

## Obtenção de microesferas de poliestireno fluorescentes

Matheus Fialho Zawacki\*\*, Paula Poli Soares e Cesar Liberato Petzhold\*

Instituto de Química, UFRGS – Av. Bento Gonçalves, 9500. Bairro Agronomia. Porto Alegre - RS - Brasil CEP 91501-970

\*petzhold@iq.ufrgs.br, \*\*fialho.mfz@gmail.com

### Introdução

O uso de microesferas poliméricas contendo fluoróforos em ensaios de imunodiagnóstico vem ganhando popularidade nos últimos anos. Nestes sistemas, microesferas de poliestireno com uma superfície funcionalizada atuam como suporte sólido para a captura de diferentes moléculas-alvo sejam elas anticorpos, antígenos, peptídeos ou ácidos nucleicos. 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 doenças.

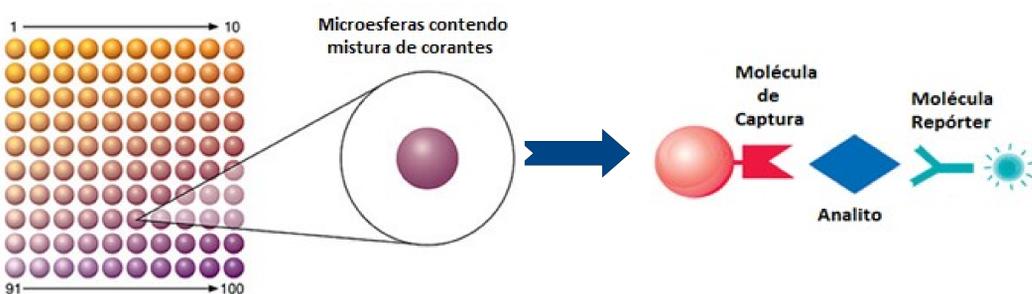


Figura 1. Microesferas contendo misturas de corantes com suas superfícies funcionalizadas.

Os fluoróforos podem ser incorporados às microesferas poliméricas por simples mistura (adsorção física) através dos processos de polimerização em miniemulsão e emulsificação/evaporação do solvente, ou adicionados covalentemente à estrutura polimérica via polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP). Usando a técnica de ATRP é possível inserir o fluoróforo numa posição definida na cadeia do polímero, promovendo uma fluorescência mais intensa com a incorporação da molécula à matriz do polímero. Foram utilizados corantes e iniciadores fluorescentes das classes esquirina e cianina (Figura 2).

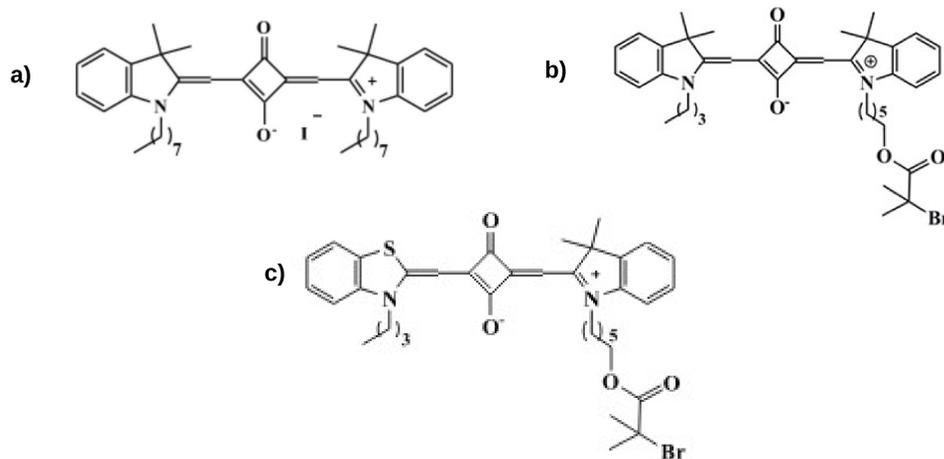


Figura 2. a) Corante fluorescente esquirina. b) Iniciador fluorescente esquirina. c) Iniciador fluorescente esquirina.

### Materiais e métodos

Para a obtenção de microesferas a partir da polimerização em miniemulsão foi preparada uma fase orgânica contendo o estireno como monômero, o iniciador 2'2'-azobis(isobutironitrila) (AIBN), hexadecano como coestabilizador e o fluoróforo (classe das esquirinas) e uma fase aquosa contendo água MilliQ com o surfactante lauril sulfato de sódio (SDS).

As microesferas também foram preparadas utilizando o método de emulsificação/evaporação de solvente. Preparou-se um sistema de fase orgânica contendo poliestireno comercial solubilizado em clorofórmio e uma fase aquosa contendo poli(álcool vinílico) (PVA). As duas soluções foram misturadas em um homogeneizador de alta velocidade Turrax (Ultra Turrax® T25) e, então, essa emulsão foi gotejada em água sob agitação mecânica. As microesferas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Visando uma maior incorporação do fluoróforo na matriz do polímero foi realizada uma polimerização ATRP empregando iniciadores contendo o fluoróforo como substituinte (cianinas modificadas quimicamente). Foi empregado o sistema catalítico CuBr:PMDETA na proporção 1:1/ 10:20 em relação ao iniciador cianina. O sistema foi purgado com argônio e foram testadas polimerizações com e sem solvente (anisol) na temperatura de 90°C. A fluorescência do polímero foi determinada por espectroscopia de UV-Vis.

### Resultados e discussões

A polimerização por miniemulsão foi realizada durante 13 horas à temperatura de 70°C. Após duas horas de reação, observou-se a perda de coloração da reação, possivelmente devido à degradação do fluoróforo na presença de AIBN. Devido a esta instabilidade, optou-se pelo método de emulsificação/evaporação de solvente.

No processo de emulsificação/evaporação do solvente, a emulsão foi gotejada com a ponteira imersa e emersa à água e com diferentes taxas de adição, para verificar a influência nos diâmetros das esferas em cada caso. Foram obtidas microesferas poliméricas fluorescentes com tamanho médio entre 7 a 9,6 µm e uma distribuição mais homogênea de diâmetro foi obtida quando a emulsão foi adicionada com a ponteira emersa à água. A partir das imagens obtidas por MEV, calculou-se o diâmetro médio com o auxílio do software ImageJ (Figura 3).

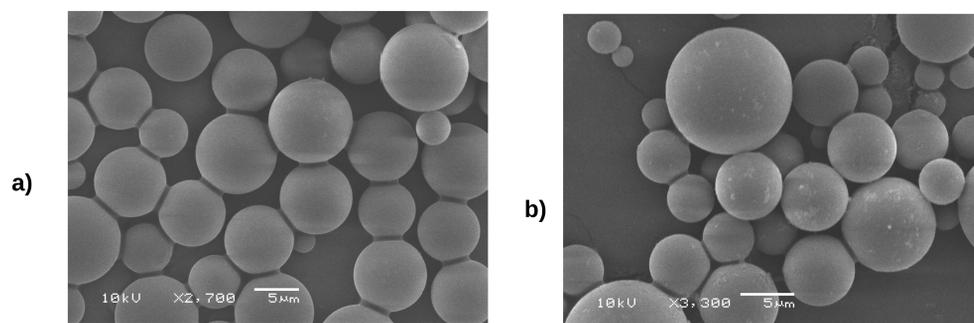


Figura 3. Microesferas de poliestireno. a) Gotejamento com a ponteira emersa. b) Gotejamento com a ponteira imersa.

Foram feitas reações de polimerização ATRP utilizando o iniciador fluorescente esquirina (c) entretanto, não houve formação de polímero. Utilizando o iniciador fluorescente da classe das cianinas, obtiveram-se os dados da Tabela 1.

Tabela 1: Reações com iniciador fluorescente esquirina (b).

Reação	CuBr/PMDETA	Anisol (mL)	Tempo (h)	Conv.(a), (%)	PDI(b)	Mn(b) (g/mol)	Mn teórico(c) (g/mol)
1	1:1	-	48	12	1,5	27000	12000
2	1:1	-	22	9	1,7	25550	9000
3	1:1	5	96	7	2,2	22000	7300
4	10:20	5	48	20	1,5	63700	20000

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

Nas reações sem a presença de solvente (reações 1 e 2), observou-se baixo rendimento. Não houve controle da polimerização ATRP, já que o valor de massa molar (Mn) foi maior que o valor teórico e apresentou dispersidade superior a 1,5. Na presença do anisol (reações 3 e 4) e com diferente proporção de CuBr/PMDETA (reação 4) também não se alcançou o controle da polimerização, apresentando massa molar superior ao valor teórico e dispersidade de 2,2 e 1,5, respectivamente.

### Conclusões e perspectivas

O fluoróforo esquirina apresentou instabilidade frente a radicais livres (polimerização em miniemulsão e ATRP) porém pelo método de emulsificação/evaporação de solvente foi possível a obtenção de microesferas de formato regular, fluorescentes e maior homogeneidade do diâmetro com adição da solução emulsificada com a ponteira emersa à água. Na reação ATRP, ocorre formação de polímero quando utilizado o iniciador fluorescente cianina, porém não há controle da polimerização. Na próxima etapa da pesquisa serão estudadas novas moléculas para uso como iniciadores fluorescentes, fazendo testes por reações ATRP-AGET.

### Referências bibliográficas

- LUMINEX CORP. Applications. Austin. Disponível em: <http://www.luminexcorp.com/Applications> Acesso em: 24 Março 2016.
- QIAGEN, LiquidChip® Application Handbook, Luminex Corp., February, 2006.
- Detrembleur, C.; Debuigne, A.; Altintas, O.; Conradi, M.; Wong, E. H. H.; Jérôme, C.; Barner-Kowollik, C.; Junkers, T. *Polym. Chem.* 2012, 3, 135.

### Agradecimentos