

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

MATHEUS FIALHO ZAWACKI

**OBTENÇÃO DE MICROESFERAS DE POLIESTIRENO FLUORESCENTES  
VISANDO À APLICAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICOS**

Porto Alegre, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

MATHEUS FIALHO ZAWACKI

**OBTENÇÃO DE MICROESFERAS DE POLIESTIRENO FLUORESCENTES  
VISANDO À APLICAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICOS**

Monografia apresentada junto à atividade de ensino “Projeto tecnológico” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção de grau em Química Industrial.

Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold

Orientador

Porto Alegre, 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador Cesar por todos os ensinamentos, desde as brilhantes aulas de polímeros até a iniciação científica. Obrigado pela atenção e as conversas motivadoras.

Aos meus amigos da química que tornaram essa caminhada muito mais leve e feliz, em especial à Paula, Bruna, Gabriela, Duda, Douglas e Geórgia.

Ao Jônatas Berbigier, grande rei da síntese orgânica. Obrigado pelas trocas de conhecimento, amizade e por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

A todos meus colegas do laboratório K215, aprendi muito com todos vocês.

Aos meus amigos da comunidade Kawaii, Mariana, Gabriel e Marcel. Obrigado por estarem sempre comigo me alegrando e me motivando.

Ao meu grande amigo Tiago Lucas. Obrigado pelas conversas e reflexões que sempre me fazem crescer.

À minha amiga de longa data Nati Fagundes. Obrigado por estar ao meu lado esse tempo todo e, incansavelmente, me escutando e dando conselhos.

Por fim, agradeço aos meus pais por todo apoio e amor incondicional. Obrigado por me proporcionarem a vida que tenho.

## RESUMO

O presente trabalho visa a síntese de poliestireno via polimerização radicalar por transferência de átomo - ATRP utilizando diferentes iniciadores fluorescentes do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol, classe de fluoróforos capazes de realizar o processo de transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (ESIPT). Os polímeros obtidos foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ), Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC), Espectroscopia Molecular no UV-Vis e Espectroscopia de Fluorescência. As conversões das reações de polimerização ficaram na faixa de 71-78% e as dispersidades entre 1,8 e 2,1. Observou-se um aumento da fluorescência do fluoróforo quando inserido na matriz polimérica a partir da comparação entre o rendimento quântico dos polímeros e dos iniciadores puros em solução. Os polímeros sintetizados via ATRP foram misturados com poliestireno comercial e, pelo método de emulsificação/evaporação do solvente, obteve-se microesferas poliméricas fluorescentes. As medidas de tamanho das esferas foram feitas com auxílio do software *ImageJ* a partir das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Obteve-se microesferas com diâmetros médios entre 1,55 e 1,99  $\mu\text{m}$ , e mesmo após o processo foi possível observar a emissão de fluorescência.

**Palavras-chave:** Fluorescência, ATRP, polímero, imunodiagnósticos

## ABSTRACT

The current work reported the synthesis of polystyrene via atom transfer radical polymerization - ATRP using different fluorescent initiators from 2-(2'-hydroxyphenyl) benzazole type, class of fluorophores capable of performing intramolecular proton transfer process in the excited electronic state (ESIPT). The polymers obtained were characterized by Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen ( $^1\text{H}$  NMR), Size Exclusion Chromatography (SEC), UV-Vis Molecular Spectroscopy and Fluorescence Spectroscopy. The conversions of the polymerization were in the range of 71-78% and the dispersity between 1.8 and 2.1. An increase in fluorescence of the fluorophore in the polymer matrix was observed by comparing the quantum yield of the polymers and the initiators in solution. The polymers synthesized via ATRP were blended with commercial polystyrene to obtain polymeric microspheres by solvent emulsification/evaporation method. The sphere sizes were determined using the *ImageJ* software from Scanning Electron Microscopy (SEM) images. Microspheres with average diameters between 1.55 and 1.99  $\mu\text{m}$  were obtained, and even after the process it was possible to observe the emission of fluorescence.

**Keywords: Fluorescence, ATRP, polymer, immunoassay**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ESTADO DA ARTE.....	2
2.1. Polímeros fluorescentes .....	2
2.2. Polimerização Radicalar por Transferência de Átomo (ATRP).....	2
2.3. Obtenção de microesferas poliméricas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente.....	4
2.4. Microesferas poliméricas fluorescentes na metodologia de microarranjos líquidos.....	5
2.5. Processos fotofísicos.....	6
2.5.1. Fluorescência.....	6
2.5.2. Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado (ESIPT) .....	7
2.5.3. Corantes do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol .....	8
3. SITUAÇÃO ATUAL.....	10
4. OBJETIVOS.....	12
4.1. Objetivo geral .....	12
4.2. Objetivos específicos.....	12
5. METODOLOGIA .....	13
5.1. Materiais.....	13
5.2. Reações de polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP) .....	14
5.3. Obtenção de microesferas poliméricas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente.....	14
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	15
6.1. Síntese de poliestireno fluorescente via ATRP.....	15
6.2. Fotofísica dos polímeros obtidos via ATRP .....	17
6.3. Emulsificação/evaporação do solvente .....	22
7. ANÁLISE DE CUSTO .....	24
7.1. Obtenção de poliestireno fluorescente via ATRP .....	24
7.2. Obtenção de microesferas fluorescentes pelo método de emulsificação/evaporação do solvente.....	25
8. CONCLUSÕES.....	26
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura genérica de um iniciador de ATRP. ....	3
Figura 2. Microesferas coradas com diferentes concentrações de corante. ....	5
Figura 3. (A) Representação das ligações de moléculas biológicas nas microesferas poliméricas fluorescentes. (B) Processo de análise das microesferas realizado pelo aparelho Luminex. ....	6
Figura 4. Diagrama de Jablonski. ....	7
Figura 5. Processo ESIPT. ....	8
Figura 6. Estrutura de um corante benzazólico. ....	9
Figura 7. Equilíbrio ceto-enólico de um corante do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol, sendo X = O, S ou NH. ....	9
Figura 8. Número de patentes publicadas nos últimos trinta anos utilizando como palavras-chave "Fluorescent polymer*". ....	10
Figura 9. Número de patentes publicadas nos últimos trinta anos utilizando como palavras-chave "Fluorescent polymer*" e "Immunoassay*" como filtro. ....	11
Figura 10. Estrutura dos iniciadores fluorescentes. ....	13
Figura 11. Procedimento para a obtenção de microesferas poliméricas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente. ....	15
Figura 12. Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do polímero fluorescente obtido a partir do iniciador 1 ....	17
Figura 13. Espectro de absorção na região do UV-Vis e emissão do polímero PS1 em THF. ....	19
Figura 14. Espectro de absorção na região do UV-Vis e emissão do polímero PS2 em THF. ....	19
Figura 15. Espectro de absorção na região do UV-Vis e emissão do polímero PS3 em THF. ....	20
Figura 16. Espectro de absorção na região do UV-Vis e emissão do polímero PS4 em THF. ....	20
Figura 17. Fluorescência dos (a) iniciadores de polimerização no estado sólido e (b) poliestirenos obtidos a partir dos iniciadores. ....	21
Figura 18. (a) Imagens de MEV das microesferas obtidas a partir da mistura do PS1 com poliestireno comercial. (b) Histogramas obtidos a partir das imagens de MEV. ....	22
Figura 19. Espectro emissão das microesferas fluorescentes no estado sólido. ....	23

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Equilíbrio da ATRP.....	4
Esquema 2. Reação ATRP do estireno empregando diferentes iniciadores fluorescentes.....	16



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Reações com iniciadores fluorescentes. ....	16
Tabela 2. Valores dos parâmetros obtidos a partir dos espectros de absorção e emissão dos iniciadores em THF. ....	18
Tabela 3. Valores dos parâmetros obtidos a partir dos espectros de absorção e emissão dos polímeros em THF.....	21
Tabela 4. Informações sobre os reagentes e solvente utilizados na síntese do poliestireno fluorescente.....	24
Tabela 5. Quantidades utilizadas por reação de reagentes/solvente e seus respectivos valores.....	25
Tabela 6. Informações sobre os reagentes e solvente utilizados na obtenção de microesferas fluorescentes de poliestireno. ....	25
Tabela 7. Quantidades utilizadas por reação de reagentes/solvente e seus respectivos valores.....	26

## 1. INTRODUÇÃO

Os testes diagnósticos movimentam mundialmente cerca de 25 bilhões de dólares por ano, sendo um setor de biotecnologia altamente dinâmico. No Brasil, ainda não existe uma tradição nesse campo industrial, havendo uma dependência comercial em relação à importação desses produtos. De acordo com o BNDES, o Brasil gasta em torno de 200 milhões de dólares ao ano com insumos de imunodiagnósticos. O trabalho se insere no âmbito do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Diagnóstico em Saúde Pública (INCT-INDI), que tem como objetivo implementar novas tecnologias para o diagnóstico de doenças ditas negligenciadas e relevantes para a saúde pública no Brasil. Assim, dentro do contexto INCT-INDI, nasceu a proposta de nacionalização de insumos e sistemas de diagnóstico relevantes, reduzindo os custos de importação e a dependência tecnológica brasileira nesse setor e fortalecendo o Sistema Único de Saúde – SUS.

Novas tecnologias têm sido desenvolvidas, como os microarranjos líquidos, em que micropartículas esféricas fluorescentes de tamanho uniforme atuam como suporte sólido para a captura de diferentes moléculas como, por exemplo, anticorpos, peptídeos ou ácidos nucleicos. Esses sistemas permitem a identificação simultânea de múltiplos tipos de antígenos em uma única reação, diminuindo custo e tempo, além de que a quantidade de material biológico (sangue) pode ser reduzida. Dentro desse contexto, microesferas de poliestireno funcionalizadas contendo grupos fluoróforos caracterizam-se como insumo base.

Neste trabalho, foram obtidas microesferas de poliestireno fluorescentes. Os métodos utilizados foram a polimerização radicalar do estireno por transferência de átomo (ATRP), empregando iniciadores que apresentam grupos fluoróforos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol, e a obtenção de microesferas de poliestireno a partir da técnica de emulsificação/evaporação de solvente.

## 2. ESTADO DA ARTE

### 2.1. Polímeros fluorescentes

Durante as últimas décadas houve uma enorme demanda de materiais fluorescentes e a pesquisa sobre polímeros fluorescentes reuniu grande atenção científica devido à sua gama de aplicações, alta estabilidade, fácil manuseio e baixos custos de produção. Destacam-se principalmente as áreas de quimiossensores, máquinas de polímeros inteligentes, termômetros moleculares luminescentes, liberação de fármacos (drug delivery) entre outras. Esses materiais consistem em uma matriz polimérica contendo algum tipo de corante ou estrutura fluorescente.<sup>2,3</sup>

A dopagem de polímeros com fluoróforos pode ser feita por processos tanto físicos quanto químicos. No primeiro caso, ocorre uma dopagem por dispersão em que a molécula fluorescente é confinada na matriz polimérica, podendo ocorrer através da mistura deste fluoróforo com um polímero pré-formado ou pela sua presença durante a reação de polimerização. No segundo caso, o composto fluorescente pode atuar como iniciador de polimerização, utilizando monômeros funcionais fluorescentes ou moléculas fluorescentes como agentes de transferência de cadeia, de modo que, ao final do processo, se encontram ligados covalentemente ao polímero.<sup>2,3</sup>

A intensidade da fluorescência é definida como o produto do coeficiente de extinção e do rendimento quântico, determinando o sinal que pode ser obtido a partir de uma única molécula e, portanto, definindo a sensibilidade de resolução.<sup>4</sup> Sendo assim, quanto aos fenômenos fotofísicos, todas as metodologias resultam em materiais com características semelhantes.<sup>3</sup>

### 2.2. Polimerização Radicalar por Transferência de Átomo (ATRP)

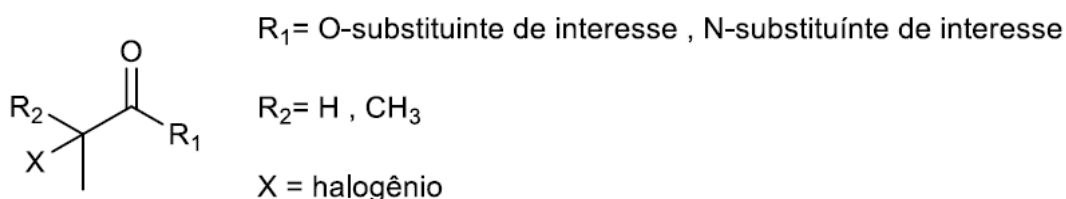
A polimerização radicalar por transferência de átomo foi desenvolvida em 1995, está entre os métodos mais eficazes e mais utilizados de polimerização radicalar controlada. Aplica conceitos de uma polimerização “viva” em que a etapa de terminação é minimizada e o crescimento simultâneo de todas as cadeias pode ser alcançado através de iniciação quase instantânea.<sup>5</sup> Polímeros obtidos a partir

dessa técnica apresentam grande apelo tecnológico pela possibilidade de controle de massa molar, pela estreita dispersidade e por permitir a síntese de materiais fundamentalmente novos com arquiteturas de nanoescala complexas e bem definidas, como copolímeros em bloco.<sup>6</sup>

A reação de polimerização radicalar convencional, de uma forma geral, se dá pela decomposição de um iniciador na presença de um monômero vinílico, que através de uma reação de adição forma a espécie ativa. Em seguida, ocorre a adição sucessiva de unidades de monômeros, numa etapa denominada de propagação.<sup>7</sup> Apesar de suas qualidades e do seu grande uso, existem limitações quanto ao controle da massa molar, à presença de reações de terminação irreversíveis e reações de transferência de cadeia que ocasionam uma larga dispersidade e uma estrutura polimérica não definida. Estas desvantagens são contornadas pela técnica ATRP e outras polimerizações controladas.

Os iniciadores típicos de ATRP são derivados  $\alpha$ -halocarbonila (Figura 1) cujos substituintes R1 e R2 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 da ligação depende de um iniciador de ATRP eficiente. Além disso, a ATRP pode ser realizada em meio polar, apolar ou em sistemas heterogêneos como, por exemplo, em emulsão e suspensão.<sup>8</sup>

**Figura 1.** Estrutura genérica de um iniciador de ATRP.



A ATRP é controlada pelo equilíbrio entre radicais propagantes e espécies dormentes. Seu mecanismo é dado pela utilização de um iniciador derivado de  $\alpha$ -halocarbonila, o qual vai ser ativado por um sistema catalítico composto por um metal de transição (Mt<sup>m</sup>) que está coordenado a um ligante (L), geralmente uma amina terciária polifuncional, para aumentar sua solubilidade no meio orgânico. O complexo de metal de transição é responsável pela cisão homolítica da ligação

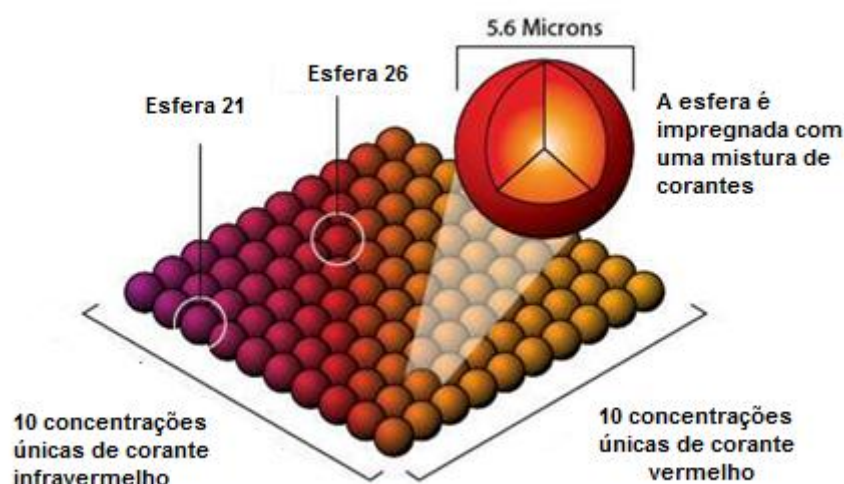


## 2.4. Microesferas poliméricas fluorescentes na metodologia de microarranjos líquidos

A metodologia de microarranjos líquidos utiliza microesferas de poliestireno de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro atuando como suporte sólido para a captura de diferentes moléculas-alvo, sejam elas anticorpos, peptídeos, antígenos ou ácidos nucleicos.<sup>8</sup> Hoje em dia é principalmente conhecida como sistema Luminex® xMAP®, tecnologia desenvolvida pela corporação Luminex, proporcionando a detecção de múltiplos analitos simultaneamente a partir de uma mesma amostra e é utilizada em diversos laboratórios de pesquisa e de diagnósticos.<sup>11</sup>

No ensaio xMAP, cada microesfera é corada com diferentes concentrações de uma mistura de dois ou três corantes fluorescentes, possibilitando a criação de até 200 (sistema Luminex 100/200™) ou 500 códigos de cores (sistema FLEXMAP3D®), em que cada um será responsável pela detecção de um analito em específico (Figura 2).<sup>1</sup>

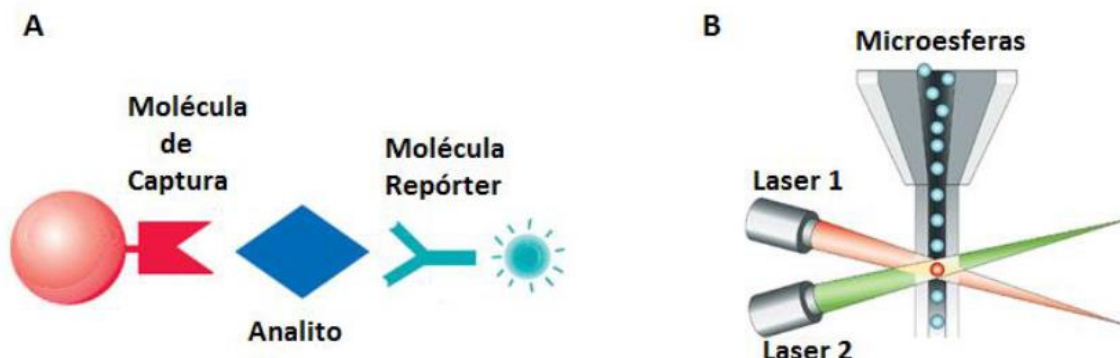
**Figura 2.** Microesferas coradas com diferentes concentrações de corante.<sup>11</sup>



As esferas utilizadas têm normalmente sua superfície modificada com grupos ácido carboxílicos, possibilitando o acoplamento de moléculas responsáveis pela captura das moléculas-alvo após a incubação com o material biológico.<sup>1</sup> Em seguida, é utilizado uma molécula repórter, sendo um anticorpo marcado com um fluoróforo chamado ficoeritrina, que se ligará apenas àquelas microesferas em que houve ligação com o analito de interesse (Figura 3 A).<sup>13</sup> Por fim, as microesferas são

analisadas no aparelho Luminex, através da incidência de dois lasers de comprimento de ondas diferentes. O laser vermelho é responsável pela detecção e identificação das microesferas e o verde é responsável pela quantificação daquelas microesferas que capturaram algum analito de interesse (Figura 3 B).<sup>8</sup>

**Figura 3.** (A) Representação das ligações de moléculas biológicas nas microesferas poliméricas fluorescentes. (B) Processo de análise das microesferas realizado pelo aparelho Luminex.<sup>8</sup>



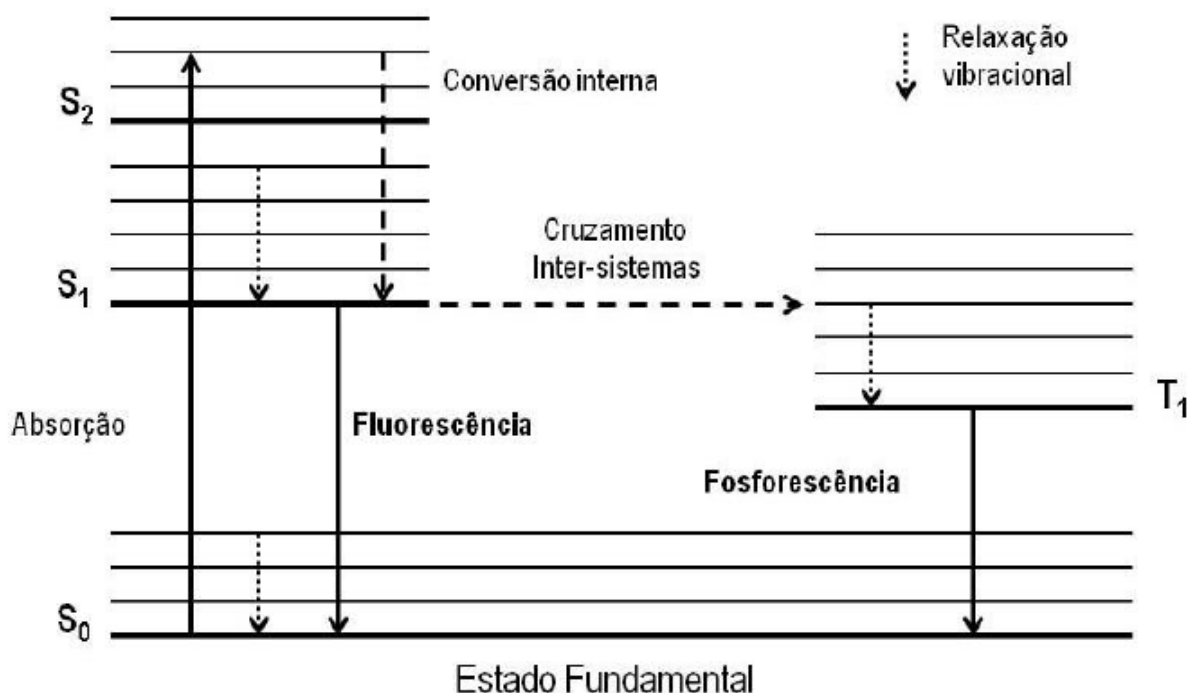
## 2.5. Processos fotofísicos

### 2.5.1. Fluorescência

Os responsáveis pela possibilidade de um composto emitir fluorescência são os grupos fluoróforos, que apresentam estruturas rígidas e são ricos em elétrons  $\pi$ .<sup>3</sup> A maioria das moléculas ocupa o nível mais baixo de vibração do estado eletrônico fundamental à temperatura ambiente e, com a absorção de radiação eletromagnética, é elevada para estados excitados.<sup>14</sup> Essas transições eletrônicas ocorrem entre o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) e o de mais baixa energia desocupado (LUMO).<sup>12</sup>

O diagrama de Perrin - Jablonski (Figura 4) é conveniente para visualizar de forma simples os processos possíveis. Os estados eletrônicos singlete são indicados por  $S_0$  (estado eletrônico fundamental),  $S_1$ ,  $S_2$ , e os estados de tripleto,  $T_1$ ,  $T_2$ . Níveis vibracionais estão associados com cada estado eletrônico. Após a absorção de radiação, os compostos assumem um estado localmente excitado, havendo diferentes caminhos de desativação possíveis.<sup>15</sup>

Figura 4. Diagrama de Jablonski.<sup>3</sup>



A fluorescência trata da emissão de fótons acompanhados de uma relaxação  $S_1 \rightarrow S_0$ . As moléculas que apresentam esse fenômeno são geralmente rígidas, cíclicas, ricas em elétrons e têm sua fluorescência aumentada na presença de grupos doadores e diminuída por grupos retiradores de densidade eletrônica.<sup>15</sup> De acordo com a lei de Stokes, o comprimento de onda da emissão de fluorescência é sempre maior que o da absorção, e essa diferença de energia é chamada de deslocamento Stokes. Os processos de desativação competem entre si, podendo ocorrer também por relaxação vibracional, transferência eletrônica e transferência de energia, os quais não se tratam de transições radiativas. Moléculas não rígidas perdem facilmente toda a sua energia absorvida por transições não radiativas.<sup>3</sup>

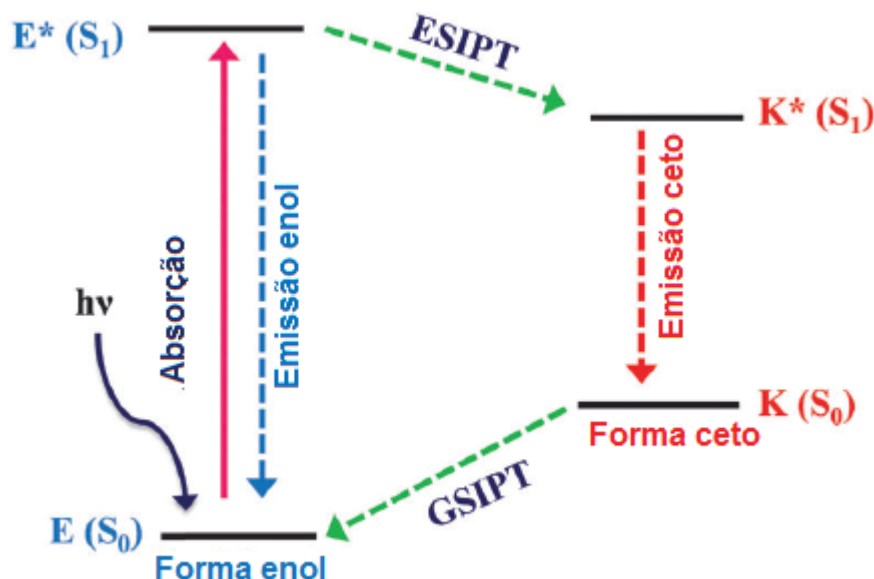
### 2.5.2. Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado (ESIPT)

A transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT) é um processo fotoquímico que produz um tautômero com uma estrutura eletrônica diferente da forma excitada original. É um fenômeno que ocorre em quatro etapas, na qual a forma enol excitada ( $E^*$ ) é convertida na forma ceto excitada ( $K^*$ ) por



apresentar mais estabilidade nessa condição. Por fim, a forma ceto excitada é capaz de realizar uma emissão radiativa, decaindo para a forma ceto (K) no estado fundamental (Figura 5).<sup>16,3</sup>

Figura 5. Processo ESIPT.<sup>16</sup> (Adaptado)



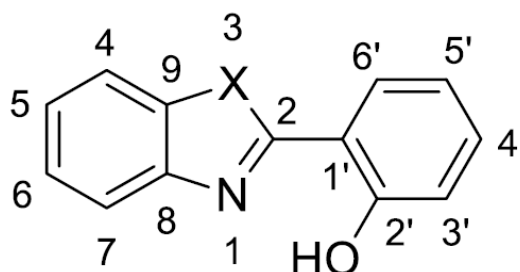
As propriedades de fluoróforos que apresentam ESIPT são um grande deslocamento de Stokes, emissão dupla de fluorescência pela desativação do forma enol ( $E^*$ ) e ceto ( $K^*$ ). É um processo muito rápido e apresenta sensibilidade espectral ao meio que se encontra. Devido a uma redistribuição de densidade eletrônica no estado excitado, observa-se uma modificação na acidez e basicidade desses compostos. O pré-requisito para que se observe este fenômeno é a presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre um grupo doador e um acceptor de próton, onde esses grupos estão espacialmente suficientemente próximos.<sup>16,3</sup>

### 2.5.3. Corantes do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol

Corantes do tipo benzazol são compostos que possuem um anel azólico condensado a um anel benzênico. O anel azólico é composto de cinco membros e tem como característica a presença de dois heteroátomos nas posições 1 e 2, sendo um deles obrigatoriamente o nitrogênio e o outro varia entre enxofre, oxigênio e

nitrogênio, sendo denominados como benzotiazol, benzoxazol e benzimidazol, respectivamente (Figura 6).<sup>3</sup>

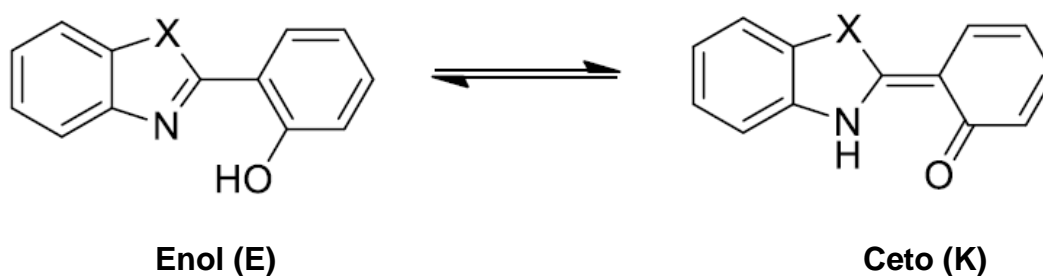
**Figura 6.** Estrutura de um corante benzazólico.



X=O, S ou NH.

As moléculas do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol apresentam uma hidroxila na posição orto ao heterociclo azólico, permitindo a ocorrência de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT) com o nitrogênio. Assim, é possível observar um equilíbrio ceto-enólico quando esses compostos têm seus elétrons excitados (Figura 7).<sup>3</sup>

**Figura 7.** Equilíbrio ceto-enólico de um corante do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol, sendo X = O, S ou NH.

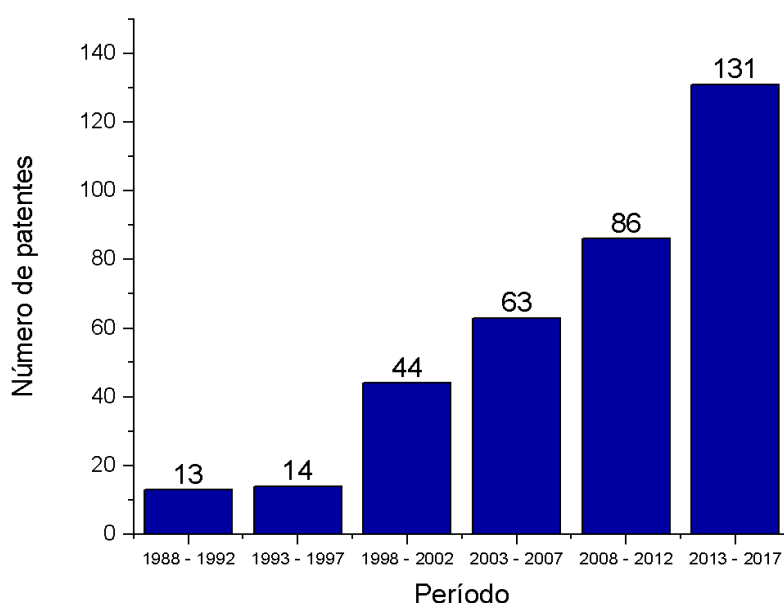


Como os corantes do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol realizam ESIPT, eles apresentam elevada estabilidade térmica e fotofísica, além de um grande deslocamento de Stokes. Essas características fazem com que tenham uma alta gama de aplicações, como a prevenção da fotodegradação de polímeros<sup>17</sup>, em dispositivos ópticos<sup>18</sup> e como sonda de membrana nas áreas biológicas.<sup>19</sup>

### 3. SITUAÇÃO ATUAL

O avanço nas pesquisas relacionadas a polímeros fluorescentes tem mostrado a existência de uma grande gama de aplicações para esses materiais. Para observar este crescimento, foi feita uma pesquisa da quantidade de patentes publicadas desde 1988 (últimos trinta anos). Os números foram obtidos a partir de pesquisas na base de dados do *Derwent Innovations Index*<sup>SM</sup>, no dia 22 de dezembro de 2017, utilizando como palavras-chave de pesquisa “*Fluorescent polymer\**” (Figura 8).

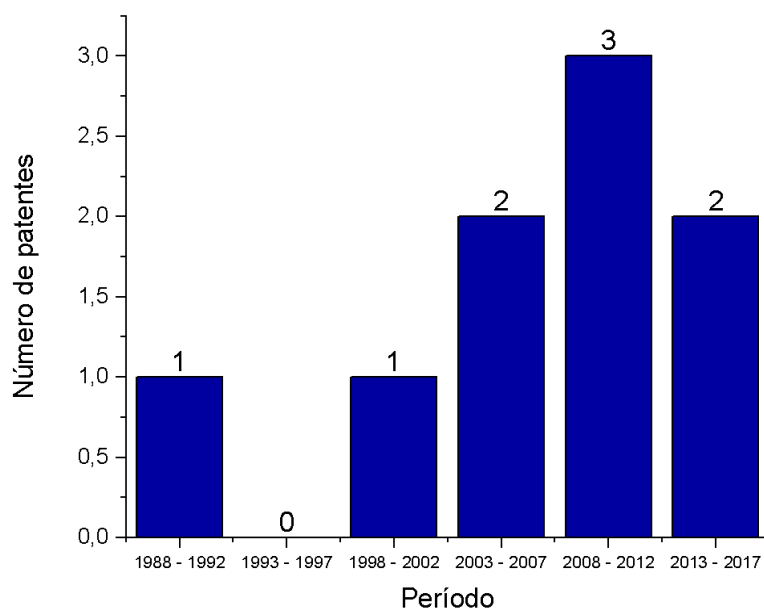
**Figura 8.** Número de patentes publicadas nos últimos trinta anos utilizando como palavras-chave “*Fluorescent polymer\**”.



A partir da Figura 8, pode-se observar um aumento do número de patente nos últimos trinta anos e, principalmente, nos últimos cinco. Foi feita uma análise das últimas publicações feitas com o intuito de constatar as suas aplicações mais atuais. A patente WO2017180998-A2<sup>20</sup> é referente a um polímero fluorescente solúvel em água, que pode ser usado para aplicações como diodos emissores de luz ou células solares. Já na patente de número CN107188184-A<sup>21</sup>, são feitos materiais de silício poroso úteis na preparação do sensor de gás fluorescente (em que são aplicados os polímeros). Por fim, a patente CN107177688-A<sup>22</sup> propõe um kit para detecção do gene de susceptibilidade a surdez, onde uma solução de reação em cadeia de polimerase é pré-instalada em uma reação em cadeia da polimerase fluorescente.

Como este trabalho está relacionado ao uso de polímeros fluorescentes em ensaios de imunodiagnósticos, foi acrescentado à pesquisa “immunoassay\*”. A Figura 9 apresenta a quantidade de patentes publicadas nos últimos 30 anos com essa busca.

**Figura 9.** Número de patentes publicadas nos últimos trinta anos utilizando como palavras-chave “Fluorescent polymer\*” e “Immunoassay\*” como filtro.



Na Figura 9 pode-se observar que existem poucas patentes publicadas quando se trata da aplicação de polímeros fluorescentes a imunodiagnósticos. Os últimos avanços foram feitos pelas patentes de números WO2015006374-A1<sup>23</sup> e US2014145115-A1<sup>24</sup>. A primeira se trata de nanopartículas sensíveis à polarização que são usadas para a formação de pontos quânticos. Utilizam nanopartículas de ouro e ferro monodispersas como biomarcadores para detecção de biomoléculas, como anticorpos, células, ácidos nucleicos, enzimas, proteínas e outros. Já a segunda se trata da preparação de micropartículas de poliestireno de diversas cores usadas nas análises de Multiplex. São padrões de referência para instrumentos baseados em fluorescência e rastreadores biológicos. Essa patente se assemelha ao projeto em questão quanto a sua aplicação. Entretanto, o método apresentado neste trabalho traz a vantagem de se ter o fluoróforo ligado covalentemente à matriz polimérica, visto que é utilizado como um iniciador de polimerização, enquanto a patente descreve polímeros corados com corantes fluorescentes, através de interações físicas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é a obtenção de microesferas de poliestireno fluorescentes utilizando a polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP) e a técnica de emulsificação/evaporação de solvente visando à sua aplicação em ensaios de imunodiagnósticos.

### 4.2. Objetivos específicos

- Síntese de poliestireno via ATRP utilizando iniciadores fluorescentes do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol ;
- Caracterizar o polímero por RMN de  $^1\text{H}$  e Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC);
- Obtenção de microesferas poliméricas fluorescentes a partir dos polímeros obtidos via ATRP misturados com poliestireno comercial pelo método de emulsificação/evaporação de solvente;
- Caracterização das microesferas de poliestireno por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e espectroscopia de fluorescência;

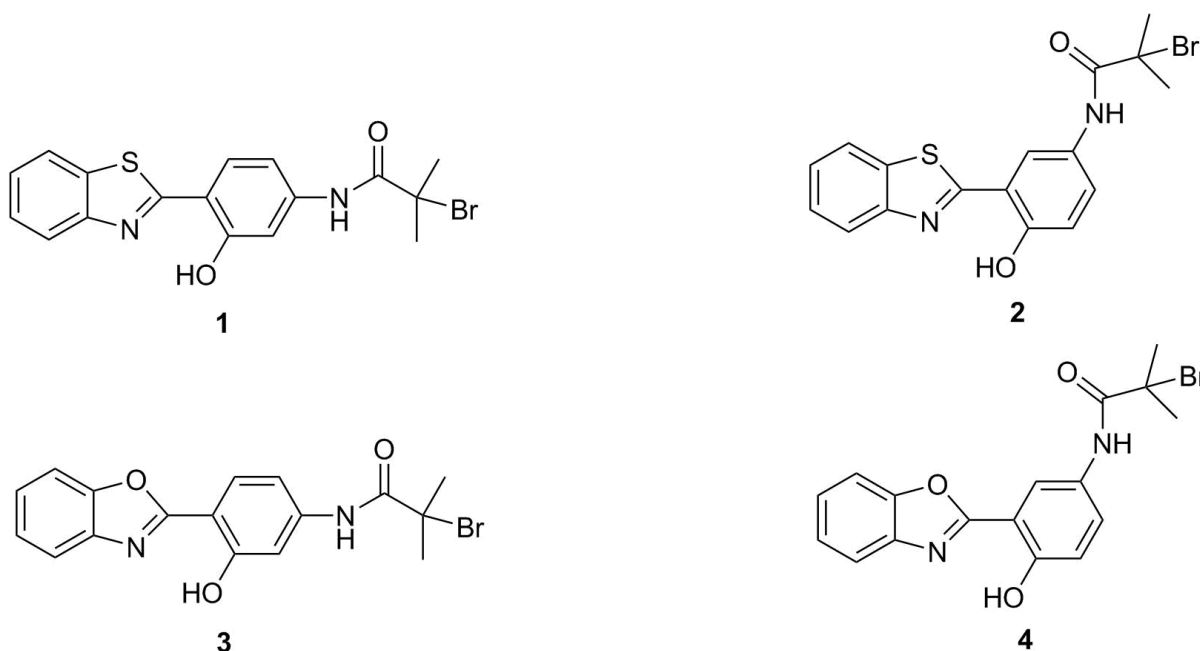
## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Materiais

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram: brometo de cobre, *N,N,N',N'',N'''* pentametildietilenotriamina (PMDETA), estireno, acetona, água deionizada, etanol, tetrahidrofurano (THF), clorofórmio, alumina básica, poliestireno comercial e poli(álcool vinílico) (PVA).

Os iniciadores fluorescentes foram sintetizados pelo Grupo de Pesquisa em Fotoquímica Orgânica Aplicada do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, conforme procedimentos descritos na literatura.<sup>25</sup> A Figura 10 mostra a estrutura desses compostos, que são do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol.

**Figura 10.** Estrutura dos iniciadores fluorescentes.



As análises do trabalho foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os equipamentos utilizados foram:

- Ressonância Magnética Nuclear: as análises de RMN de <sup>1</sup>H foram realizadas em um equipamento Bruker Avance 400 MHz. Foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>, 99,9% com 1% v/v de TMS) como solvente.

- Cromatografia de Exclusão de Tamanho: SEC Viscotek VE 2001 com detector triplo (Índice de Refração, Viscosimétrico e de Espalhamento de Luz) Viscotek TDA 402, THF como solvente orgânico, colunas de PS/DVB.

- Absorção na região do UV-Vis em solução: Espectrofotômetro Shimadzu UV-2450.

- Absorção na região do UV-Vis em estado sólido: Espectrofotômetro Shimadzu UV-2450 com esfera integradora ISR-2200.

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): microscópio JEOL modelo JSM 6060 operando a uma aceleração de 1000 volts, e uma voltagem de 10 kV.

## **5.2. Reações de polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP)**

Em um tubo de 10 mL de fundo redondo equipado com septo e previamente ambientado com N<sub>2</sub>, o catalisador CuBr foi solubilizado no ligante PMDETA em uma proporção molar CuBr/PMDETA = 1:2. O estireno, previamente purificado em uma coluna de alumina básica para remoção do inibidor existente no meio e deareado, é adicionado a uma solução do iniciador em acetona. Em seguida, a solução de estireno/iniciador é adicionada, com o auxílio de uma seringa, à solução de CuBr/PMDETA, e uma pequena quantidade de acetona é adicionada para solubilização completa do iniciador. As reações foram submetidas à agitação magnética e temperatura de 90°C no reator EasyMax 102, em uma proporção molar de Iniciador/CuBr/PMDETA/estireno de 1:3:6:480.

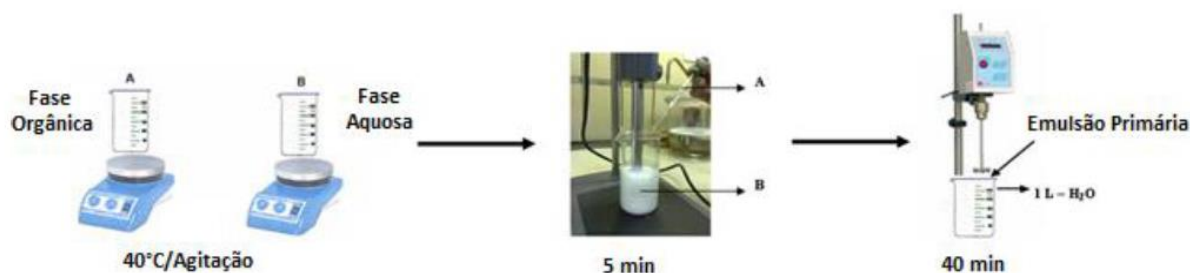
Após finalizada a reação, solubilizou-se o produto em THF, filtrou-se numa coluna de alumina e sílica para retirar o catalisador, precipitou-se o polímero em etanol, sendo por fim foi seco em estufa a vácuo. Os polímeros obtidos foram caracterizados por SEC. A massa molar foi determinada empregando curva de calibração com padrões de poliestireno na faixa de 0.5 - 4 × 10<sup>3</sup> kg/mol. As conversões foram calculados por RMN de <sup>1</sup>H.

## **5.3. Obtenção de microesferas poliméricas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente**

Os polímeros obtidos via ATRP foram misturados com poliestireno comercial ( $M_w = 171000 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $\bar{D} = 2,0$ ) em diferentes porcentagens em massa em solução

para obtenção de microesferas poliméricas fluorescentes. Em uma primeira etapa, 0,5 g da mistura de poliestirenos foram solubilizadas em 30 mL de clorofórmio (Fase orgânica A) e, separadamente, 2,5 g de poli(álcool vinílico) (PVA,  $M_w = 50.000 - 31.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , 87,6% hidrolisado) foram solubilizados em 100 mL de água deionizada (Figura 11). Depois da completa dissolução das fases, a fase orgânica foi adicionada gota a gota com o auxílio de uma bomba dosadora à fase aquosa (vazão de 6,4 mL/min), a qual foi mantida sob agitação constante utilizando-se um homogeneizador de alta velocidade (Ultra Turrax® T25) com rotação de 8000 rpm. A emulsão obtida foi gotejada em meio litro de água deionizada sob agitação mecânica a 800 rpm por 40 minutos. A solução leitosa resultante foi centrifugada e o precipitado foi seco em estufa a 40°C por 8 horas.

**Figura 11.** Procedimento para a obtenção de microesferas poliméricas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente.

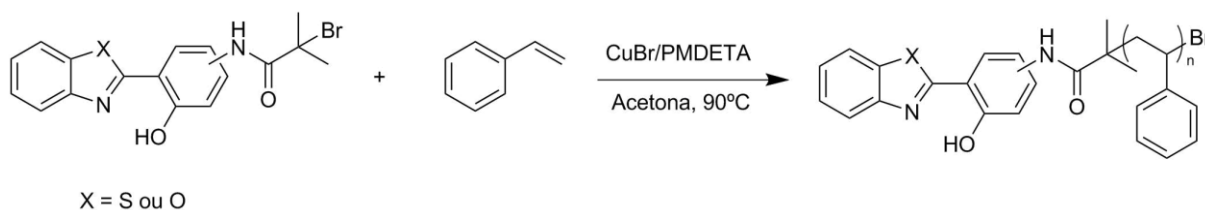


## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1. Síntese de poliestireno fluorescente via ATRP

Matrizes poliméricas de poliestireno foram sintetizadas utilizando iniciadores contendo grupos fluoróforos, fazendo com que esses substituintes fiquem ligados covalentemente à estrutura do polímero. A reação está representada pelo Esquema 2.



**Esquema 2.** Reação ATRP do estireno empregando diferentes iniciadores fluorescentes.

As reações foram feitas em acetona utilizando relações molares de iniciador e estireno de 1:480, à temperatura de 90 °C, durante 48 horas. O sistema catalítico é composto de CuBr/PMDETA, nas proporções 1:2, com excesso de ligante para garantir a complexação de todo sal de cobre no meio. Os resultados estão na Tabela 1.

**Tabela 1.** Reações com iniciadores fluorescentes.

Polímero	Iniciador	Conversão (%)	Dispersidade (Đ)	Mn <sup>(a)</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	Mn <sub>teórico</sub> <sup>(b)</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )
PS1	1	79	2,13	55.400	39.365
PS2	2	76	1,94	57.230	38.080
PS3	3	72	1,95	63.420	36.260
PS4	4	71	1,85	54.000	35.605

(a) Valores obtidos por SEC. (b) Calculado com base na conversão.

Os valores de conversão foram calculados por RMN de <sup>1</sup>H a partir de uma alíquota do meio reacional ao final da reação, contendo polímero e monômero. O cálculo é dado segundo a Equação 1.

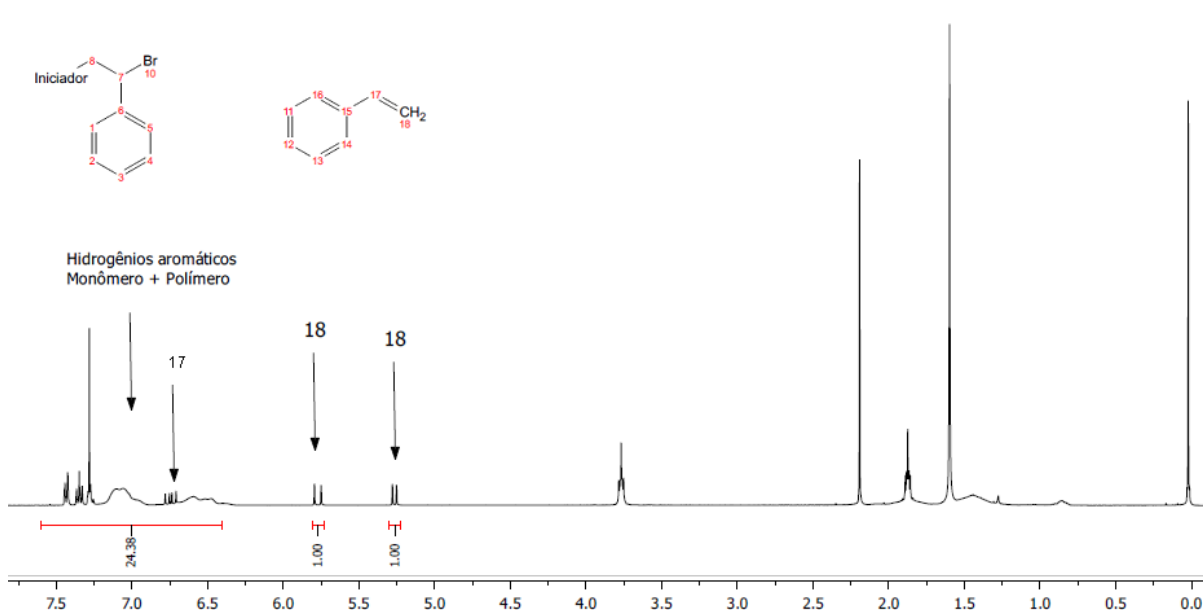
**Equação 1.** Cálculo de conversão da polimerização do estireno.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(A_{6,4 - 7,6} - 6A_{5,75})/5}{(A_{6,4 - 7,6} - 6A_{5,75})/5 + A_{5,75}} \times 100$$

Na Equação 1, A é referente ao valor de integração da área no espectro de RMN e os números subscritos referem-se à região integrada. A área obtida em 5,75 ppm é proveniente de um dos hidrogênios vinílicos do monômero estireno, assim, com o passar da reação, essa área tenderá a diminuir visto que a polimerização envolve a mudança na ligação carbono-carbono, sendo inicialmente do tipo sp<sup>2</sup> e

passando a ser  $sp^3$ . A área na faixa de 6,4 - 7,6 ppm corresponde aos sinais dos hidrogênios dos anéis aromáticos, presentes tanto no monômero quanto no polímero. Na Figura 12 pode-se observar o espectro de  $^1H$  RMN com as respectivas integrações. Não é possível ver os sinais do fluoróforo, visto que estão em uma quantidade muito menor comparado ao polímero e ao monômero.

**Figura 12.** Espectro de  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ) do polímero fluorescente obtido a partir do iniciador 1



Não houve controle da reação, já que polímeros com dispersidade  $>1,8$  foram obtidos. Além disso, os valores de massa molar média encontrados estão todos acima do valor teórico esperado. Este resultado pode estar associado a uma possível complexação do íon cobre com o nitrogênio presente no grupo fluoróforo, interferindo no equilíbrio ATRP.

## 6.2. Fotofísica dos polímeros obtidos via ATRP

As medidas de absorção e emissão dos polímeros obtidos via ATRP foram feitas em solução, utilizando THF como solvente em uma concentração de  $1 \text{ g.mL}^{-1}$ . Para fazer a determinação da quantidade de fótons que esses materiais fluorescentes absorvem, foi utilizada a Lei de Lambert-Beer, onde  $A$  é a absorvância,  $\epsilon$ , o coeficiente de extinção molar,  $c$ , a concentração do composto em  $\text{mol.L}^{-1}$  e  $l$ , a distância percorrida pela radiação. (Equação 2)<sup>14</sup>.

$$A = \epsilon cl \quad (2)$$

A partir da Equação 2 é possível obter o valor do coeficiente de extinção molar pelos resultados obtidos no espectro de absorção do composto.

Também foram feitos cálculos de rendimento quântico ( $\Phi_f$ ), que se trata da razão da quantidade fótons absorvidos pela quantidade de fótons que foram emitidos por fluorescência (Equação 3). Assim, o valor máximo que pode ser obtido é 1, podendo ser expresso em porcentagem.

$$\Phi_f = \frac{\text{Número de fótons emitidos por fluorescência}}{\text{Número de fótons absorvidos}} \quad (3)$$

Para realizar essas medidas em espectrofotômetros comuns, é necessário o uso de um padrão de rendimento quântico, como o sulfato de quinino. A determinação deste parâmetro foi feita a partir da Equação 4<sup>27</sup>.

$$\Phi_f = \Phi_{f, st} \frac{F_x}{F_{st}} \cdot \frac{f_{st}}{f_x} \cdot \frac{n^2_x(\lambda_{em})}{n^2_{st}(\lambda_{em})} \quad (4)$$

Na equação do rendimento quântico, F é a integral do fluxo de fótons, f é o fator de absorbância e n é o índice de refração do solvente utilizado na medida. São obtidos resultados para a amostra, representados por x, e para o padrão, representados por st.

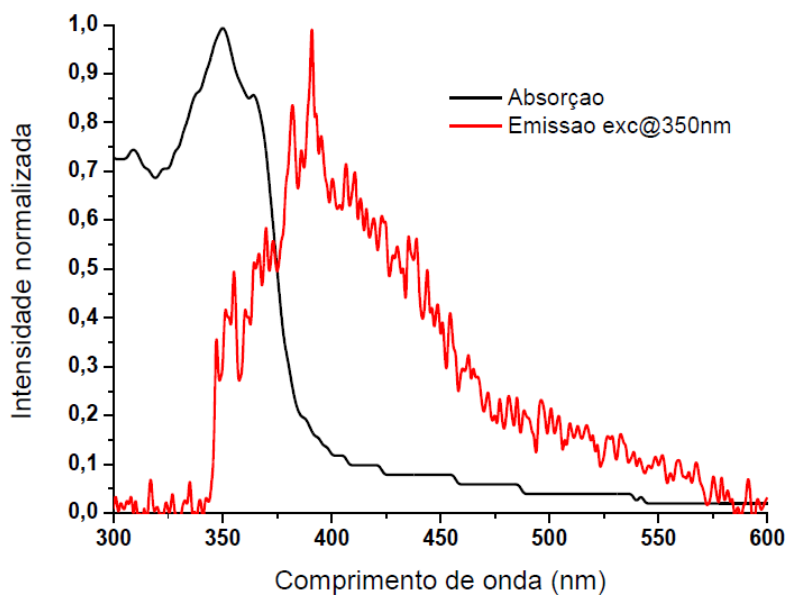
A fotofísica dos iniciadores foi investigada em estudos anteriores, podendo-se observar os valores obtidos na Tabela 2.<sup>3</sup>

**Tabela 2.** Valores dos parâmetros obtidos a partir dos espectros de absorção e emissão dos iniciadores em THF.<sup>3</sup>

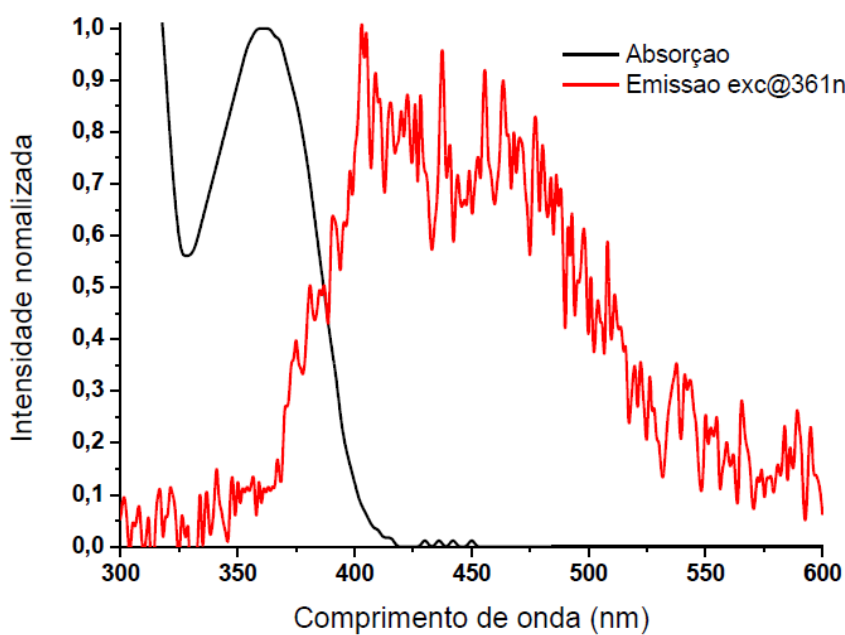
Iniciador	A <sub>máx</sub> (nm)	Emissão <sub>ceto</sub> (nm)	Emissão <sub>enol</sub> (nm)	ε	RQ (%)
1	345	511	392	35820	1,1
2	354	555	396	9900	0,5
3	330	480	370	36274	1,7
4	340	518	378	9615	1,0

Os espectros de absorção e emissão dos polímeros fluorescentes encontram-se nas Figuras 13, 14, 15 e 16.

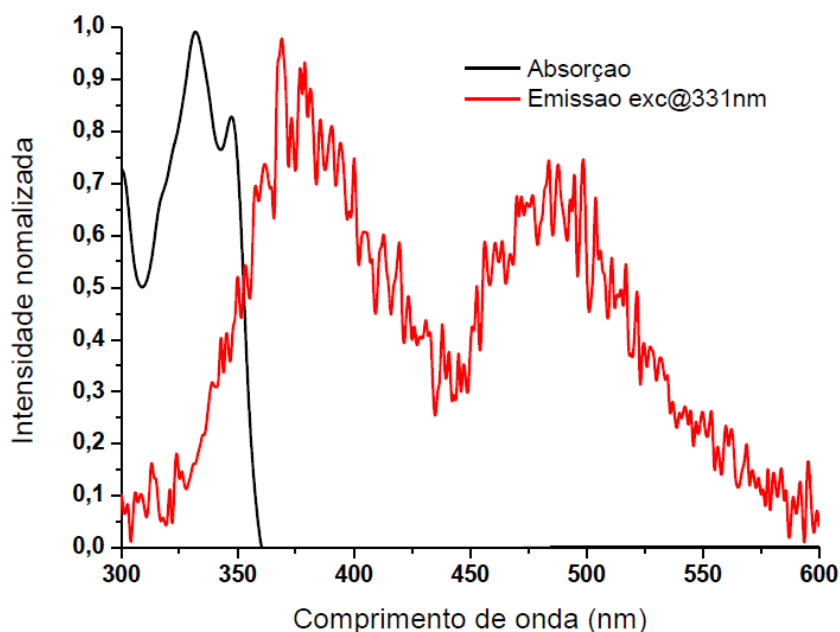
**Figura 13.** Espectro de absorção na região do UV-Vis e emissão do polímero PS1 em THF.



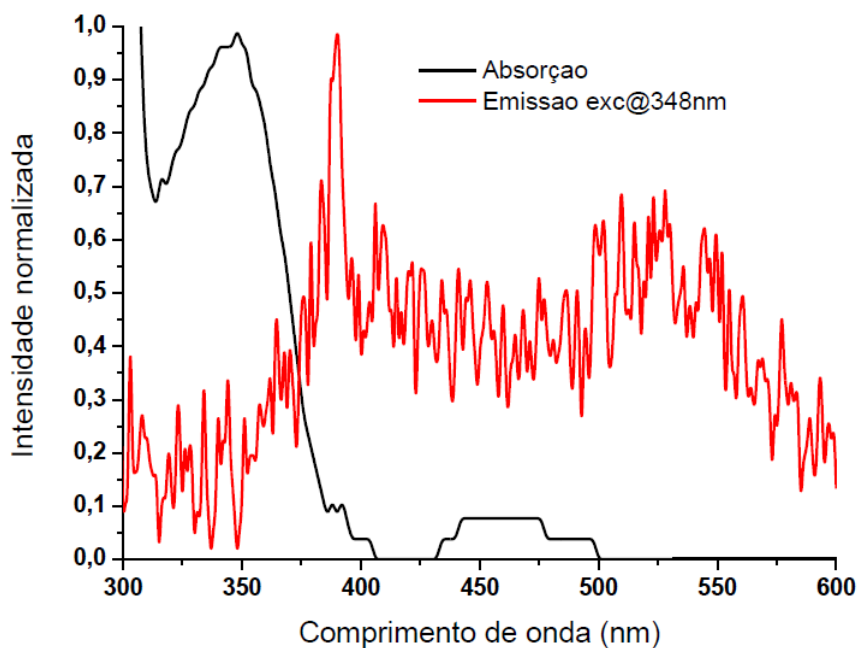
**Figura 14.** Espectro de absorção na região do UV-Vis e emissão do polímero PS2 em THF.



**Figura 15.** Espectro de absorção na região do UV-Vis e emissão do polímero PS3 em THF.



**Figura 16.** Espectro de absorção na região do UV-Vis e emissão do polímero PS4 em THF.



A conformação enol é energeticamente desfavorecida no estado excitado, entretanto é possível que haja ligações de hidrogênio entre os hidrogênios da ligação O-H do fluoróforo com nuvens  $\pi$  de anéis aromáticos<sup>28</sup>, havendo interrupção parcial do processo ESIPT. Sendo assim, essas interações podem ocorrer entre o hidrogênio fenólico do fluoróforo e os anéis aromáticos do poliestireno, fazendo com que a desativação se dê no mesmo confômero em que a molécula foi excitada. Nos

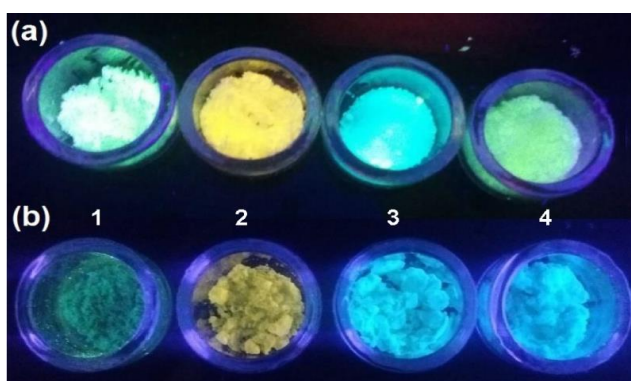
espectros obtidos, pode-se observar que o PS1 apresentou desativação apenas na conformação enol, sendo mais afetado por esse efeito. Nos espectros dos outros polímeros, há a presença de uma dupla emissão de fluorescência, característico de fluoróforos que realizam ESIPT. A primeira banda é referente à emissão enol, apresentando menor comprimento de onda, e a segunda é referente à emissão ceto, com maior comprimento de onda devido à perda de energia durante a transição de enol para ceto ( $E^* \rightarrow K^*$ ). A Tabela 3 resume os resultados obtidos, além de apresentar os dados de rendimento quântico.

Tabela 3. Valores dos parâmetros obtidos a partir dos espectros de absorção e emissão dos polímeros em THF.

Polímero	$A_{\text{máx}}$ (nm)	Emissão <sub>ceto</sub> (nm)	Emissão <sub>enol</sub> (nm)	RQ (%)
1	350	-	390	1,8
2	361	467	403	0,8
3	331	484	370	3,6
4	348	528	390	2,4

Pode-se observar que quando a molécula fluorescente está inserida na matriz polimérica, há um aumento do rendimento quântico comparado ao iniciador puro em solução. Isso se deve ao fato de que o confinamento da molécula diminui seus graus de liberdade, havendo menos processos de desativação não-radiativos e menor perda de energia por colisão. As Figuras 17a e 17b mostram os iniciadores sólidos puros e os polímeros fluorescentes, respectivamente, quando expostos à radiação na faixa do UV-Vis.

**Figura 17.** Fluorescência dos (a) iniciadores de polimerização no estado sólido e (b) poliestirenos obtidos a partir dos iniciadores.

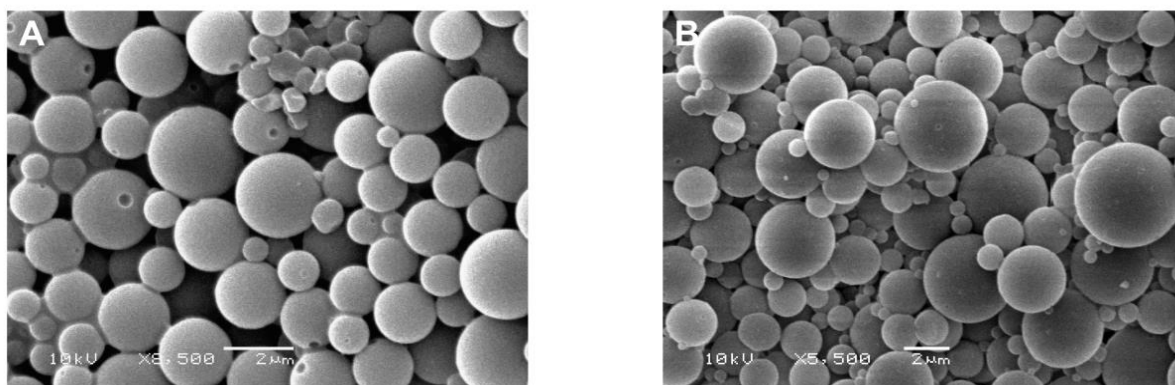


### 6.3. Emulsificação/evaporação do solvente

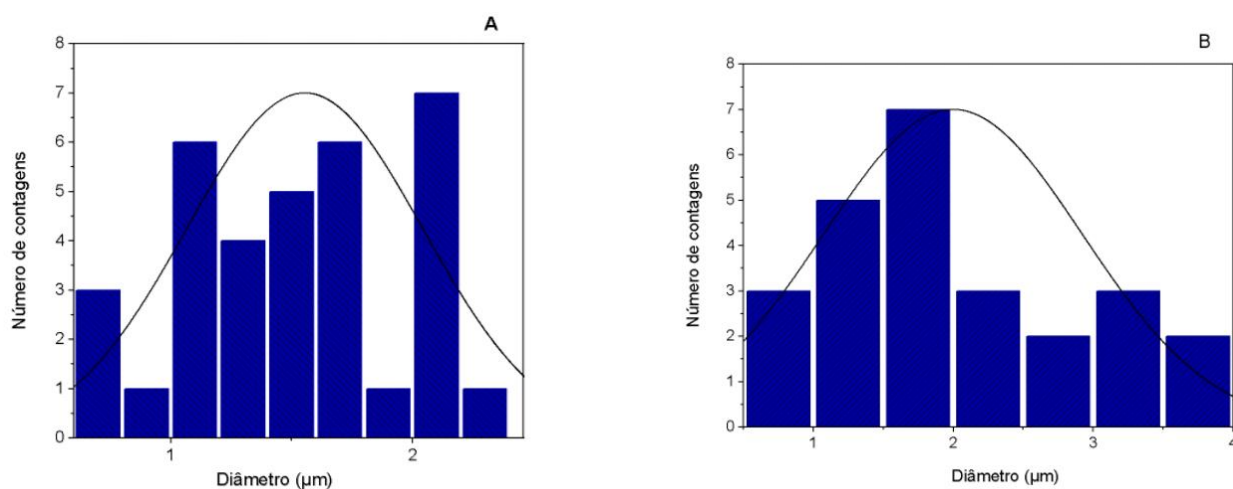
A partir do método de emulsificação/evaporação do solvente foram obtidas microesferas utilizando o polímero PS1 misturado com poliestireno comercial. A mistura foi feita com 20% e 2% em massa do polímero fluorescente, sendo referente ao caso A e B, respectivamente, conforme Figura 18. Os diâmetros foram determinados utilizando o programa *ImageJ* a partir das imagens de MEV. Através da contagem individual das micro esferas (em torno de 30 contagens), foram obtidos histogramas de distribuição de tamanho.

**Figura 18.** (a) Imagens de MEV das microesferas obtidas a partir da mistura do PS1 com poliestireno comercial. (b) Histogramas obtidos a partir das imagens de MEV.

(a)

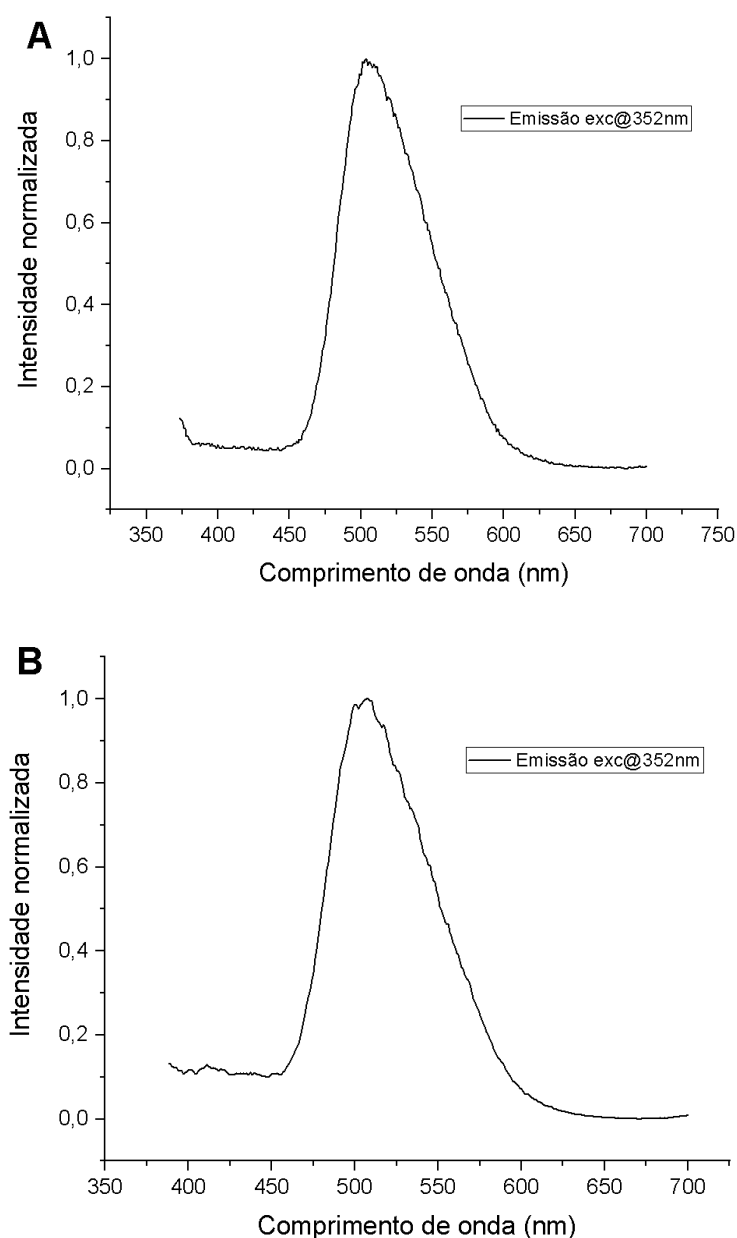


(b)



O tamanho das microesferas é influenciado pela velocidade de agitação utilizada durante o processo. Para os casos A e B, foram observados diâmetros médios de  $1,55 \pm 0,49 \mu\text{m}$  e  $1,99 \pm 1,01 \mu\text{m}$ , respectivamente, apresentando valores próximos, o que mostra uma reprodutibilidade do método visto que os parâmetros utilizados foram os mesmos para ambos. Os diâmetros obtidos estão abaixo do desejado (em torno de  $5,6 \mu\text{m}$ ), precisando ser feita uma otimização do processo de obtenção de microesferas. Como uma forma qualitativa de observar se as microesferas ainda apresentam fluorescência após todo o processo, foram feitas medidas fotofísicas no estado sólido desses polímeros (Figura 19).

**Figura 19.** Espectro emissão das microesferas fluorescentes no estado sólido.





Tanto para A quanto para B é possível observar a emissão de fluorescência mesmo com pequenas quantidades do polímero fluorescente no meio. O sinal de emissão é referente ao confômero ceto, mostrando que o mecanismo ESIPT ocorre predominantemente para o PS1 no estado sólido. Como o fluoróforo é utilizado como iniciador na polimerização, ele se encontra ligado covalentemente à cadeia polimérica, fazendo com que não se tenha perda dessa característica ao final do processo.

## 7. ANÁLISE DE CUSTO

Neste tópico é apresentado uma estimativa do investimento necessário para a obtenção de 1 quilograma de microesferas de poliestireno. Itens considerados básicos de laboratório, como pinças, copos de Becker, espátulas, balões volumétricos e outros materiais não foram levados em consideração nos cálculos. Água destilada e gás argônio também não foram somados aos valores. A busca dos valores de reagentes e solventes foi feita no dia 3 de janeiro de 2018.

### 7.1. Obtenção de poliestireno fluorescente via ATRP

Os cálculos a seguir foram feitos para a síntese de 1 quilograma de poliestireno fluorescente, considerando uma conversão da reação de polimerização de 70%. A Tabela 4 apresenta os dados referentes aos reagentes utilizados.

**Tabela 4.** Informações sobre os reagentes e solvente utilizados na síntese do poliestireno fluorescente.

Reagente/ Solvente	Marca	Descrição	Quantidade	Preço (R\$)
Iniciadores	-	-	1 kg	11.900,00
Estireno	Sigma-Aldrich	>99%	1 L	142,00
CuBr	Sigma-Aldrich	98%	250 g	502,00
PMDETA	Sigma-Aldrich	99%	250 mL	668,00
Acetona	Sigma-Aldrich	≥99,9%	1 L	70,00

A partir dos dados da Tabela 4, pode ser calculado o valor gasto em cada reação, considerando que são obtidos 2 g de poliestireno ao final do processo (Tabela 5).

O valor total gasto para obter 2 gramas de polímero é R\$ 1,02. Sendo assim, a produção de 1 quilograma de poliestireno fluorescente é R\$ 510,00.

**Tabela 5.** Quantidades utilizadas por reação de reagentes/solvente e seus respectivos valores.

<b>Reagente/ Solvente</b>	<b>Quantidade utilizada por reação</b>	<b>Valor (R\$)</b>
Iniciadores	10 mg	0,119
Estireno	2,85 g	0,45
CuBr	0,024 g	0,049
PMDETA	0,07 mL	0,19
Acetona	3 mL	0,21

## **7.2. Obtenção de microesferas fluorescentes pelo método de emulsificação/evaporação do solvente**

As microesferas de poliestireno foram obtidas a partir da mistura do polímero fluorescente sintetizado via ATRP e poliestireno comercial, com proporções mássicas de 2 e 20%. A Tabela 6 apresenta os dados referentes ao reagente e solvente utilizados.

**Tabela 6.** Informações sobre os reagentes e solvente utilizados na obtenção de microesferas fluorescentes de poliestireno.

<b>Reagente/ Solvente</b>	<b>Marca</b>	<b>Descrição</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Preço (R\$)</b>
Clorofórmio	Sigma-Aldrich	≥99,5%	1 L	438,00
PVA	Sigma-Aldrich	99% hidrolisado	1 kg	1362,00
Poliestireno	Innova	-	1 kg	7,25

A partir dos dados da Tabela 6, podem ser calculados os valores por reação, referentes à obtenção de 500 mg de microesferas (Tabela 7).

O gasto para a obtenção de 500 mg de microesferas de poliestireno fluorescentes utilizando 2 e 20% do poliestireno sintetizado é, respectivamente, R\$ 16,55 e R\$ 16,59. Sendo assim, a produção de 1 kg de microesferas é igual a R\$ 33.100,00 e R\$ 33.180,00. Não foi possível obter um valor comercial para este tipo de microesferas fluorescentes para comparação.

**Tabela 7.** Quantidades utilizadas por reação de reagentes/solvente e seus respectivos valores.

<b>Reagente/ Solvente</b>	<b>Quantidade utilizada por reação</b>	<b>Valor (R\$)</b>
Clorofórmio	30 mL	13,14
PVA	2,5 g	3,405
Poliestireno (98%)	490 mg	0,0035
Poliestireno (80%)	400 mg	0,0029
PS fluorescente (2%)	10 mg	0,0045
PS fluorescente (20%)	100 mg	0,045

## 8. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidos polímeros fluorescentes utilizando iniciadores contendo fluoróforos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol via ATRP com sucesso. As reações de polimerização apresentaram conversões entre 71 e 79%. Entretanto não houve controle das reações, provavelmente devido a uma possível complexação do íon cobre com o nitrogênio do grupo fluoróforo, interferindo no equilíbrio ATRP.

A partir dos resultados de espectroscopia de fluorescência em THF dos polímeros, observou-se um aumento do rendimento quântico quando comparado aos iniciadores puros em solução. Isso se dá pelo fluoróforo estar inserido dentro da

matriz polimérica, diminuindo seus graus de liberdade fazendo com que haja menos desativações não-radiativas.

O método para obtenção de microesferas de poliestireno apresentou bons resultados. A partir da mistura em massa de 2 e 20% do polímero fluorescente com poliestireno comercial, obteve-se esferas com diâmetros de  $1,55 \pm 0,49 \mu\text{m}$  e  $1,99 \pm 1,01 \mu\text{m}$ , respectivamente. Após todo o processo, os materiais continuaram exibindo fluorescência, já que os grupos fluoróforos estão ligados covalentemente à matriz polimérica.

Por fim ressalto que o trabalho apresentado possui interesse tecnológico e a patente intitulada “Iniciadores de polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP) fluorescentes via transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT) e polímeros fluorescentes obtidos por esse método” foi depositada recentemente no INPI, sob número BR 10 2017 026077 1.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Erna Brand, H. Desenvolvimento de teste diagnóstico para triagem sorológica de diversas infecções virais. Dissertação de Doutorado - Fundação Oswaldo Cruz, 2017.
2. Yuan, J., Wang, S., Shan, J., Peng, J., Wei, L. and Xu, X. Formation and Photoluminescence of Fluorescent Polymers. **International Journal of Polymer Science**, , pp.1-2, 2010.
3. Faleiro Berbigier, J. *Novos iniciadores fluorescentes de polimerização ATRP*. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2017.
4. Reisch, A. and Klymchenko, A. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging. **Small**, 12(15), pp.1968-1992, 2016.
5. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization: From Mechanisms to Applications. **Israel Journal of Chemistry**, 52(3-4), pp.206-220, 2012.
6. Braunecker, W. A. Matyjaszewski, K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. **Progress in Polymer Science**. , v. 32, p. 93–146, 2007.
7. Braun, D.; Cherdrón, H.; Rehahn, M.; Ritter, H.; Voit, B. *Polymer Synthesis: Theory and Practice: Fundamentals, Methods, Experiments*; 4<sup>a</sup> ed.; Springer; 2005.
8. Poli Soares, P. *Obtenção de microesferas fluorescentes e magnéticas*. Dissertação de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2017.
9. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. **Macromolecules**, 45(10), pp.4015-4039, 2012.
10. Souto, Eliana B., Severino, Patrícia, & Santana, Maria Helena A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, 22(1), 101-106. Epub January 27, 2012.
11. A. Dunbar, S. and Li, D. (2018). Introduction to Luminex xMAP Technology and Applications for Biological Analysis in China. [ebook] Disponível em: <[http://www.asiabiotech.com/14/1410/0026\\_0030.pdf](http://www.asiabiotech.com/14/1410/0026_0030.pdf)> Acesso em 10 Dec. 2017.

12. Luminex® Assays High-throughput Multiplex Bead Based Assays. (2008). [ebook] Disponível em: <<http://cgs.hku.hk/portal/files/GRC/Events/Seminars/2008/20080612/Luminex.pdf>> Acesso em: 4 Jan. 2018.
13. A. Dunbar, S. and R. Hoffmeyer, M. (2014). Microsphere-Based Multiplex Immunoassays: Development and Applications Using Luminex® xMAP® Technology. [ebook] Disponível em: <<http://scitechconnect.elsevier.com/wp-content/uploads/2014/01/main-26.pdf>> Acesso em: 4 Jan. 2018].
14. An Introduction to Fluorescence Spectroscopy. (2010). [ebook] Disponível em: <<https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Fluorescence%20Spectroscopy.pdf>> Acesso em 4 Jan. 2018.
15. Valeur, B. and Berberan-Santos, M. (2013). Molecular Fluorescence. Weinheim: Wiley-VCH.
16. Padalkar, V. and Seki, S. . Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT)-inspired solid state emitters. *Chemical Society Reviews*, 45(1), pp.169-202, 2016.
17. Scully, A., Bigger, S., Ghiggino, K. and Vogl, O. Temperature dependence of fluorescence from polymer-bound 2-(2'-hydroxyphenyl)-2H-benzotriazole photostabilizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 55(3), pp.387-393, 1991.
18. Kim, C., Park, J., Seo, J., Park, S. and Joo, T. Excited State Intramolecular Proton Transfer and Charge Transfer Dynamics of a 2-(2'-Hydroxyphenyl)benzoxazole Derivative in Solution. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114(18), pp.5618-5629, 2010.
19. Lv, H. Yuan, D. Liu, W. Chen, Y. Au, C. Yin, S. A highly selective ESIPT-based fluorescent probe for cysteine sensing and its bioimaging application in living cells. **Sensors and Actuators B: Chemical**. China, v. 233, p. 173 – 179, 2016.
20. EASWARAN A, GULNIK S. New water soluble fluorescent polymer used for material applications such as light emitting diodes or solar cells, and has high solubility, brightness, and broad spectra, and detects analyte in sample by contacting sample with binding agent. WO2017180998 A2, 2017
21. CHENG L, ZHANG R, MA H. Preparing porous silicon material by hydrothermal method comprises e.g. soaking monocrystalline silicon wafer with ethanol, acetone,

then cleaning and placing monocrystalline silicon wafer in the lining of hydrothermal reactor. N107188184-A, 2017.

22. TAN A, GUO Y, WANG Y, ZHOU D, LEI X. Kit useful for detecting deafness susceptibility gene mutation, comprises the polymerase chain reaction solution for amplifying 12 SrRNA gene m.1555A site and m.1494C site of the first upstream primer and a first downstream primer. CN 107177688 A, 2017.

23. CHIU D T, ZEIGLER M, CHIU D. Polarization-sensitive nanoparticles used for forming e.g. quantum dot used in monodispersed composition used for analyzing target e.g. biomarker, comprise chromophoric polymer and matrix polymers, and has preset critical dimension. WO2015006374-A1, 2015.

24. LAM J Y L, MENCHEN S, Zou R, BENSON S. Fluorescent polymeric material used e.g. to prepare multicolored microparticles for multiplexed analysis and as reference standard, comprises polymer and lipid-soluble rhodamine dye comprising 6-amino-xanthen-3-ylidene-ammonium compounds. US2014145115-A1, 2014.

25. Zhao, H. Chang, J. Du, L. Effect of hydrogen bonding on the spectroscopic properties of molecular complexes with aromatic rings as acceptors. **Computational and Theoretical Chemistry**. China, v. 1084, p. 126 – 132, 2016.

26. Fialho Zawacki, M., Liberato Petzhold, C., Severo Rodembusch, F. and Faleiro Berbigier, J. (2017). Iniciadores de polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP) fluorescentes via transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT) e polímeros fluorescentes obtidos por esse método. BR 10 2017 026077 1.

27. Würth, C. Grabolle, M. Pauli, J. Spieles, M. Resch-Genger, U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. **Nature Protocols**. Alemanha, v. 8, p. 1535 – 1550, 2013

28. Zhao, H. Chang, J. Du, L. Effect of hydrogen bonding on the spectroscopic properties of molecular complexes with aromatic rings as acceptors. **Computational and Theoretical Chemistry**. China, v. 1084, p. 126 – 132, 2016