondendo a dessorção física do ácido oleico. A segunda perda associada à adsorção química foi de 76%, 61% e 7%, respectivamente. A Tabela 11 apresenta as temperaturas máximas que correspondem à decomposição do material orgânico e o resíduo material inorgânico que não se decompõem termicamente.

Tabela 11. Tabela dos dados de temperaturas iniciais e resíduos de TGA

| Amostra | T _{Max1} | T _{Max2} | Resíduo % |
|---------|-------------------|-------------------|-----------|
| AO | 171 | - | 0,3 |
| NPM | 217 | 332 | 93,19 |
| NPMm1 | 298 | 452 | 34,00 |
| NPMm2 | 305 | 444 | 20,53 |
| NPMm3 | 255 | 363 | 85,31 |

A massa residual é maior para amostra de menor diâmetro de partícula [NPMm-3] (85,3%), ou seja, a menor modificação com ácido oleico (aproximadamente 15%). Isso pode ser explicado pela razão área/volume da amostra. A NPMm-3 foi a única metodologia que utilizou atmosfera inerte durante todo o processo de síntese, o que contribuiu para a formação de nanopartículas de diâmetro menor. As amostras NPMm-1 e NPMm-2 apresentaram alto

teor de ácido oleico, provavelmente devido ao método de preparação, o qual contribuiu para a formação de aglomerados.

Os modos Raman mais encontrados na literatura para a magnetita¹⁵⁸ são os três modos vibracionais que aparecem em torno de 670, 544 e 300 cm^{-1} . Como discutido na seção 3.7 a magnetita pode sofrer um processo de oxidação mudando para a fase magnemita e hematita, mais estável, causando modificações no espectro, pois as fases apresentam estruturas cristalinas diferentes.

As nanopartículas modificadas apresentaram (Figura 58 e 59) uma banda fraca de ácido oleico devido aos modos de assimetria ($\nu_a \text{CH}_3$) 2959 cm^{-1} e simetria ($\nu_{as} \text{CH}_3$) 2959 cm^{-1} . Também, foram observadas bandas dos grupos metilo e metileno. Bandas menores em 2936 cm^{-1} (νCH), 2848 cm^{-1} ($\nu_s \text{CH}_2$), 1176 cm^{-1} (νCC), 1066 cm^{-1} (νCC) e em 1308 cm^{-1} devido aos alcanos da cadeia.

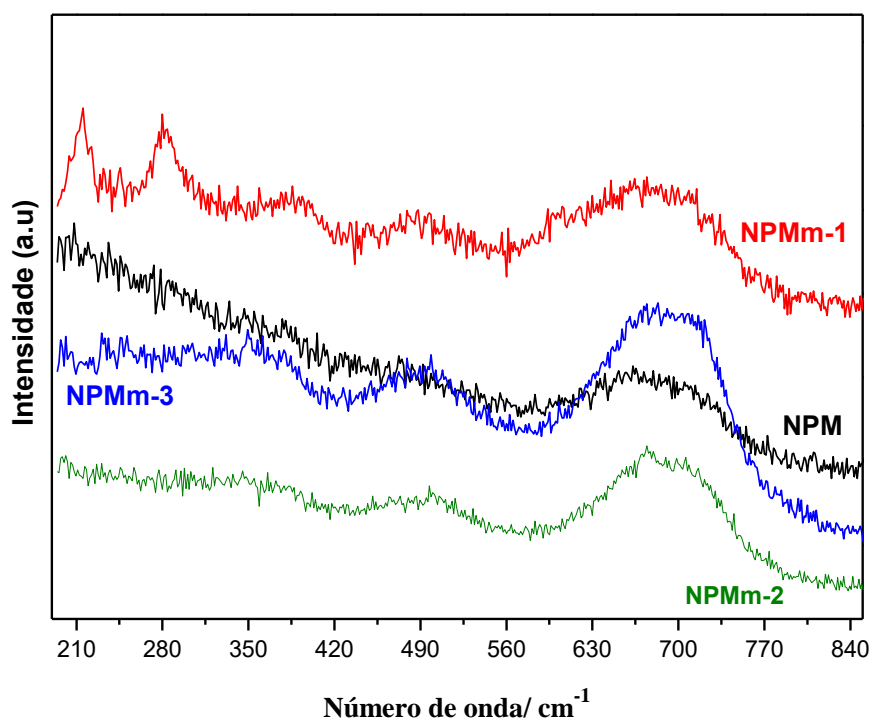


Figura 59: Espectros de Raman obtidos das nanopartículas na faixa de 200 a 850 cm^{-1}

1.

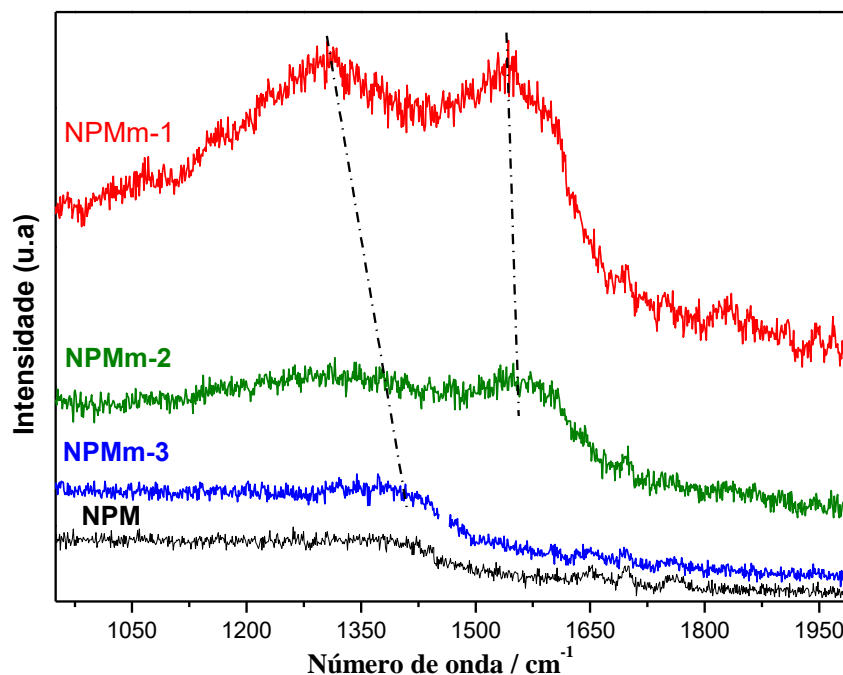


Figura 60: Espectros de Raman obtidos das nanopartículas na faixa de 1000 a 2000 cm^{-1} .

O comportamento magnético das nanopartículas magnéticas também foi avaliado pelas curvas de histerese magnética. O comportamento magnético é sensível às variações do tamanho da partícula, devido aos efeitos de superfície gerados pela quebra de simetria da rede cristalina. As partículas com tamanhos nanométricos nem sempre possuem monodomínios magnéticos e, sim, multidomínios de menor dimensão, ou seja, um número grande de momentos magnéticos encontra-se na superfície da partícula.

A Figura 60 apresenta as curvas de magnetização versus campo magnético na temperatura ambiente das amostras no estado sólido com a aplicação de um campo magnético de -20 a $+20$ KOe. As curvas de magnetização apresentam valores de magnetização em unidades de emu (*electromagnetic units*) por unidade de massa das nanopartículas NPM ($\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$). A magnetização de saturação mostrou valores em torno de 50 emu/g , sabendo que a magnetização de saturação da magnetita é de 92 emu/g^{158} todas apresentaram um valor inferior de acordo com a Tabela, além de uma diminuição da magnetização à medida que diminui o tamanho das partículas (ver Tabela 12).

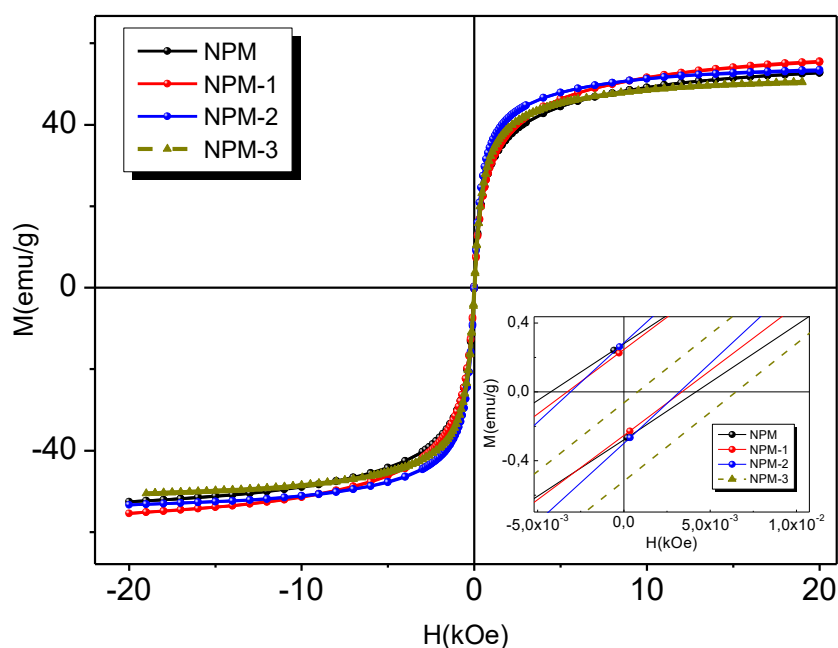


Figura 61: Curva de magnetização para as amostras de NPMm. Em destaque, ampliação da região central da curva.

Tabela 12: Valores de magnetização de saturação (M_s), magnetização de remanência (M_r) e campo coercivo (H_c) das amostras:

| Amostra | Tamanho (nm) | Massa (g) | M_r (emu/g) | M_s (emu/g) | H_c (Oe) |
|---------|-----------------|--------------|------------------|------------------|---------------|
| NPM | 16,3 | 0,017 | 0,28 | 52,7 | 8,5 |
| NPM1 | 35 | 0,018 | 0,24 | 55,5 | 6,9 |
| NPM2 | 21 | 0,010 | 0,43 | 50,5 | 8,1 |
| NPM3 | 26,2 | 0,019 | 0,24 | 55,3 | 6,3 |

A presença de coercividade e de uma baixa magnetização remanescente (M_r) indicam um comportamento superparamagnético para as nanopartículas. A magnetização de saturação e a remanescente na amostra NPMm2 foi de 50,5 e 0,43 emu/g diferente das demais amostras em que a magnetização remanescente foi menor em torno de 0,24 emu/g e a saturação foi maior.

Estas diferenças estão relacionadas com a funcionalização química das nanopartículas com moléculas orgânicas sobre a superfície. Já existem estudos sobre como os grupos

orgânicos e o meio onde as nanopartículas se encontram alteram seu comportamento magnético¹⁵². O grupo carboxilado diminui a magnetização de saturação da partícula. Outros autores relatam desordem dos spins superficiais (*spin canting*) em óxidos de ferro, na qual os spins estão aleatoriamente orientados ou ainda a presença de uma camada bem fina (~1nm) magneticamente inativa.

De acordo, com a magnetização de saturação a tendência é $NPMm1 > NPMm3 \sim NPM > NPMm2$ que corrobora com o tamanho determinado pela técnica de DRX. Podemos observar de modo geral, que as amostras não apresentam ciclo de histerese, indicando que as mesmas possuem um comportamento superparamagnético (isso significa que são atraídas fortemente por um campo magnético, mas assim que esse campo é removido, sua magnetização é reduzida a zero).

As nanopartículas sintetizadas NPM3 (método 3 seção 4.2.5) foram incorporadas às microesferas de poliestireno por métodos e são apresentados nas próximas seções.

5.5 PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS DE POLIESTIRENO MAGNETIZADAS ATRAVÉS DA POLIMERIZAÇÃO EM EMULSÃO.

5.5.1 Emulsões do tipo Água/Óleo

A polimerização em emulsão A/O do estireno foi realizada empregando diferentes surfactantes em uma fase aquosa contendo as nanopartículas magnéticas não modificadas com ácido oleico. Para estabilizar a suspensão das NPM foi adicionado ácido acrílico (AA), que além de apresentar um grupo carboxílico para interagir com a superfície da NPM, possui um grupo acrilato, capaz de copolimerizar com estireno. Após a formação da emulsão a mesma foi transferida para um balão de vidro juntamente com o iniciador AIBN e permaneceu por 2 h a uma temperatura de 70 °C.

Na tabela 13 são apresentadas as diferentes formulações usando o mesmo surfactante, solvente e quantidade de estireno. O surfactante usado foi o PGPR não iônico. As variações ficaram na quantidade de nanopartículas adicionadas e o meio de agitação.

Tabela 13: Formulações das emulsões do tipo A/O.

| Entrada | Nano Fe (mg)* | H₂O (mL) | St (g) | Surfactante (g) | Cicloexano (mg) | Agitação |
|----------------|----------------------|----------------------------|---------------|------------------------|------------------------|-----------------|
| AO3 | 50 | 1 | 3 | PGPR: 0,71 | 9 | Ultrassom |
| AO4 | 50 | 1 | 3 | PGPR: 0,71 | 9 | Turrax |
| AO5 | 50 | 1 | 3 | PGPR: 0,71 | 9 | Turrax |
| AO8 | 50 | 1 | 3 | PGPR: 0,71 | 9 | Turrax |
| AO9 | 20 | 1 | 3 | PGPR: 0,71 | 9 | Ultrassom |
| AO10 | 20 | 1 | 3 | PGPR: 0,71 | 9 | Ultrassom |
| AO11 | 20 | 1 | 3 | PGPR: 0,71 | 9 | Ultrassom |

*Nanopartículas de ferro não modificadas.

** Agitação: meio de homogeneização.

Durante o processo ocorreu à formação de emulsão, porém não houve estabilização, ocorrendo à separação das fases quase que imediatamente após a agitação.

Apesar das diversas tentativas usando diferentes quantidades de nanopartículas, os sistemas apresentaram separação de fase no momento da emulsão e ao término das reações. Isso pode ser explicado pelo fato do AIBN não ser o melhor iniciador para esse tipo de emulsão, pois este é solúvel na fase orgânica (fora das micelas). A polimerização que ocorre primeiro deve ser a do estireno e as cadeias de poliestireno deveriam migrar para as micelas favorecendo a copolimerização do ácido acrílico na interface. Entretanto esse fato não foi observado.

Outra possibilidade seria usar um iniciador solúvel na fase aquosa, de modo que primeiro ocorra à polimerização do ácido acrílico, migrando para a micela e polimerizando o estireno.

5.5.2 Emulsões do tipo Óleo/Água

Como as emulsões O/A não apresentaram boa estabilidade usando as nanopartículas de ferro não modificadas, alternativa foi à polimerização em emulsão O/A (óleo em água).

Inicialmente as nanopartículas magnéticas modificadas com ácido oleico foram dispersas na fase aquosa utilizando ultrassom e em seguida foi adicionado estireno (monômero) e hexadecano (HD) (coestabilizador) e o sistema foi mantido em agitação magnética durante 1 h para a preparação de uma pré-emulsão. Foram testadas emulsões em branco sem a adição das nanopartículas e com a adição, visando uma comparação entre elas

(Tabela 14).

Após foi adicionado o AIBN, água (MilliQ), SDS e ácido acrílico que foram homogeneizados em ultrassom com uma amplitude de 50 %, em 2 min, pulso de 5s e 5s de pausa. Para a homogeneização realizada em Turrax (homogeneizador de alta velocidade) foi usada uma rotação de 800 rpm durante 5 min. A emulsão foi polimerizada com agitação mecânica durante 18 h a 70 °C.

Tabela 14: Formulações das emulsões do tipo O/A.

| Entrada | Nano Fe* (mg) | St (g) | HD (mg) | AIBN (mg) | H₂O (mL) | SDS (mg) | AA (g) | Agitação** |
|----------------|--------------------------|-------------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 10 | 1,5 | - | 50 | 15 | 45 | 0,15 | Ultrassom |
| 1B | - | 1,5 | - | 50 | 15 | 45 | 0,15 | Ultrassom |
| 2 | 10 | 1,5 | 68 | 27 | 15 | 45 | 0,15 | Ultrassom |
| 2B | - | 1,5 | 68 | 27 | 15 | 45 | 0,15 | Ultrassom |
| 3 | 10 | 1,5 | 68 | 27 | 15 | 45 | 0,15 | Turrax |
| 3B | - | 1,5 | 68 | 27 | 15 | - | 0,15 | Turrax |

*Nanopartículas de ferro modificadas com ácido oleico.

** Agitação: meio de homogeneização.

Foi possível a obtenção das esferas (nano) a partir de uma emulsão água em óleo (O/A), usando as proporções da Tabela 14. A amostra 1 e 1B não foram realizadas na presença do hexadecano e não ficaram tão estáveis quanto as outras amostras. As emulsões do tipo O/A realizadas na presença do hexadecano e com as nanopartículas de ferro modificadas apresentaram maior estabilidade, tanto na formação da emulsão quanto após a polimerização, como mostra a Figura 62.

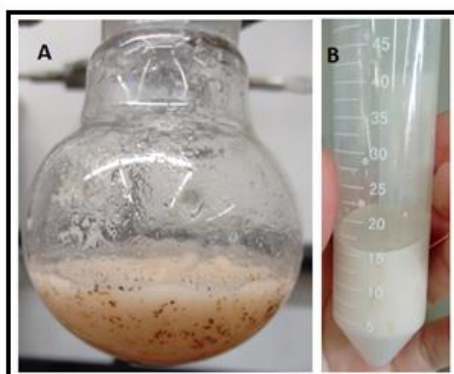


Figura 62: Fotografias: (A) - emulsão A/O e (B) - emulsão O/A.

A morfologia esférica das amostras foi confirmada pelas imagens obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura – MEV (Figura 62 e 64) na amostra 2 enquanto que na amostra 3 a morfologia esférica aparece com uma maior heterogeneidade de tamanho no contorno da esfera. A presença do ferro foi confirmada por Espectroscopia por Dispersão de Energia – EDS (figura 63 e 65).

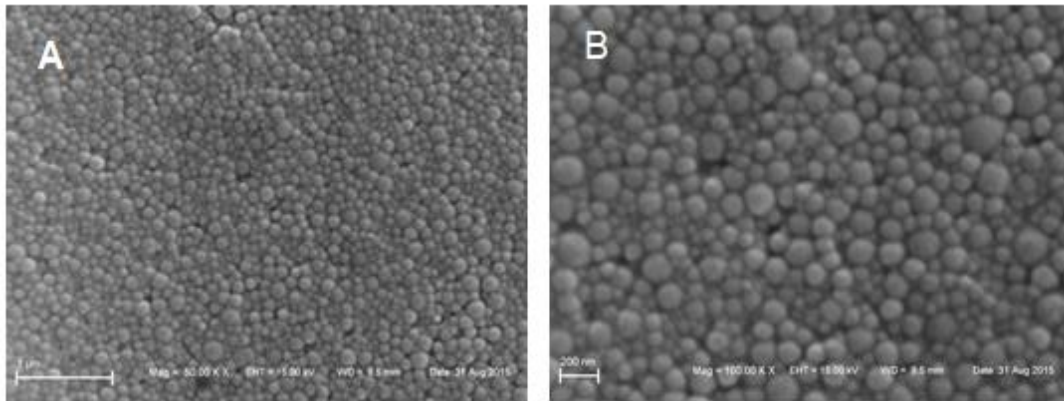


Figura 63: Micrografias da amostra 2.

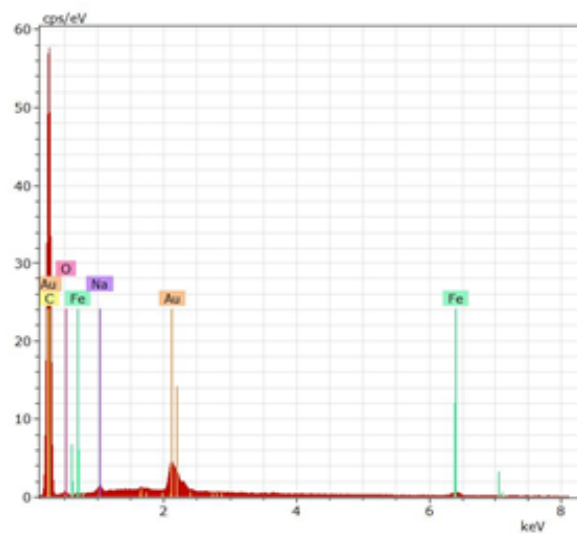


Figura 64: Espectro de EDS da superfície 2.

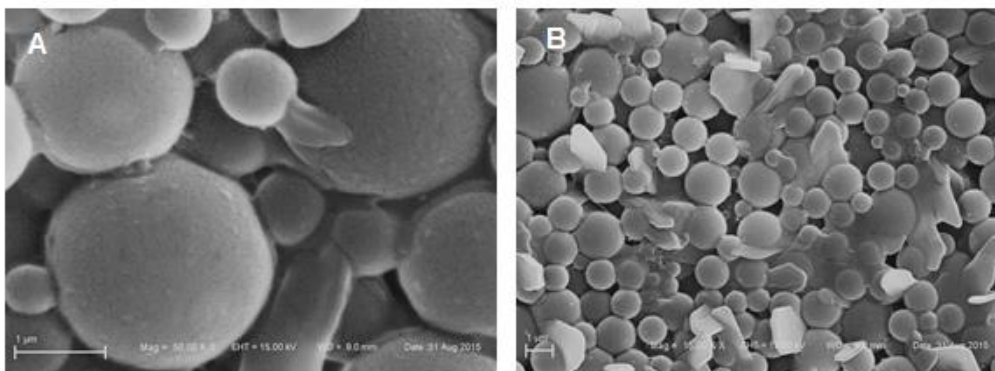


Figura 65: Micrografias da amostra 3.

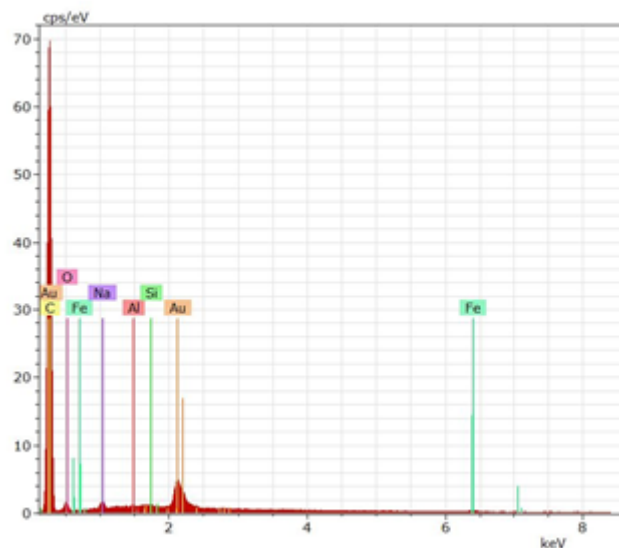


Figura 66: Espectro de EDS da superfície da 3.

No EDS, a presença de ferro (Fe) nos picos 6,4 keV (Fe-K-alfa) e em 0,7 (Fe-L-Alfa) é confirmada, no entanto o ouro (Au) é devido ao recobrimento da amostra realizado antes da análise e o alumínio (Al) devido ao porta amostra (*stub*). Com relação ao Na (sódio) em 1,04 keV pode ser devido ao uso do surfactante SDS⁶.

Como os sistemas permaneceram estáveis mesmo após a polimerização e foi possível realizar a determinação do diâmetro médio por espalhamento de luz das esferas formadas, como mostra a Tabela 15.

Tabela 15: Diâmetro médio das microesferas obtidas por espalhamento de luz.

| Amostra | Diâmetro médio |
|---------|----------------|
| Mini 2B | 86,7 nm |
| Mini 2 | 1124,7 nm |
| Mini 3B | 128,7 nm |
| Mini 3 | 788,3 nm |

Os resultados mostram que o diâmetro médio das esferas 2B e a 3B são menores, pois são amostras que não contém as nanopartículas de ferro. Já as amostras 2 e 3 que foram preparadas com as nanopartículas de ferro modificadas, o diâmetro médio foi maior. Na Figura 66 são apresentadas as curvas de histerese das amostras Mini 2 e 3 no estado sólido e a temperatura ambiente.

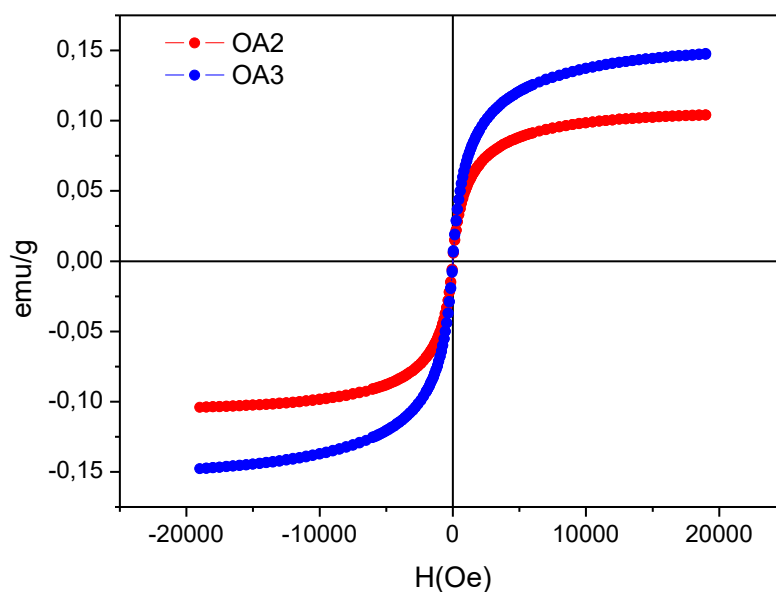


Figura 67: Curvas de Histerese das amostras 2 e 3.

Em ambas as amostras não foram observadas ciclo de histerese, indicando que as mesmas possuem um comportamento superparamagnético. De acordo com a magnetização de saturação a amostra 3 pode apresentar uma anisotropia cristalina maior que a amostra 3.

A técnica de emulsificação A/O não promoveu a obtenção das esferas magnéticas de poliestireno partindo de partículas de ferro sem funcionalização. Já a emulsificação O/A na presença de um coestabilizador, como o hexadecano e na presença de partículas magnéticas modificadas com ácido oleico mantiveram a emulsão mais estável e a produção de nanoesferas com comportamento superparamagnético.

5.6 OBTENÇÃO DE NANOESFERAS MAGNÉTICAS E FLUORESCENTES DE POLIESTIRENO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO.

A polimerização em miniemulsão foi realizada para obter nanoesferas magnéticas de poliestireno (NM) e nanoesferas fluorescentes e magnéticas de poliestireno (NFM). Durante a polimerização-foi observada uma mudança de cor de azul para branco leitoso na presença do fluoróforo **3**. A Figura 67 mostra as fotos em que podemos observar a mudança da coloração do meio reacional após transcorridas 2 horas de reação. Uma hipótese que pode justificar a perda da coloração original do fluoróforo 3 é que o radical livre gerado pela decomposição do

iniciador AIBN tenha reagido com o fluoróforo decompondo a sua estrutura conjugada, a qual é responsável pela coloração da molécula.

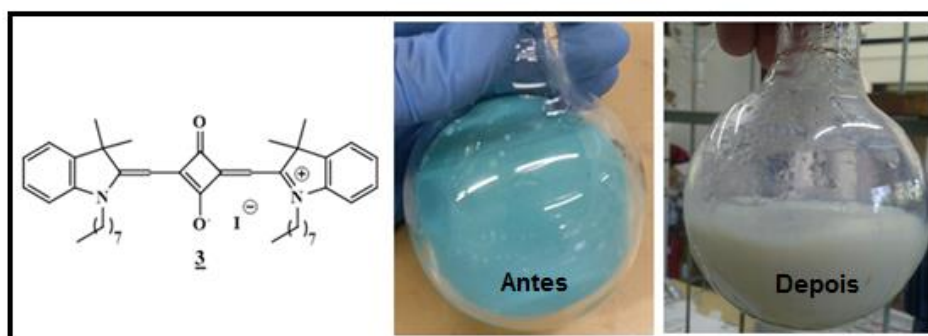


Figura 68: Estrutura química do fluoróforo **3** e as fotos do frasco reacional mostrando a perda da coloração após duas horas de reação.

Como a perda de coloração aconteceu depois de 2 h de reação, uma alternativa testada para evitar a degradação do fluoróforo foi adicionar o AIBN, somente após a reação atingir a temperatura de 90°C, ou seja, todo o processo de homogeneização foi realizado sem a adição do AIBN. Porém, mesmo assim a perda da cor característica do fluoróforo ocorreu.

Para confirmar se houve ou não modificação estrutural do fluoróforo **3** devido ao iniciador radicalar usado na reação de miniemulsão, foi realizada uma reação entre o AIBN e fluoróforo **3** em tolueno em temperatura ambiente num tempo de 8 h e foram tiradas fotos da solução após 1 hora e 5 horas de reação (Figura 69 A e B). A perda da coloração foi investigada por espectroscopia de UV-vis e de fluorescência (Figura 69 A e B). Foi observado que houve o desaparecimento das bandas de absorção (639 nm) e de fluorescência (645 nm) do fluoróforo **3** e o aparecimento de novas bandas com absorção em 420 nm e emissão em 456 nm. O grande deslocamento hipsocrômico observado em ambos os espectros (~ 200 nm) mostra que a estrutura eletrônica do fluoróforo **3** não foi mantida, o que é um forte indicativo de que o AIBN provocou a decomposição da molécula. Para saber a estrutura desta(s) nova(s) molécula(s) seria necessário realizar a reação em maior escala, o torna-se inviável devido a pequena quantidade de composto disponível.

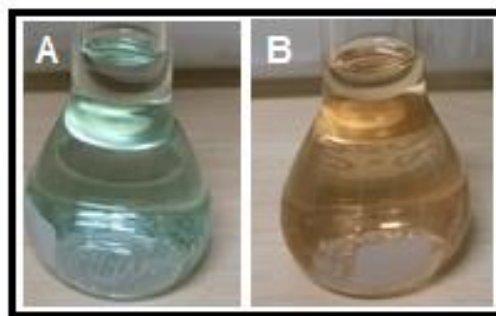


Figura 69: Imagens: (A) AIBN/fluoróforo **3** em 1h e (B) AIBN/fluoróforo **3** em 5h.

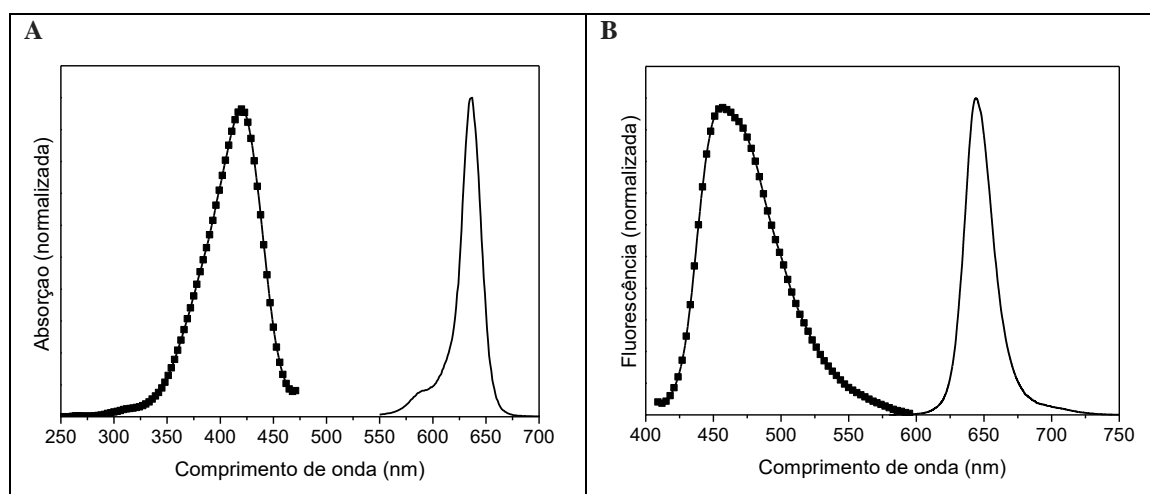


Figura 70: Espectros de absorção no ultravioleta-visível (A) e de emissão de fluorescência (B) do fluoróforo **3** em clorofórmio (—) e após 5 horas de reação com AIBN em tolueno (■).

O espectro de absorção na região do ultravioleta-visível das NFM dissolvidas em clorofórmio (Figura 70) não apresentou a banda de absorção correspondente ao fluoróforo **3** em $\lambda_{\text{máx}} = 639$ nm. O espectro de absorção das nanopartículas modificadas com ácido oleico (NPM) em clorofórmio apresenta uma banda alargada entre 400 a 550 nm¹⁵³.

A Figura 71 mostra o espectro de emissão das NFM contendo o fluoróforo **3** no estado sólido. Em solução não foi possível observar banda característica do fluoróforo. Em solução de clorofórmio o comprimento de onda máximo foi de 639 nm e no estado sólido deslocou para 649 nm, ou seja, um efeito batocrômico.

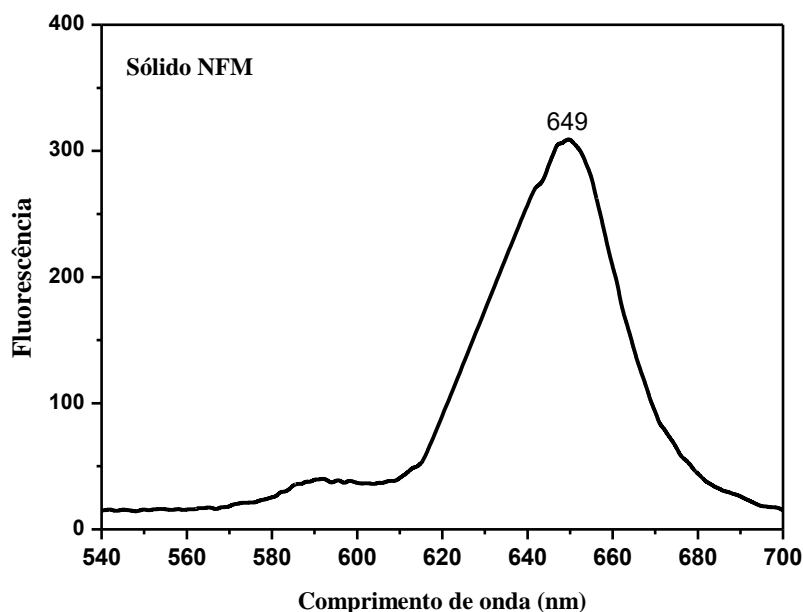


Figura 71: Espectro de emissão de fluorescência em estado sólido da NFM.

A microscopia das NFM (Figura 72 A) mostra a presença de esferas de diâmetro $138 \pm 1,2$ nm sobre uma superfície de polímero. A microscopia confocal (Figura 71 B) foi realizada para avaliar a presença do fluoróforo no interior das nanoesferas magnéticas e a fluorescência foi pouco intensa, indicando baixa incorporação de fluoróforo através método de polimerização em miniemulsão como já verificado anteriormente (seção 5.1.2.3). Além disso, observa-se uma distribuição de fluorescência que não é semelhante a uma forma esférica.

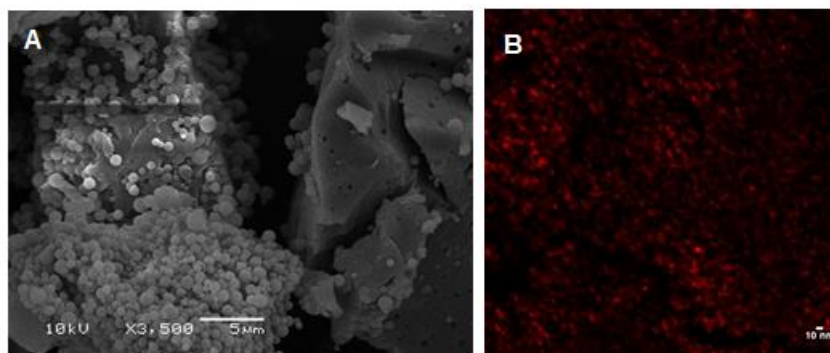


Figura 72: Imagem de MEV (A) e Confocal (B) das NFM.

O comportamento magnético das NM e NFM foi avaliado pelas curvas de histerese (Figura 73). Para esta análise as amostras foram previamente secas em estufa por 2 h à 40 °C.

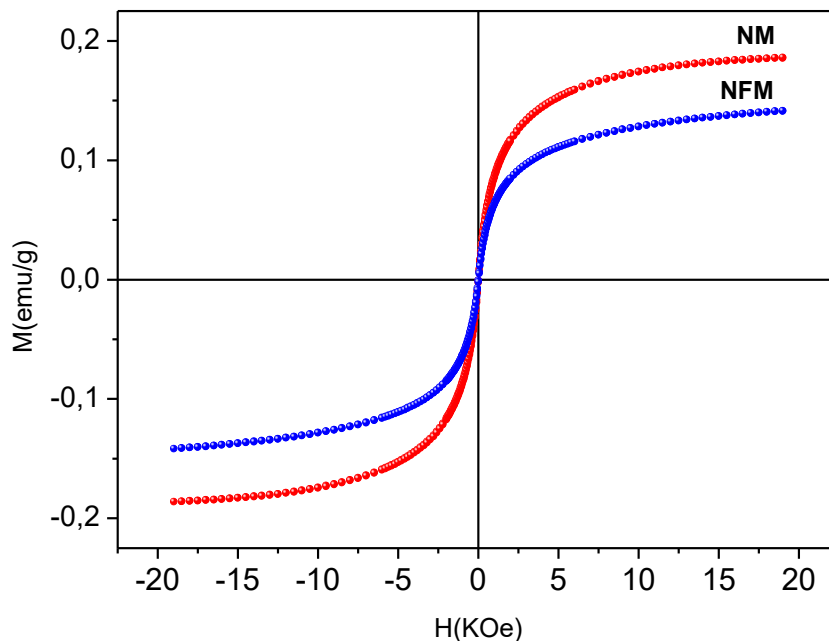


Figura 73: Curva de Magnetização para as amostras NM e NFM a partir da polimerização em miniemulsão.

As curvas de histerese das nanoesferas apresentaram uma pequena diferença na magnetização de saturação, $M_s=0,18$ emu/g para as nanoesferas magnéticas de poliestireno e $M_s=0,14$ emu/g para as nanoesferas fluorescentes e magnéticas de poliestireno. O material magnético sendo o mesmo, quanto maior for à quantidade de ferro incorporado na matriz polimérica, maior será a sua magnetização de saturação. O comportamento é superparamagnético em ambas as curvas, pois não apresentam ciclo de histerese.

5.7 OBTENÇÃO DE MICROESFERAS MAGNÉTICAS E FLUORESCENTES DE POLIESTIRENO PELO MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE (EEV):

Foram preparadas microesferas magnéticas sem fluoróforo (MM) para avaliação do comportamento magnético e microesferas fluorescentes magnéticas contendo 3 mg ($4,83 \times 10^{-5}$ mol) do fluoróforo **3** conforme método de emulsificação/evaporação de solvente (EEV) descrito na seção 4.2.6 As microesferas contendo fluoróforo (MFM) apresentaram uma

coloração azul característica e as microesferas magnéticas (MM) coloração marrom, característica das nanopartículas magnéticas (MM), como se pode observar na Figura 74.

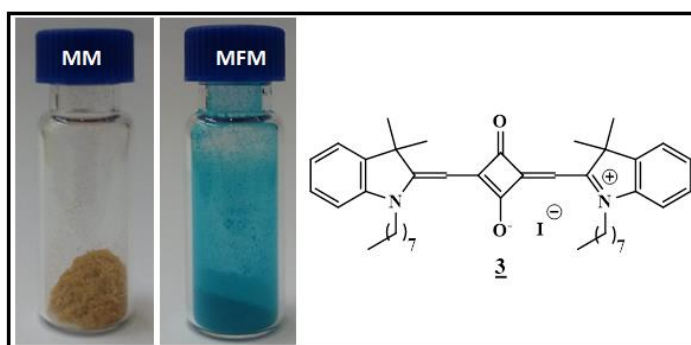


Figura 74: Imagem das MM e MFM e do fluoróforo **3**.

A Figura 75 apresenta os espectros de excitação e emissão de fluorescência das microesferas fluorescentes e magnéticas de poliestireno (MFM) dissolvidas em CHCl_3 , e do fluoróforo **3** em solução CHCl_3 , de acordo com a literatura¹⁶.

As propriedades fotofísicas das MFM não mostraram mudanças significativas com relação ao fluoróforo **3** em clorofórmio, ocorrendo um pequeno deslocamento de 3 nm tanto no espectro de absorção quanto no de emissão. Comparativamente ao método de polimerização do estireno em miniemulsão, pode-se dizer que o método de EEV é mais adequado para o preparo de microesferas magnéticas e fluorescentes, uma vez que a integridade da molécula foi mantida.

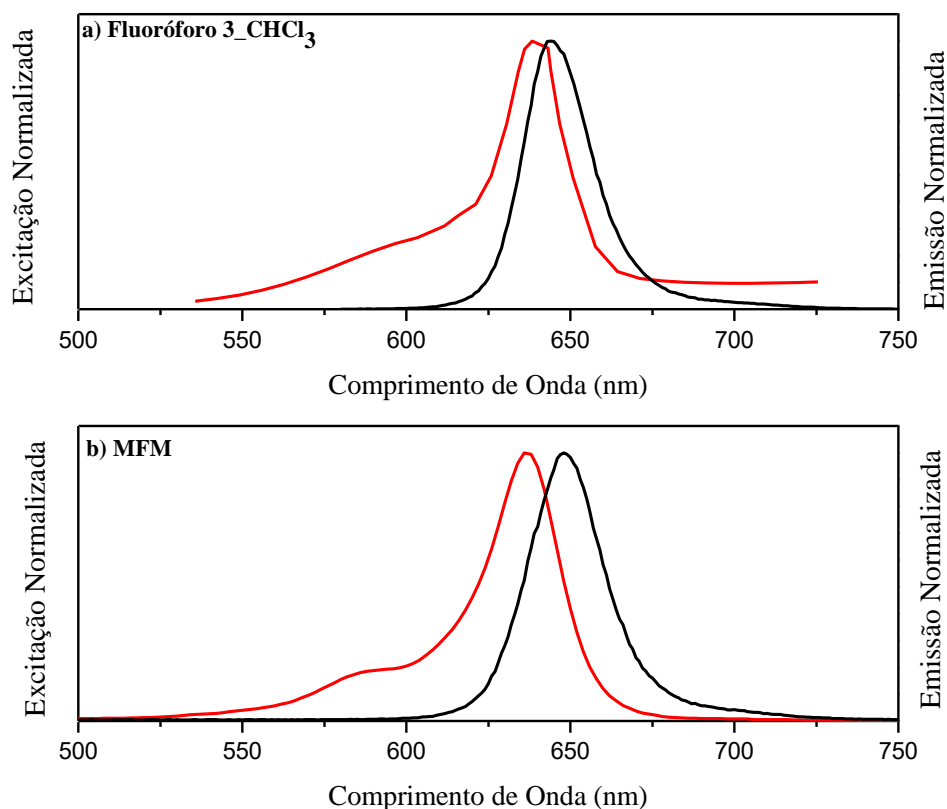


Figura 75: Espectros de excitação (vermelho) e emissão (preto) de fluorescência: a) fluoróforo **3** em CHCl₃ e b) das MFM em CHCl₃ [4×10^{-5} M].

Após a purificação das microesferas fluorescentes e magnéticas, a porcentagem de fluoróforo **3** incorporado nas mesmas foi avaliada através de espectroscopia de UV em clorofórmio (Figura 76). O total adicionado foi 3 mg ($4,83 \times 10^{-5}$ mol) do fluoróforo **3** e de acordo com a absorbância medida o teor incorporação e usando a equação de *Lambert-Beer* foi 55 %.

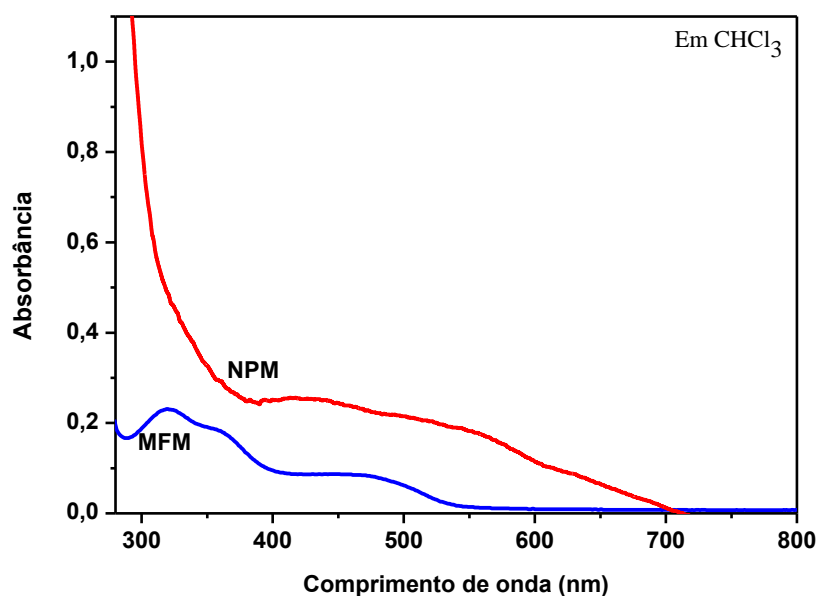


Figura 76: Espectro de absorção na região do UV-Vis em CHCl₃ das MFM com o fluoróforo **3** e das MM em CHCl₃.

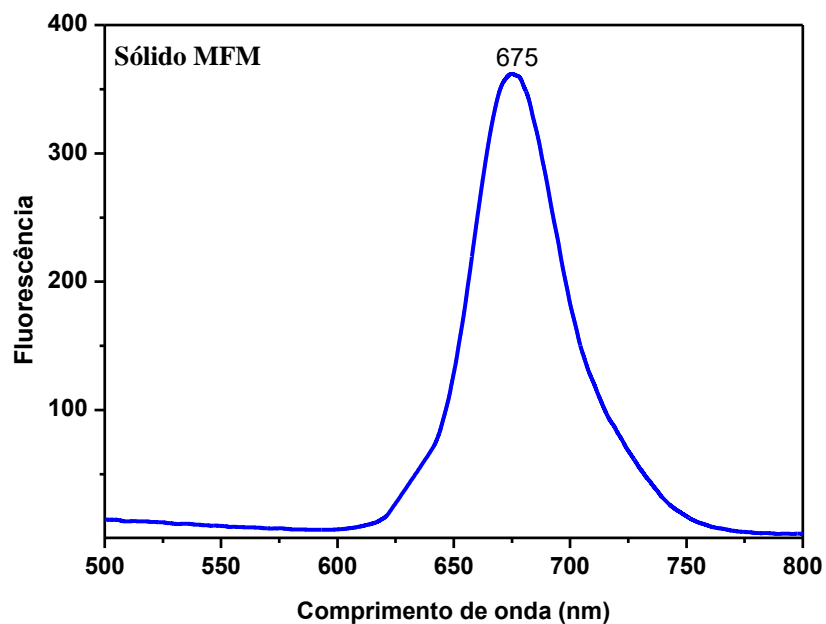


Figura 77: Espectro de emissão de fluorescência em estado sólido da MFM.

Na Figura 79 é apresentada a imagem de MEV das MFM, observa-se uma forma esférica com distribuição relativamente homogênea e diâmetro médio de $8,0 \pm 2,1 \mu\text{m}$

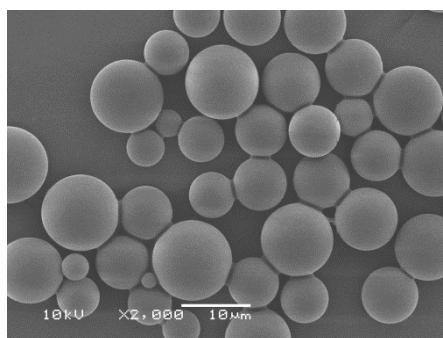


Figura 78: Imagem de MEV das MFM.

Na Figura 79 são mostradas as imagens de microscopia confocal das microesferas fluorescentes e magnéticas com o fluoróforo **3**. Independente do plano focal, a fluorescência encontra-se distribuída por todo interior e é possível observar a presença do material magnético sem aglomeração.

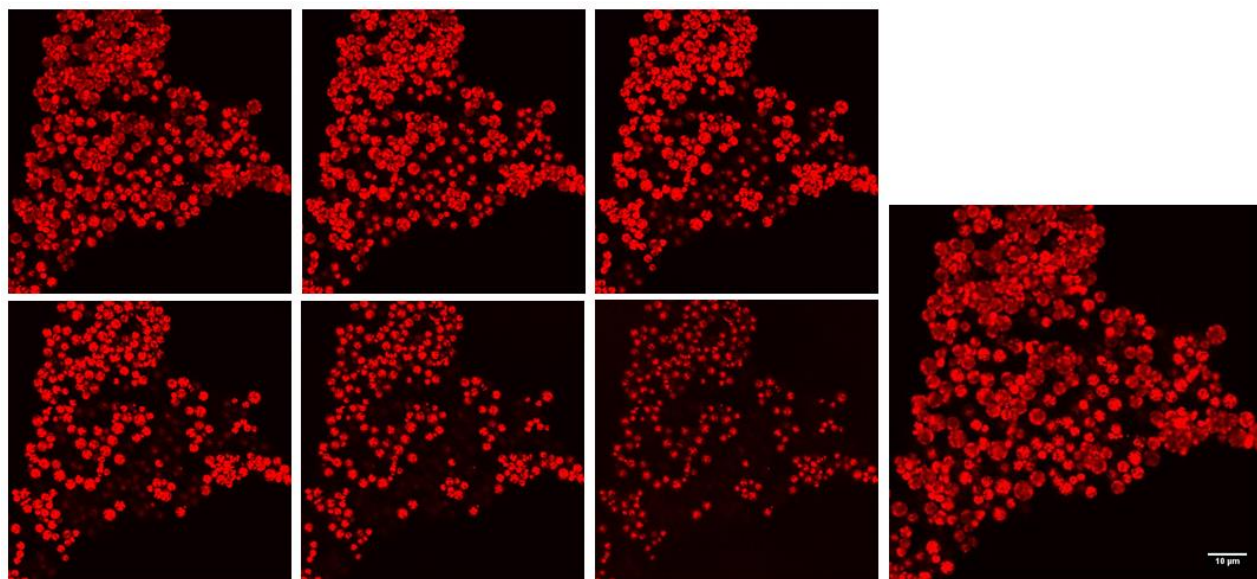


Figura 79: Micrografias confocal das MFM contendo o fluoróforo **3** em diferentes planos focais.

O comportamento magnético das microesferas magnéticas de poliestireno (MM) e das microesferas fluorescentes magnéticas de poliestireno (MFM) foram investigados a partir das curvas de histerese (Figura 79). Para as microesferas magnéticas de poliestireno (MM) obteve-se uma magnetização de saturação $M_s=0,6$ emu/g e para as microesferas fluorescentes

e magnéticas de poliestireno (MFM) de $M_s=0,19$ emu/g. A literatura mostra que para um mesmo material magnético, quanto maior for à quantidade de ferro incorporado na matriz polimérica, maior será a sua magnetização de saturação.

Outro fator importante é o efeito estérico que a molécula do fluoróforo pode causar, complexando com o Fe e com os oxigênios. Além disso, podemos observar que ambas as curvas não apresentam ciclo de histerese, logo, um comportamento superparamagnético.

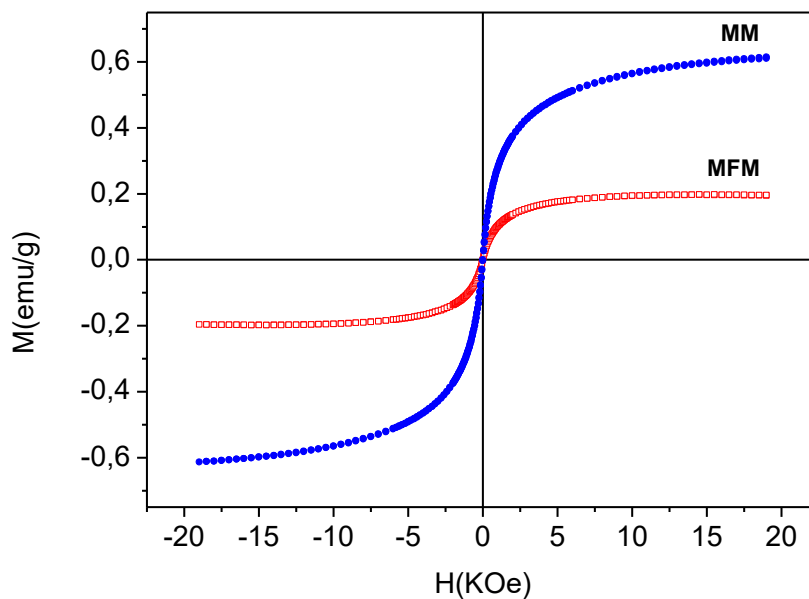


Figura 80: Curva de Magnetização para as amostras MM e MFM a partir do método de emulsificação/evaporação do solvente

O método de emulsificação/evaporação do solvente foi eficiente na obtenção de microesferas magnéticas com comportamento superparamagnético, sem aglomeração entre o material magnético e fluorescente. A incorporação do fluoróforo ficou em torno de 55 %, considerado um rendimento ainda baixo para a utilização das microesferas como suporte sólido nos testes de diagnóstico.

6. CONCLUSÕES

O método de emulsificação/evaporação de solvente foi a técnica mais promissora para a produção de microesferas de poliestireno de tamanho entre 5 a 10 μm . O uso de diferentes agentes coagulantes (PVA, SDS e PVP) não apresentou significativa mudança no diâmetro, porém a variação na velocidade de homogeneização promoveu diferentes diâmetros com uma distribuição homogênea. A condição adotada para a preparação das microesferas foi a que manteve o tamanho próximo de 5 μm .

A variabilidade do tamanho das esferas foi estudada na etapa de adição da fase orgânica a fase dispersa, primeiro variando a taxa de adição com um dosador numa razão menor (taxa 5 mL.min⁻¹) proporcionou uma distribuição de tamanho mais homogêneo, porém um aumento no tamanho médio. O gotejamento externo a solução foi o que mostrou uma maior distribuição mais estreita de tamanho.

A obtenção de microesferas fluorescente foi possível pelo método de emulsificação/evaporação de solvente utilizando os fluoróforos 1, 2 e 3, fluorescência comprovada com imagens da microscopia confocal, independente do plano focal. A distribuição homogênea no interior das microesferas, sem pontos de aglomeração indicou que as moléculas de fluoróforos tiveram uma boa compatibilidade com o PS.

Entre os três fluoróforos, o 1 (cianina) foi a que teve as propriedades fotofísicas menos alteradas quando incorporada nas microesferas. Já os fluoróforos 2 e 3 (esquaraínas) tiveram deslocamentos nos seus espectros (hipsocrômico e batocrômico, respectivamente) quando se faz uma comparação entre os seus espectros puros em clorofórmio e quando incorporadas nas microesferas. Porém, em todos os casos observou-se que as bandas de absorção e de emissão sofreram um alargamento quando em suspensão aquosa comparativamente ao composto dissolvido em clorofórmio, possivelmente associado ao espalhamento de luz proveniente da suspensão aquosa, tendo em vista que as microesferas não são solúveis em água.

A incorporação dos fluoróforos pelo método de emulsificação/evaporação de solvente nas microesferas de PS indicaram um teor de 11 % de incorporação para a fluoróforo 1 (cianina), 93 % para o fluoróforo 2 (esquaraína) e 75 % com o fluoróforo 3 (esquaraína).

Polímeros fluorescentes foram obtidos via polimerização ATRP e mostraram em solução de CHCl_3 um comprimento de onda máximo de absorção em 635 nm quase o mesmo em relação ao IF_1 puro e no mesmo solvente que é de $\lambda_{\text{abs}} = 636$ nm. A síntese só é possível com esses iniciadores fluorescentes em baixas concentrações radiculares.

A polimerização em miniemulsão e suas condições não possibilitaram uma incorporação eficiente do fluoróforo **3**, pois o mesmo sofreu decomposição para estruturas menos conjugadas na presença do iniciador AIBN. As propriedades fotofísicas mostraram também mudanças significativas, como um deslocamento para menores comprimentos com relação ao fluoróforo puro em CHCl_3 . Com essa perda da conjugação o resultado da incorporação foi de apenas 2,8 % do fluoróforo **3**.

As diferentes rotas para a obtenção das nanopartículas magnéticas apresentaram certa tendência quanto à magnetização de saturação: $\text{NPMm1} > \text{NPMm3} \sim \text{NPM} > \text{NPMm2}$ que corrobora com o tamanho determinado pela técnica de DRX. As amostras não apresentam ciclo de histerese, indicando que as mesmas possuem um comportamento superparamagnético (isso significa que são atraídas fortemente por um campo magnético, mas assim que esse campo é removido, sua magnetização é reduzida a zero).

A técnica de emulsificação A/O não promoveu a obtenção das esferas magnéticas de poliestireno partindo de partículas de ferro sem funcionalização. Já a emulsificação O/A na presença de um coestabilizador, como o hexadecano e na presença de partículas magnéticas modificadas com ácido oleico mantiveram a emulsão mais estável e a produção de nanoesferas com comportamento superparamagnético.

O método de emulsificação/evaporação do solvente foi eficiente na obtenção de microesferas magnéticas com comportamento superparamagnético, sem aglomeração entre o material magnético e fluorescente. A incorporação do fluoróforo **3** ficou em torno de 55 %, considerado um rendimento ainda baixo para a utilização das microesferas como suporte sólido nos testes de diagnóstico.

7. REFERÊNCIAS

1. <http://inct.cnpq.br/web/inct-indi/home> (Acessado em: 10. Março 2016)
2. Kellar, K.L; Iannone, M.A., *Exp Hematol*, **2002**, 30, 1227.
3. GADELHA, C. A. G. Seminário sobre Complexo Econômico-Industrial da Saúde. **Banco Nacional do Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, 2008.
4. PIERCENET. Protein stability and storage and Elisa. Disponível em: <http://www.piercenet.com/files/TR0043-Protein-storage.pdf> Acessado em: Junho, 2016.
5. Dunbar, S.A., *Clin Chim Acta*. **2006**, 363, 71.
6. LUMINEX CORP. **Applications**. Austin. Disponível em: <http://www.luminexcorp.com/Applications> Acesso em: 06. Maio **2013**.
7. Ellington, A.A., Kullo, I.J., Bailey, K. R. Kelee, G., *Clin Chemi*, **2010**, 56, 186.
8. Braeckmans, K., De Smedt S. C., Leblans, M., Pauwels R., Demeester, J.; *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, 1, 447-456.
9. Tighe, P.J., Negm, O., Todd, I., Fairclough, L.; *Cytokine Methods*, **2013**, 63, 1, 23-29.
10. Tighe, P. J., Ryder, R.R., Todd, I., Fairclough, L., *Proteomics Clin. Appl.*, **2015**, 406, 25.
11. Heike Erna Brand: **Desenvolvimento de teste diagnóstico para a triagem sorológica de diversas infecções virais**. 23/04/2014 (Tese apresentada na Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação OswaldoCruz, para obtenção do grau de Doutor em Ciências).
12. Viracor. IBT. Disponível em: <http://www.viracoribt.com/Learning-Lab/Luminex> Acesso em: 15 Abril 2015.
13. Liu, Z.L.; Yang, X.B.; Yao, K.L.; *J Mag Matter* **2006**, 302, 529.
14. Vasseur, S. Duguet, E., Portier, J., Goglio, S., Mornet, S., Hadova, E., Knizek, K., Marysko, M., Veverka, P., Pollert, E., *J. Mag. Mag. Mat.* **2006**, 302, 315.

15. Pisoni, D.S., Todeschini, L., Borges, Petzhold, C.L., Rodembusch, F.S., Campo, L.F., *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 5511–5520.
16. Pisoni, D. S.; de Abreu, M. P.; Petzhold, C. L.; Rodembusch, F.S.; Campo, L. F. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2013**, 252, 77.
17. Ramírez, L.P.; Landfester, K.; *Macromol. Chem. Phys.* **2006**, 204, 22.
18. Poletto, F.S.; Silveria, R.P.; Fiel, L.A.; Donida, B.; Rizzi, M., Guterres, S.; Pohlmann, A.R., *Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, 9, 9.
19. Kawaguchi, H., Biomedical applications of polymeric materials. Boca Raton, **1993**, 299-324.
20. Matyjaszewski; K.; Xia, *Chem. Rev* **2001**, 101, 2921.
21. Neves, J.S., De Souza, F.G., Suarez, P.A.Z., Umpierre, A.P., Machado, F. *Macromol. Mater. Eng.* **2011**, 296, 1107-1118.
22. Landfester, K., Ramirez, L.P., *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, 204, 22-31.
23. Li Lu, Jiang, S., Xiufang, W., Pihui, P., Zhuoru, Y., *Chin. J. Chem. Eng.*, **2006**, 14, 471.
24. TanaKa, T., Sato, E., Hirokawa, S., Petermans, *J. Phys. Rev. Lett.* **1985**, 55, 2455.
25. Kawaguchi, H., *Progm. Polym. Sci.* **2000**, 25, 1171-1210.
26. Geckeler, K.E., Rao, J. P., *Prog. Polym.Sci.* **2011**, 36, 887-913.
27. Gupta, P.K., Hung, C.T., *Life Sci.* **1989**, 44, 175.
28. Dunnil, P., Lilly, M.D., *Biotechnol. Bioeng.* **1974**, 16, 987.
29. Benoit J., Marchais H, Rolland H, Velde VV. Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology. In: Benita S. Microencapsulation: methods and industrial applications. New York: Marcel Dekker Inc; 1996. 3.
30. Lima, K. M.; Silva, C.L.; Júnior, J.M.R. *Biotechnologia Ciências e Desenvolvimento.* **2000**, 12, 10-13.
31. Alexiou, C., Arnold, W., Kein, R. J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S., Lubbe, A.S., *Cancer Res.*, **2000**, 60, 6641.

32. Aliabadi, H. A., Lavasanifar, A., *Expert Opin. Drug. Deliv.*, **2006**, 3, 139.
33. Novak, B. M.; *Adv Mater.* **1993**, 5, 422.
34. Zhang, Q., Han, Y., Wang, W., Zhang, L., Chang, J., *Eur. Polym. J.* **2009**, 45, 550-556.
35. Zhou, Q., Gu, P., Zhang, Y., Li, N., Xu, Q., Zhang, Y., Lu, J., *Chin. J. Chem.* **2014**, 32, 573-578.
36. Kellar, K.L.; Iannone, M.A. *Exp Hematol.* **2002**, 30, 1227-37.
37. Martel, R.R., Rounseville, M. P., Botros, I. W, Seligmann, B. E., Array Formats, In: *Microarray Technology and Its Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2005**, 3-22.
38. QIAGEN, LiquidChip® Application Handbook, Luminex Corp., February, **2006**.
39. Campo, L. F. **Síntese de materiais fotossensíveis baseados em corantes fluorescentes como meio ativo para dispositivos ópticos.** **2003**. 178f. Tese (Doutorado em Química), UFRGS, Porto Alegre.
40. Gebauer, R.; De Angelis, F. *New Journal of Physics.* **2011**, 13, 1-11.
41. Xu, Y., Li, Z., Malkovskiy, A., Sun, S., Pang, Y., *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114, 8574.
42. Costela et al, *Appl. Phys. Lett.* **1996**, 68, 593-595
43. Hu, R., Leung, J.W.Y., Tang, B.Z. *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43, 4494.
44. Liu, J., Lam, J.W.Y., Tang, B.Z. *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 5799.
45. Lopalco, M.; Koini, E.N.; Cho, J. K.; Bradley, M. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7,856-859.
46. Boving, M. K., Pedersen, L. N.; Moller, J. K., *J. Clin. Microbiol.* **2009**, 47, 908-913.
47. Ferrer, M.L., Acuña, A.U., Amat-Guerri, F., Costela, A., Figuera, J. M., Florido, F., Sastre, R., *Appl. Opt.* **1994**, 33, 2266.
48. Sun, Y., Wang, B., Wang, H., Jiang, J., *J. Colloid. Interface Sci.* **2007**, 308, 332-336.
49. Gebauer, R., De Angelis, F. *New J. Phys.*, **2011**, 13, 1.
50. Icart, L.P., Fernandes, E., Agüero, L., Ramón, J., Zaldivar, D., Dias, M.L., **2016**, *J. Appl. Polym. Sci.*, 42994, 1-9.

51. Tipler, P., A., **Eletricidade e Magnetismo**, 2013, Ótica, 4ª ed.,
52. Elemans, J.A.A.W, Nanosized architectures from glycoluril building blocks, **2001**, 233f.
(dissertação), Universidade de Radboud Nijmegen, Holanda.
53. O'Donnell, P.B., McGinity, J.M., *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1997**, 28, 25.
54. Melo, E. M., Estabilidade de Emulsões de Petróleo em Sistemas Pressurizados.
Dissertação de Mestrado, NDTR/UNIT, Aracaju, SE, Brasil, **2008**, 7-15.
55. Schramm, Laurier L. Emulsions: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry, ACS Books Advisory Board – American Chemical Society, Washington, DC, **1992**.
56. Ozturk, K., Caban, S.; Kozlu, S., Kadayifci, E., Yerlikaya, F. & Capan, Y. *Pharmazie*, **2010**, 65, 665.
57. Holzapfel, V., Musyanoych, A., Landfester, K., Lorenz, M. R., Mailänder, V., *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, 206, 2440-9.
58. Wang, J.; Liu, W.; Tu, Q.; Song, N.; Zhang, Y. & Nie, N., *Biomacromolecules*, **2010**, 10, 228.
59. Shen, Z Y., Ma, G. H.; Dobashi, T.; Maki, Y. & Su, Z. G. *Int. J. Pharm.*, **2008**, 346, 133.
60. Okaya, T., Suzuki, A., Kikuchi, K., *Coll. And Surf. A: Physicochem and Eng.* **1999**, 153, 123.
61. Liu, J. H.; Chung, Y. C.; Li, M. T., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1995**, 55, 1441.
62. Batyrbekov, E. O.; Iskakov, R. & Zhubanov, B. A., *Makromol. Symp.*, **1998**, 127, 251.
63. Poletto, F. S. ; Silveira, R. P. ; Fiel, L. A. ; Donida, B. ; Rizzi, M. ; Guterres, S.; Pohlmann, A. R., *Nanosci. Nanotechnol*, **2009**, 9, 9.
64. Landfester, K. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, 22, 896.
65. Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. L. Pohlmann, A. R.. *Quim. Nova*, **2003**, v. 26, 5726.
66. Ausborn, M.; Schreier, H.; Brezesinski, G.; Fabian, H.; Meyer, H. W.; Nuhn, P.; *J. Controlled Release* **1994**, 30, 105.
67. Molpeceres, J.; Aberturas, M. R.; Chacon, M.; Berges, L.; Guzman, M.; *J. Microencapsulation* **1997**, 14, 777.

68. Saez, M.; Guzman, M.; Molpeceres, J.; Aberturas, M. R.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 379.
69. Quintanar-Guerrero, D.; Allemann, E.; Fessi, H. & Doelker, E. *Int. J. Pharm.* **1999**, *188*, 155-164.
70. Desgouilles, S.; Vauthier, C.; Bazile, D.; Vacus, J.; Grossiord, L.; Veillard, M.; Couvreur, P., *Langmuir*, **2003**, *19*, 9504.
71. Allemann, E., Gurny, R., Doelker, E.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, *39*, 173-91.
72. Song, K., Choung, I., Cho, K., Ahn, Y., Choi, E., *Colloids Surf A Physicochem. Eng Asp.* **2006**, *276*, 162-167.
73. Lemoine, D., Preat, V., *J Control Release*, **1998**, *54*, 15-27.
74. Zambaux, M.F., Bonneaux F., Gref R., Maincent P., Dellacherie E., Alonso M.J., Labrude P., Vigneron C., *J Control Release*, **1998**, *50*,31–40.
75. Musyanovych, A., Schmitz-Wienke J., Mailander, V., Walther, P., Landfester, K., *Macromol. Biosci*, **2008**, *8*, 127–39.
76. Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., Pr at, V., *J. Control. Release*, **2012**, *161*,505.
77. Antonietti, M., Landfester, K., *Prog. Polym. Sci.*,**2002**, *27*, 689.
78. Odian, G., *Principles of Polymerization*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, **2004**, New Jersey.
79. Landfester, K., Willert, M., Antonietti, M., *Macromol.*, **2000**, *33*, 2370.
80. Herk, A. M.; "Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation", Blackwell Publishing, **2008**, 1-324.
81. Chern, C. S., *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 443.
82. Sharma, D. K., Soane, D. S., *Macromol.*, **1988**, *21*, 700.

83. Ito, F., Ma, Guanghui, Nagai, Masatoshi, Omi, Shinzo, *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp.*, **2001**, 201, 131.
84. Sun, Y., Wnag, B., Wang, H., Jiang, J., *J. Collid. Interface Sci*, **2007**, 308,332.
85. Urban, M., Musyanovych, A., Landfester, K., **2009**, *Macromol. Chem. Phys*, 201, 961.
86. Xu, Z. S.; Deng, Z. W.; Hu, X. X.; Li, L.; Yi, C. F. *J. Polym Sci Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 2368.
87. Maeda, M.; Kuroda, C. S.; Shimura, T.; Tada, M., Abea, M., *J. Appl. Phys.*, **2006**, 99, 8H103.
88. Araújo, P. H. H., Pinto, J. C., *Braz. J. Chem. Eng.*, **2000**, 17, 383.
89. Pollert, E., Knizek, K., Maryskom M., Zaveta, K., Lancok, A., Bohacek, J., Horak, D., Babic, M.J., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2006**, 306, 241.
90. Asua, L.M., *J. Polym. Sci. Part A Polym Chem.*, **2004**, 42, 1025.
91. Ramirez, L.P., Landfester, K., *Macromol. Chem. Phys.*, **2003**, 202, 22.
92. Crespy, D., Staff, R. H., Becker, T., Landfester, K., *Macromol. Chem. Phys.*, **2012**, 213, 1183.
93. Landfester, K.; Bechthold, N.; Tiarks, F., Antonietti, M., *Macromol.*, **1999**, 32, 5222.
94. Antonietti, M., Landfester, K., *Prog. Polym. Sci.* **2002**, 27, 689.
95. Oliveira, M.A.M., Nele, M., Pinto, J. C., *Polímeros*, **2013**, 23, 6, 784.
96. Schork, F. J.; Luo, Y. W.; Smulders, W.; Russum, J. P.; Butté, A. & Fontenot, K., *Adv. Polym. Sci.*, **2005**, 175, 129.
97. Tiarks, F.; Landfester, K.; Antonietti, M.; *Langmuir*, **2001**, 17, 908.
98. Holzapfel, V., Lorenz, M., Weiss, C.K., Schrezenmeier, H. Landfester, K., Mailänder, V., *J. Phys.: Condens. Matter.*, **2006**, 18, 2581.
99. Ugelstad, Berge, A.; Schmid, R.; Holm, L.; Nustad, K.; *J Polym Sci*, **2003**, 72, 225.
100. Asua, J.M., *Polym. Sci.* **2002**, 27, 1283-1346.
101. Cardoso, P. B., Araújo, P. H. H., Sayer, C., *Macromol. Symp* **2013**, 324, 114.
102. Fontenot, K., Schork, F. J., *APPL., J. Polym. Sci.*, **1993**, 49, 633.
103. Landfester, K., Schork, F.J., Kusuma, V. A., **2003**, 6, 1337.

104. Bechthold, N., Landfester, K., *Macromol.*, **2000**, 33, 13, 4682
105. Harkins, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 1428.
106. Ziegler, A., Landfester, K., Musyanovych, A. *Colloid Polym. Sci.* **2009**, 287, 1261.
107. Xu, Z. S.; Deng, Z. W.; Hu, X. X.; Li, L.; Yi, C. F. *J. Polym Sci Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 2368.
108. Ou, J. L.; Lim, M. S.; Chen, H.; *J Appl Polym Sci*, **2003**, 87, 2230.
109. Hoffmann, M.; Landfester, K.; Antonietti, M.; *Magnetohydrodynamics*. **2001**, 37, 217.
110. Bahar, T., Celebi, S.S., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1999**, 72, 69.
111. O Liu, P., Zhong, W., Shi, H., Xue, D., *J. Exp. Nanosci.*, **2009**, 4, 323.
112. Braun, D.; Cherdron, H.; Rehahn, M.; Ritter, H.; Voit, B. *Polymer Synthesis: Theory and Practice: Fundamentals, Methods, Experiments*; 4^a ed.; Springer; **2005**.
113. Kato, M.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M.; Higashimura, T. *Macromolecules* **1995**, 28, 1721.
114. Xia, J.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules*, **1999**, 32, 5199.
115. Pintauer, T.; Matyjaszewski, K. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1087.
116. Dirany, M., Vayer, M., Sinturel, C., Erre, R., Lacroix-Desmazes. O., Boutevin, B., *Polymer Preprints*, **2008**, 49(2), 302.
117. Gromada, J., Matyjaszewski, K., *Macromolecules*, **2001**, 34, 7664.
118. Zhang, X., Xia, J., Matyjaszewski, K., *Macromolecules*, **1998**, 31, 5167.
119. Beil, J. B., Zimmerman, S. C., *Macromolecules*, **2004**, 37, 778.
120. Kim, G. J.; Lee, K.; Kwon, H.; Kim, H. J. *Org. Lett.* **2011**, 13, 2799.
121. Danko, M., Andics, A., Kosa, C., Herdolvic, P., Vegh, D., *Dyes Pigments*, **2012**, 92, 1257.
122. Gupta, A. K.; Gupta, M.; *Biomaterials*, **2005**, 26, 3995.
123. Zhang, W.; Jia, S.; Wu, Q.; Ran, J.; Liu, Y.; Hou, J.; *Mater. Sci. Eng C*, **2012**, 32, 381.

124. Tarjat, P.; Morales, M. P.; Verdaguer, S. V.; Carreño, T. G.; Serna, C. J.; *J. phys. D: Appl. Phys.*, **2003**, 36, 182.
125. Borisov, S. M. et al. Fluorescence of Supermolecules, polymers and nanosystems. [S.l.]: Springerlink, v. 4, 2008. Cap. Part D, p. 431-463.
126. Maity, D.; Kale, S. N.; Ghanekar, R. K.; Xue, J. M.; Ding, J.; *J. Mag. Mag. Mater.*, **2009**, 321, 3093.
127. Somiya, S.; Roy, R.; *Mater. Sci.* **2000**, 23 (6): 453.
128. Gnanaprakash, G.; Philip, J.; Jayakumar, T.; Raj, B., *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 7978.
129. Lin, M. M.; Kim, D. K.; Haj, A. J. E.; Dobson, J.; *Nanobiosci.*, **2008**, 7, 298.
130. Kim, D. K.; Mikhaylova, M.; Zhang, Y.; Muhammed, M.; *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 1617.
131. Maity, D. A.; Agrawal, D. C.; *J. Magn. Magn. Mater.*, **2007**, 308, 46.
132. Zhao, D., Wu, X., Guan, H., Han, E., *J. Supercrit. Fluids*, **2007**, 42, 226.
133. Desai, R.; Mankad, V.; Gupta, S.; Jha, P.; *Nanos. Nanotec. Lett.*, **2012**, 4, 30.
134. Tadmor, R., Rosensweig, R. E., Frey, J., Klein, J., *Langmuir*, **2000**, 16, 9117.
135. Chin, S. F.; Pang, S. C.; Tan, C. H.; *J. Mater. Environ. Sci.*, **2011**, 2 (3): 299.
136. Panta, P.C., **Obtenção de Nanopartículas de óxido de ferro por coprecipitação, sua estabilização com surfactantes e caracterização quanto à morfologia, cristalinidade e comportamento magnético**, Tese, **2013**, UFRGS.
137. Chastellain, M., Petri, A., Hofmann, H.J., *J. Coll. Inter. Sci.*, **2004**, 278(2), 353.
138. Cheng, J.Z.C. Tese: Superparamagnetic Iron (III) Oxide Nanoparticle Polymer (SPIONP): Fabrication and Properties, University of York.
139. Yang, K.K., Wang, X.L., Wang, Y.Z., *J. Ind. Eng. Chem.*, **2007**, 13, 485.
140. Faraji, M., Yamini, Y., Rezaee, M., *J. Iranian Chem. Soc.* **2010**, 7(1), 1.
141. Castanharo, J. A., Mello, I., L., Maria, L. C., Costa, M. A., **2011**, *Polímeros*.
142. Tadmor, R., Rosensweig, E., Frey, J., Klein, J., *Langmuir*, **2000**, 16, 9117.

143. Charoenmark, L., Polpanich, D., Thiramanas, R., Tangboriboonrat, P., *Macromol. Res.*, **2012**, 20(6), 590.
144. Yavuz, C.T., Prakash, A., Mayo, J.T., Colvin, V.L., *Chem. Eng. Sci.*, **2009**, 64(10), 2510
145. Joumaa, N., Toussay, P., Lansalot, M., Elaissari, A., *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **2008**, 46, 327.
146. Liu, Z., Liu, C., Yao, K., Liu, P., Ning, Q., **2007**, *J. Appl. Pol. Sci.*, 105, 1331.
147. Cui, L.L., Gu, H. C., Xu, H., Shi, D. L., *Matter Lett.*, **2006**, 60, 2929.
148. Xu, H., Cheng, L., Wang, Y., Zeng, J., Wang, C., Ma, X., Li, Y., *Biomaterials*, **2011**, 32, 9364.
149. Liu, X., Chen, Q., Yang, G., Zhang, L., Liu, Z., Liu, Z. C., Zhu, X., *J. Matter. Chem. B.*, **2015**, 3, 2786.
150. Dedavid, B. A., Gomes, C. I., Machado, G., *Microscopia Eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras*. **2007**, CEMM, ediPUCRS.
151. Rasband, W., Image J. Disponível em: www.rsb.info.nih.gov (acesso em 05/010/2015).
152. Daou, J., Pourroy, G., Bégin-Colin, S., Grenèche, J.M., Ulhaq-Bouillet, C., Legaré, P., Bernhardt, P., Leuvre, C., Rogez, G., *Chem. Mater.*, **2006**, 18, 4399.
153. Guerrero-Martinez, A., Perez-Juste, J., Liz-Marzan, L.M., *Adv. Mater.*, **2010**, 11, 1182.
154. Oya, K., Tsuru, T., Teramoto, Y., Nishio, Y., *Polym. J.*, **2012**, 45, 824.
155. Cheng, W., Tang, K., Qi, Y., Shenga, J., Liua, Z., *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 1799.
156. He, J.C., Huang, M.Y., Wang, D.M., Zhang, Z.M., Li, G. K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, 101, 84.
157. Yan, F., Li, J., Zhang, J.J., Liu, F.Q., Yang, W.S., *Nanopart. Res.*, **2009**, 11, 289.
158. Cao, H., Wang, G., Warner, J.H., Watt, A.A.R., *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, 92, 013110.

ANEXO I

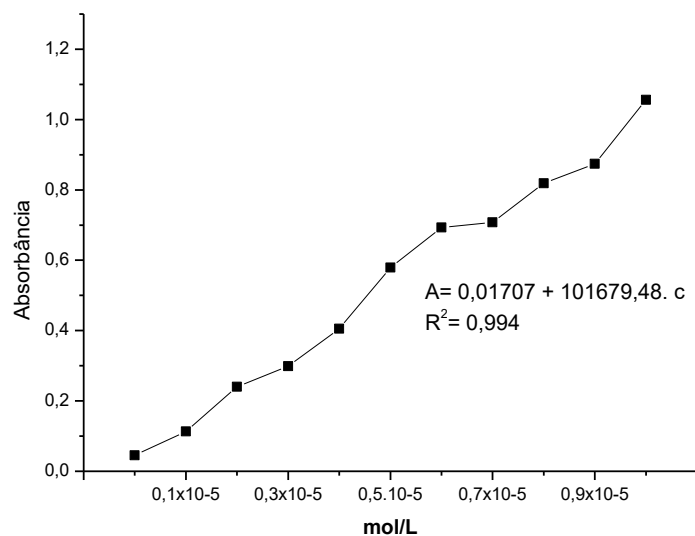


Figura 1: Curva de calibração para do fluoróforo **1** (Cianina).

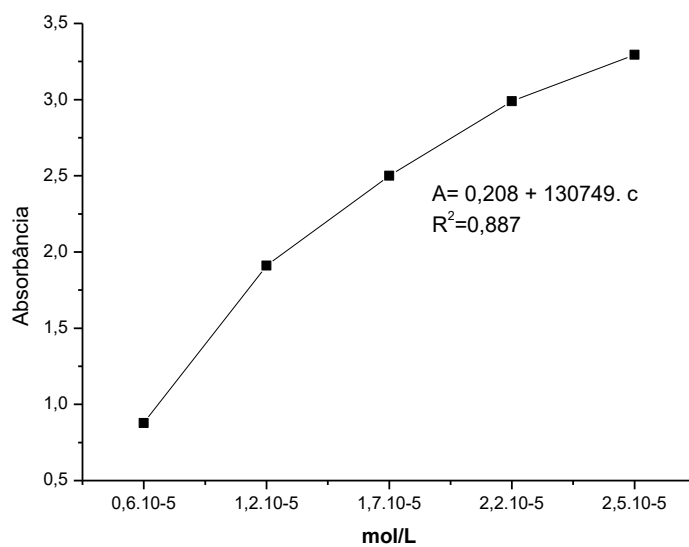


Figura 2: Curva de calibração para o fluoróforo **2** (Esquaraína).

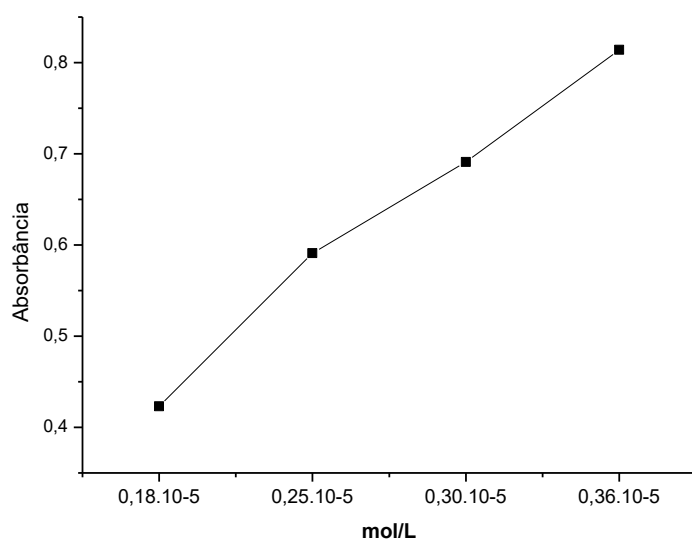


Figura 3: Curva de calibração para o fluoróforo **3** (Esquaraína).

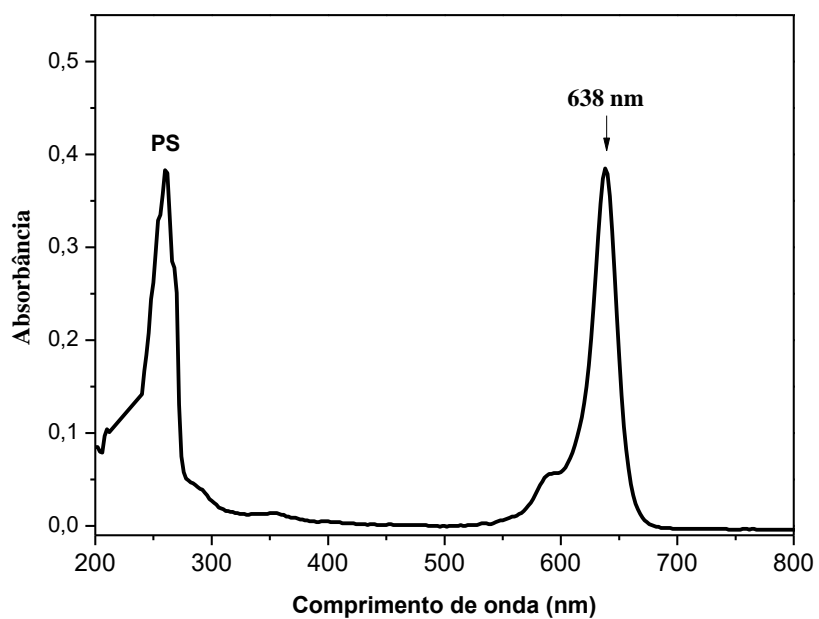


Figura 4: Espectros de absorção na região do UV-Vis em CHCl₃ do fluoróforo **3**.