

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE POLÍMEROS

**SÍNTESE EM EMULSÃO, FUNCIONALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE POLIESTIRENO PARA UTILIZAÇÃO EM TESTES IMUNOLÓGICOS**

AUTORA: VERA LÚCIA COVOLAN

ORIENTADORA: Profa. Dra. LÚCIA H. INNOCENTINI MEI

COLABORADOR: Prof. Dr. CLÁUDIO LÚCIO ROSSI (FCM - UNICAMP)

Tese apresentada à
Faculdade de Engenharia Química, como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química.

FEVEREIRO - 1995

CAMPINAS - SP



935 13

UNIDADE	AC
COD. DE BARRAS	
T/UNICAMP	
C838s	
24853	
433/95	
	A
R\$ 11,00	
09/06/95	

CM-00071426-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

C838s Covolan, Vera Lúcia
Síntese em emulsão, funcionalização e caracterização
de poliestireno para utilização em testes imunológicos /
Vera Lúcia Covolan. - - Campinas, SP: [s.n.], 1995.

Orientador: Lúcia H. Imocentini Mei
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Polimerização. 2. *Síntese em emulsão.
3. *Poliestireno. I. Mei, Lúcia H. Innocentini.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

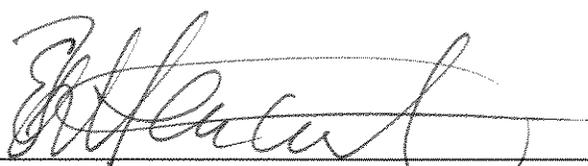
Tese defendida e aprovada em 16 de fevereiro de 1995 pela banca
examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei



Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi



Prof. Dr. Edison Bittencourt

“ decidi então,
conhecer a sabedoria e a ciência,
assim como a tolice e a loucura; e compreendi:
onde há muita sabedoria, há também muita tristeza
e onde há mais conhecimento, há também mais sofrimento.
Observei o conjunto da obra de Deus
e percebi que o homem não consegue descobrir
tudo o que acontece debaixo do sol.
Por mais que o homem se afadigue em pesquisar,
não chega a compreendê-la. E mesmo que o sábio diga
qua a conhece, nem porisso é capaz de entendê-la.”

Coélet

Quero agradecer especialmente:

Aos meus pais, irmãos e familiares pelo apoio e carinho constantes;
em particular ao meu irmão Roberto, professor do Instituto de Física desta
universidade, que me acompanhou de perto, compartilhando não só o
desenvolvimento deste trabalho.

À Deus, por tudo o que pude e pelo quanto me permitiu poder.

Agradecimentos

Quero expressar meu reconhecimento pelas contribuições
com que pude contar, sem as quais,
dificilmente este trabalho teria se concluído. Agradeço:

À Profa. Dra. Lúcia H. Innocentini Mei por ter-me aceito sob sua orientação; agradeço a atenção e confiança a mim dedicadas.

Ao Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi, do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, pela pronta colaboração, interesse e imprescindível orientação dada em discussões sobre imunologia; agradeço também o incentivo.

À Profa. Dra. Sandra Lúcia da Cruz, pela valiosa colaboração prestada de modo especial nas etapas finais deste trabalho e pela inestimável amizade, confiança e apoios manifestados concretamente.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos M. Carrera, pela sempre presente disponibilidade em ajudar; agradeço todo o estímulo, amizade e atenção a mim dedicadas.

Ao Instituto de Química, na pessoa do Prof. Dr. Nelson Duran, pela concessão de equipamentos de laboratório e na pessoa do Prof. Dr. Celso Davanzo pela utilização dos equipamentos de IV de seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. José A. Sanjurjo e à Dra. Ana de Alvarenga do Departamento de Eletrônica Quântica do Instituto de Física, pela realização das análises de Espectroscopia Raman.

À Faculdade de Engenharia Mecânica, pelas micrografias feitas pela técnica Rita H.B. Jacon.

Ao DEMA da UFSCar pelas análises de DSC realizadas por seus técnicos.

À Dow Corning do Brasil Ltda., pela utilização do analisador de partículas.

À Henkel S.A. Indústrias Químicas, pela concessão de reagentes.

Ao Departamento de Sistemas Químicos da Faculdade de Engenharia Química, pela utilização de seus micro-computadores e pela colaboração dos professores e alunos deste departamento.

Às técnicas Daniela, Carla, Veruska e Stela pelos trabalhos prestados.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido.

Aos amigos: Mary, Peter, Dri, Cabral, Ana, Diguinho, Lulu, Jotinha, Rodinei, Juju, Rutinha, Gisélia, Jones, Lurdinha e Célia pela companhia e amizade. À amiga Miraci Brulèt pelo envio de literaturas do exterior.

Ao meu amigo e professor de inglês Luis del Nero, pelas orientações e sugestões feitas em trabalhos escritos na língua inglesa; agradeço o apoio e estímulo constantes.

À analista de sistemas Luciana Alvim dos Santos, amiga muito querida, pelas instruções quanto à utilização de alguns programas computacionais e pela amizade dedicada.

Às amigas Mariza e Inês, pela amizade e companheirismo demonstrados desde o início, compartilhando dificuldades e êxitos, em diversos momentos.

Vera L. Covolan

TRABALHOS PUBLICADOS

- [1] - COVOLAN, V.L. e MEI, L.H.I., - (1994), Modified polystyrene latex by diazotization and its use in immunological assays.,Anais do IV Latin-American Polymer Symposium, II Ibero-American Polymer Symposium , VI International Macromolecular Colloquium.,vol.1, p.268 - 270, Gramado/RS - Brasil.
- [2] - COVOLAN, V.L.; MEI, L.H.I. e ROSSI, C.L., - (1994), Síntese de poliestireno diazotizado para utilização em testes imunológicos.,Anais do 10^o Congresso Brasileiro de Engenharia Química, vol.2, p.1098 - 1103, São Paulo/SP - Brasil.
- [3] - COVOLAN, V.L.; MEI, L.H.I. e SANJURJO, J.A.,- (1994), Synthesis of microspheres of polystyrene for use in immunological assays: functionalization and characterization.,Anais do 5 th European Polymer Federation Symposium on Polymeric Materials, p.234, Basel - Switzerland.

RESUMO

Através de polimerização em emulsão obteve-se um látex de poliestireno. Este látex na presença de grupos funcionais adequados foi modificado quimicamente para a obtenção de um látex de polidiazostireno, que tem aplicação na medicina, em testes imunológicos do tipo aglutinação.

A síntese deste látex consistiu de 4 etapas: obtenção do poliestireno em emulsão, nitração, aminação e diazotização. Estas etapas foram caracterizadas através espectroscopia infra-vermelho (FT-IR) e Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). Foram feitas também a determinação da porcentagem de conversão através de um método gravimétrico e a determinação do diâmetro médio das partículas utilizando-se um contador de micro partículas (Coulter-Counter).

Pelas características espectrais verificou-se a obtenção do poliestireno e as modificações químicas foram constatadas pela presença das bandas características dos grupos NO_2 , NH_2 e $-\text{N}=\text{N}-$ ligados ao poliestireno. O diâmetro médio das partículas, para 6 sínteses realizadas, variou de 0,058 - 0,181 μm e pelas análises morfológicas verificou-se homogeneidade na distribuição dos diâmetros das partículas. A porcentagem de conversão foi calculada e variou entre 82 a 98 %.

Testes imunológicos preliminares foram realizados e o látex sintetizado mostrou ser eficiente nas reações de aglutinação. Esses resultados conferem à técnica, simplicidade, rapidez e baixo custo e mostram que este material pode ter grande utilidade em laboratórios de rotina diagnóstica

ABSTRACT

A polystyrene latex was obtained through emulsion polymerization. In presence of suitable functional groups, this latex was chemically modified in order to obtain a polydiazostyrene latex, which has broad application in agglutination assays in medicine.

The synthesis of this latex consisted of four steps: obtention of polystyrene in emulsion, nitration, amination and diazotization. These steps were characterized through Infra-red Spectroscopy (FT-IR.), Raman Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The polymerization conversion rate was determined by the gravimetric method. The particles mean size and the distribution of the particles size were determined by using a sub-micron particles analyser (Coulter-counter).

The obtention of the polystyrene was verified by the spectral characteristics. The chemical modifications were confirmed by the presence of the characteristic bands of NO_2 , NH_2 and $-\text{N}=\text{N}-$ groups. For six syntheses the particles mean size ranged from 0.058 to 0.181 μm and the homogeneity in the particles size distribution was verified through morphological analyses. The conversion rate ranged from 82 to 98 %.

Preliminary immunological assays were carried out and the synthesized polydiazostyrene latex showed good agglutination. These results suggest that this material can be of great use in laboratories of clinical pathology, thanks to the simplicity, promptness and low cost which it confers to agglutination assays.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - Revisão da literatura

1.1 - Introdução.....	01
1.2 - Histórico	03
1.3 - Teste de aglutinação.....	05
1.4 - Revestimento das partículas látex : adsorção e ligação covalente.....	10
1.5 - Imunomicrosféricas: características e aplicações.....	11
1.6 - Polimerização em emulsão.....	13
1.6.1 - Bases teóricas.....	13
1.6.1.1 - Mecanismo de formação das cadeias.....	16
1.6.1.2 - Etapas do processo.....	21
1.6.1.3 - Látices: estabilidade coloidal.....	26
1.7 - Funcionalização: modificações químicas para ligações covalentes.....	33
1.7.1 - Diazotização.....	39
1.8 - Objetivos.....	42

CAPÍTULO 2 - Procedimento experimental

2.1 - Dos métodos utilizados	43
2.1.1 - Materiais e reagentes.....	43
2.1.2 - Síntese preliminar.....	45
2.1.3 - Síntese definitiva.....	45
2.2 - Das modificações químicas.....	47
2.2.1 - Nitração.....	47
2.2.2 - Aminoação.....	48
2.2.3 - Diazotização.....	49
2.3 - Sensibilização.....	50
2.3.1 - Teste de aglutinação.....	50
2.4 - Das análises de caracterização.....	51
2.4.1 - Determinação da conversão.....	51

2.4.2 - Determinação do diâmetro médio e distribuição dos diâmetros das partículas.....	51
2.4.3 - Microscopia eletrônica de varredura.....	52
2.4.4 - Espectroscopia infra-vermelho.....	52
2.4.5 - Espectroscopia Raman.....	52
2.4.6 - Calorimetria diferencial de varredura.....	52

CAPÍTULO 3 - Resultados e discussão

3.1 - Conversão.....	53
3.2 - Diâmetro médio e distribuição dos diâmetros das partículas.....	55
3.3 - Microscopia eletrônica de varredura.....	61
3.4 - Características espectrais.....	64
3.4.1 - Espectroscopia infra-vermelho.....	64
3.4.2 - Espectroscopia Raman.....	68
3.5 - Calorimetria diferencial de varredura.....	70
3.6 - Sensibilização e teste de aglutinação.....	71

CAPÍTULO 4 - Conclusão.....73

CAPÍTULO 5 - Sugestões para trabalhos futuros75

CAPÍTULO 6 - Referências bibliográficas 76

APÊNDICE (I) - Fenômenos elétricos nas interfaces: a dupla camada..... 80

APÊNDICE (II) - A dupla camada elétrica e a estabilidade coloidal..... 81

APÊNDICE (III) - Análises de DSC..... 82

ABREVIATÖES E NOMENCLATURA

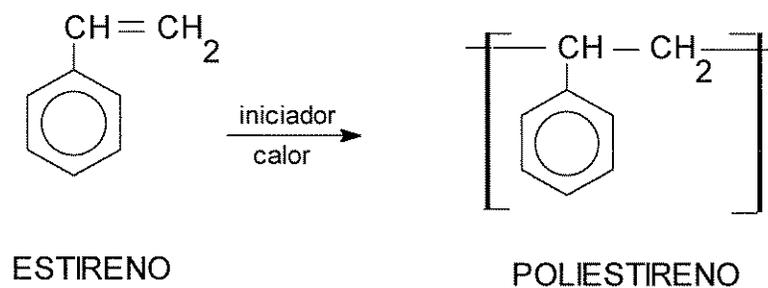
PS	- poliestireno
Tg	- temperatura de transiçãõ vítrea
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Ag	- antígenos
Ab	- anticorpos
M	- monômero
E	- emulsificante
I	- iniciador
-N=N-	- grupo diazo
PDS	- polidiazostireno
DBS-Na	- dodecil benzeno sulfonato de sódio
BSA	- albumina sérica bovina ou soro albumina bovina
PS1	- síntese preliminar
S01 à S05	- sínteses definitivas
PNS	- polinitrostireno
PAS	- poliaminostireno
HEMA	- hidroxietilmetacrilato

CAPÍTULO 1 - Revisão da literatura

1.1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a química de polímeros tem recebido muita atenção no que diz respeito ao desenvolvimento de materiais para aplicação na área médica. As pesquisas têm-se desenvolvido no sentido de se obter polímeros funcionalizados, com determinadas características de superfície que propiciem melhores condições de interação com o meio fisiológico em que eles se encontrem. Assim, técnicas para se obter polímeros ativados na sua superfície, capazes de reagir com proteínas têm sido empregadas através de modificações químicas dos materiais.

Dentre os polímeros que são empregados na área médica, o poliestireno tem recebido especial atenção pois possui algumas propriedades que tornam ampla a sua utilização. Ele tem uma estrutura linear relativamente simples, é apolar, quimicamente inerte, resistente à água e de fácil fabricação. Sua temperatura de transição vítrea (T_g), ou seja, seu comportamento como sólido vítreo ocorre abaixo de 100°C . Acima deste valor, as cadeias do polímero a nível molecular, têm liberdade de rotação, as quais permitem mobilidade de longos segmentos de cadeia. Assim, o polímero torna-se fluido suficiente para ser facilmente processado em diversas formas de uso. Abaixo de T_g o poliestireno é processado mecanicamente. Um esquema simplificado da síntese do poliestireno pode ser representado pela equação 1.



(Eq.1)

O estireno facilmente copolimeriza com uma variedade de outros monômeros dando origem a vários copolímeros como o de estireno-acrilonitrila que apresenta resistência a solventes e o de estireno-anidrido maleico que apresenta resistência ao calor, dentre outros.

O poliestireno pode ter suas moléculas orientadas durante a fabricação resultando num aumento de sua dureza, o que contribui no emprego de suas espumas, usadas como folhas e isolantes em embalagens de alimentos. Pode ainda ser utilizado em meio líquido na forma de emulsão. Por serem amplas as aplicações do poliestireno, por exemplo pelas indústrias de embalagens, eletrônica, ótica, automotiva e de produtos médico-hospitalares dentre outras, este polímero constitui-se num dos sistemas mais investigados no mundo.

Este trabalho, realizado em colaboração com o **Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp**, limitou-se a estudos sobre a polimerização em emulsão do poliestireno objetivando verificar os diâmetros médios das partículas, em função da utilização de diferentes quantidades de emulsificante. e também, verificar o comportamento do látex em testes imunológicos, após funcionalização com grupos diazo, os quais promovem ligação covalente entre o suporte polimérico e antígenos ou anticorpos.

Nos testes imunológicos do tipo aglutinação, as partículas revestidas com antígenos ou anticorpos são aglutinadas na presença de soros ou outros fluidos biológicos contendo os anticorpos ou os antígenos correspondentes. Estas partículas, por serem estáveis, têm grande utilidade em laboratórios de imunologia por poderem ser utilizadas tanto em testes simples e de baixo custo, onde a reação pode ser visualizada a olho nú, como em equipamentos sofisticados capazes de quantificar seu grau de aglutinação. Dada a estabilidade das partículas de poliestireno, estas têm substituído com vantagens as hemácias em testes de aglutinação.

1.2 - HISTÓRICO

O desenvolvimento de imunoreagentes onde antígenos ou anticorpos são imobilizados sobre um suporte polimérico através de ligação covalente, tem recebido uma atenção especial por parte dos pesquisadores desta área, mas vários tipos de suportes foram pesquisados nos quais, antígenos ou anticorpos foram imobilizados tanto via ligação covalente como por adsorção.

Em 1958, por exemplo, Sutherland e Campbell [1] relataram a adsorção de anticorpos em pérolas de vidro. Outros trabalhos como os de Campbell e col. em 1951 [2] e Gurvich e col. em 1961 [3], utilizaram celulose tratada com p-aminobenzila a qual depois de sofrer diazotização reagiu extremamente bem com resíduos de lisina, tirosina e histidina de proteínas, formando azoproteínas em testes imunoenzimáticos (ELISA - Enzyme -Linked Immunosorbent Assay). Mais tarde, Jangerdorff [4] e col. em 1963 e Weetall e Wekely [5] em 1965, trabalharam com adsorção em celulose e bromoacetilcelulose.

Em 1967, Axén e col. [6] e Porath e col. [7], desenvolveram um método geral para acoplamento de proteínas a polissacarídeos insolúveis como a sepharose (agarose) e a sephadex (gel de dextrana). Pérolas destes polissacarídeos foram tratadas com brometo de cianogênio que reagiu com grupos hidroxila do suporte, convertendo-o em um derivado imido-carbonato, pronto para reagir via ligação covalente com os grupos amínicos livres das proteínas.

No ano seguinte, Carpenter e Reesberg [8] trabalharam com a ativação de bentonita com carbodiimida, tornando-a um suporte favorável à ligação covalente. Por sua vez, Engvall e Perlmann [9,10,11] em 1971, utilizaram tubos ocos de nylon, recobertos com antígenos e anticorpos e celulose ativada com brometo de cianogênio.

O uso de **poliestireno** na forma de placas de microtitulação, onde antígenos e anticorpos foram imobilizados por adsorção, apareceu em **1975**, com o trabalho de Voller e col.[12].

Dois anos mais tarde, Kato e col. [13], descreveram a utilização de tubos ocos de silicone na preparação de suportes para ligação de anticorpos por adsorção, o que Cuatrecasas conseguiu trabalhando com gel de acrilamida [14].

Em 1980, Marcipar e col. [15] descreveram a utilização de fitas de poliamida (nylon 6,6) em que antígenos de *Trypanosoma cruzi* foram covalentemente ligados a este suporte. Também em 1980, Hendry e Hermann [16] relataram a utilização deste mesmo polímero para ligação covalente com proteínas, após hidrólise parcial ácida e ligação com glutaraldeído.

O primeiro trabalho nesta área na **Engenharia Química da Unicamp** foi realizado em 1986, por Peres e Bittencourt [17,18] que iniciaram pesquisas de um novo tipo de suporte para imobilização de antígenos e anticorpos via ligação covalente. Este suporte foi investigado pela RELA S.A. para testes rotineiros do tipo ELISA e se constituiu de tecidos de poliéster recobertos com resinas reticuláveis com grupos N-metilol, capazes de reagir covalentemente com grupos funcionais de proteínas, como por exemplo, grupos amino e hidroxila. Atualmente, a maioria dos suportes utilizados para uso em testes imunoenzimáticos ainda são de poliestireno, pois este polímero oferece vantagens como: transparência, fácil processabilidade em diferentes geometrias (placas, discos, pérolas ou partículas de látex) e baixo custo [19].

Partículas de látex de poliestireno, obtidas através de polimerização em emulsão, têm sido amplamente estudadas graças aos avanços na ciência de polímeros, que tem tornado possível produzir látices uniformes, com tamanho, densidade e características de superfície conforme desejado [20]. Elas têm sido empregadas em substituição à utilização de hemácias em reações de aglutinação, para a detecção de antígenos e anticorpos.

1.3 - TESTE DE AGLUTINAÇÃO

Para uma melhor compreensão das reações de aglutinação, torna-se necessário que alguns termos sobre Imunologia, correntemente utilizados neste trabalho, sejam abordados. Para tanto, é de fundamental importância a distinção entre antígenos e anticorpos.

ANTÍGENOS - são definidos por duas características fundamentais:

- a) imunogenicidade - capacidade de induzir uma resposta imune;
- b) antigenicidade - capacidade de reagir especificamente com anticorpos resultantes do estímulo imunogênico.

ANTICORPOS - compreendem um grupo de proteínas comumente referidas como imunoglobulinas (Ig). As imunoglobulinas humanas são divididas em diferentes classes, designadas abreviadamente IgG, IgA, IgD, IgE e IgM caracterizadas por possuírem determinantes antigênicos específicos na sua estrutura. As moléculas de IgG são formadas pela associação de quatro cadeias polipeptídicas , sendo duas cadeias leves (PM 25.000) e duas cadeias pesadas (PM 50.000), ligadas entre si por pontes dissulfeto (-S-S-), como pode ser visto pela figura 1 [21].

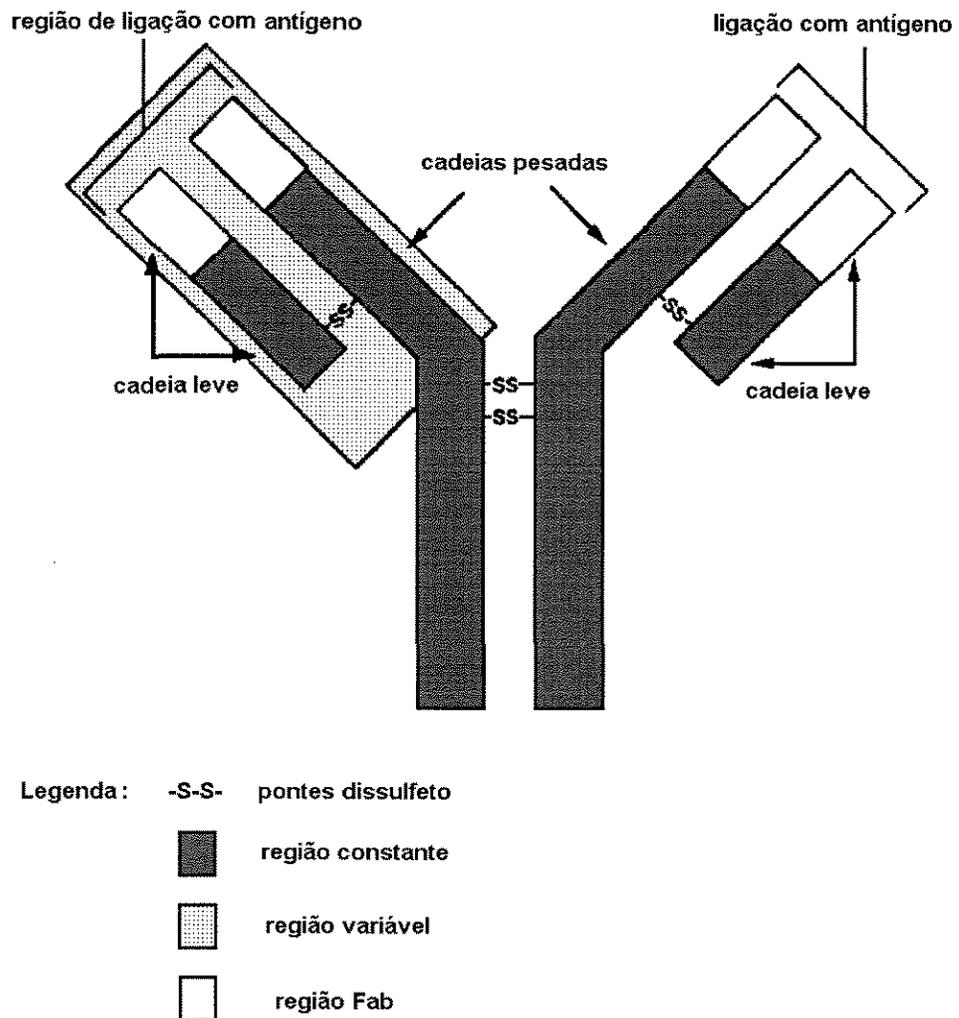


Figura 1: Representação esquemática de uma molécula de IgG [21]

A molécula de IgG possui duas regiões de interação com os antígenos que apresentam grande variabilidade em termos da sequência de aminoácidos. A interação do anticorpo através de seus sítios combinatórios com o antígeno correspondente resulta em uma forma de conjugação conhecida como "**complexo antígeno-anticorpo**" e uma representação desta conjugação pode ser ilustrada pela figura 2.

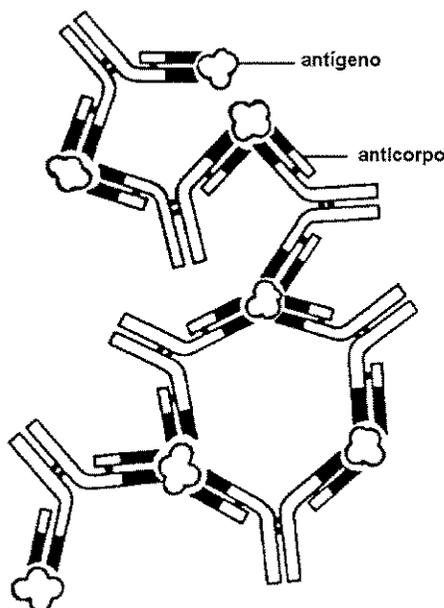


Figura 2: Esquema genérico da formação de um "complexo antígeno-anticorpo"

As interações específicas antígeno-anticorpo são comparáveis àquelas apresentadas por certas reações enzimáticas. Muitas vezes, a simples mudança na molécula antigênica, de um átomo de H ou OH, afeta profundamente a sua capacidade de combinação com anticorpos. Isto facilmente se compreende quando se considera que a interação antígeno-anticorpo ou enzima-substrato, depende de forças intermoleculares não covalentes, que só se exercem eficazmente a distâncias muito curtas. As forças de atração que estabilizam o "complexo antígeno-anticorpo", são uma combinação de forças que incluem pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e das forças de Van der Waals. Assim, a perfeição do encaixe do determinante antigênico aos sítios combinatórios do anticorpo depende da complementaridade espacial de suas estruturas. Quanto mais perfeita for essa complementaridade, maior será a afinidade de interação entre antígenos e anticorpos, o que determina a eficiência do processo.

A interação antígeno-anticorpo dá lugar ao aparecimento de uma série de reações, cujo estudo qualitativo e quantitativo é do domínio da Sorologia [22].

O princípio básico da aglutinação se dá pela formação de pontes de anticorpos que ligam os determinantes antigênicos de partículas adjacentes. Assim, quando uma suspensão de partículas que apresenta determinantes antigênicos à sua superfície é misturada com um soro contendo anticorpos específicos, formam-se aglomerados que sedimentam no fundo do tubo em que se processou a reação, dando origem ao **fenômeno da aglutinação**, descrito por Gruber e Durham no começo deste século.

Este fenômeno se observa com micróbios ou células do tipo eritrócitos ou leucócitos, através dos determinantes naturais existentes na sua superfície resultando numa **aglutinação direta**. Também pode ser observado com células, geralmente eritrócitos, ou partículas inertes do tipo látex, artificialmente revestidas com um antígeno solúvel resultando numa **aglutinação indireta ou passiva**.

Partículas de látex de poliestireno têm sido extensivamente usadas em testes de aglutinação devido às suas características de estabilidade e facilidade de ligação com antígenos ou anticorpos que podem ser adsorvidos ou covalentemente ligados em suas superfícies. Quando estas partículas ou microsferas são recobertas por antígenos ou anticorpos, cujo procedimento é conhecido como sensibilização, elas são especialmente denominadas imunomicrosferas [23] e podem ser ilustradas esquematicamente pela figura 3.

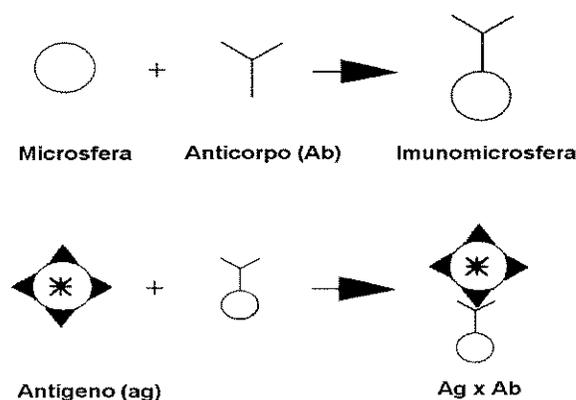


Figura 3: Representação esquemática de uma imunomicrosfera [23]

As técnicas de aglutinação utilizando partículas de látex como suporte, além de serem realizadas em poucos minutos, apresentam grande simplicidade técnica e baixo custo financeiro. Assim, partículas de látex após serem revestidas (ou sensibilizadas) com anticorpos específicos, podem ser utilizadas para detectar os antígenos correspondentes, através de reações de aglutinação [21]. Do mesmo modo, partículas revestidas com antígenos podem ser utilizadas para a detecção de anticorpos. Um esquema desta reação pode ser visto na figura 4.

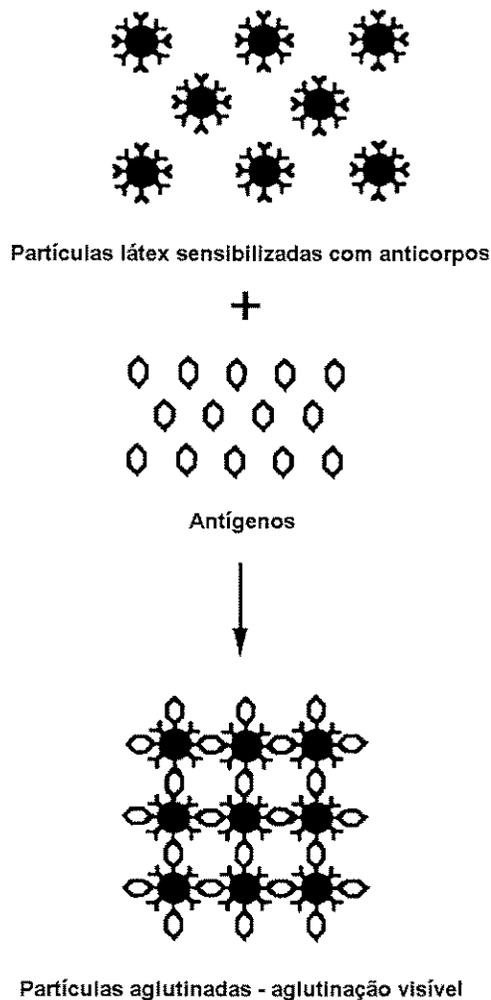


Figura 4: Reação de aglutinação entre partículas de látex sensibilizadas com anticorpos para a detecção de antígenos [21]

1.4 - REVESTIMENTO DAS PARTÍCULAS LÁTEX: ADSORÇÃO E LIGAÇÃO COVALENTE

Desde que Catt e Tregear [24,25] verificaram que as proteínas são capazes de se ligar às superfícies plásticas por adsorção, muitos Kits comerciais foram produzidos. Entretanto, existem algumas desvantagens na técnica de ligação por adsorção, devido a ligação das proteínas às superfícies poliméricas se dar através de interações fracas (não covalentes). Quando partículas de látex são revestidas com antígenos ou anticorpos por adsorção, ocorrem alguns inconvenientes [26,27] dentre os quais salientam-se:

- dessorção: dada a fraca interação por adsorção entre as proteínas e a matriz polimérica não polar, as moléculas adsorvidas ao suporte se desprendem durante as lavagens que fazem parte da etapa de sensibilização; o mesmo ocorre com as reações imunológicas propriamente ditas, afetando a uniformidade da reação, precisão e reprodutibilidade do teste;
- fragilidade da ligação por adsorção: a instabilidade deste tipo de ligação não permite a estocagem do material com segurança.

Na evolução dos testes imunológicos, a maior dificuldade que se verifica é quanto à separação de antígenos e anticorpos em excesso no meio, na etapa de sensibilização. Usualmente tal separação é feita através de lavagens em processos de filtração. Como 70 % dos antígenos ou anticorpos podem ser removidos das superfícies poliméricas [28] por tais lavagens, a precisão e sensibilidade do teste é negativamente influenciada o que compromete seu resultado final e reprodutibilidade.

Com o propósito de se resolver este problema de dessorção, vários métodos têm sido desenvolvidos [15,16,29] onde antígenos ou anticorpos são ligados covalentemente tanto à macro-fases sólidas do tipo pérolas (de 6-7 mm de diâmetro) de vidro, nylon ou poliestireno, como também à microsferas sob a forma de látex polimérico.

1.5 - IMUNOMICROSFERAS: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES

Vários métodos foram desenvolvidos com o objetivo de sintetizar microsferas ideais para cada tipo de aplicação [30]. Durante sua síntese, estas microsferas podem ser modificadas incorporando-se compostos, os quais podem ser fluorescentes, radioativos, magnéticos ou coloridos. Algumas das várias aplicações em testes imunológicos podem ser resumidas na tabela 1.

Tabela 1 - Imunomicrosferas: aplicações em testes imunológicos

APLICAÇÃO	EXEMPLO	IDENTIFICAÇÃO	REF.
DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS AUTO - IMUNES	- artrite reumatóide	- anticorpos contra IgG	31
DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS	- fungo <i>Cryptococcus neoformans</i> no líquido cefalorraquidiano ou soro	- antígenos de <i>C. neoformans</i>	32
	- <i>Salmonella</i>	- antígenos de <i>Salmonella</i>	33
	- estreptolisina: produzida por <i>Streptococcus</i> do grupo B	- anticorpos anti-estreptolisina	34
	- <i>Toxoplasma gondii</i>	- anticorpos contra <i>Toxoplasma gondii</i>	35
DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR DE ENFERMIDADES INFLAMATÓRIAS AGUDAS E TUMORES	- verifica-se aumento de concentração da proteína C- reativa em enfermidades inflamatórias agudas e também em tumores malignos	- anticorpos anti - proteína C-reativa	36
IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS E/OU POPULAÇÕES CELULARES	- microsferas recobertas com anticorpos específicos marcados com materiais fluorescentes (fluoresceína) ou eletrodensos (partículas com ouro ou platina)	- reconhecimento de antígenos celulares ou populações celulares através de microscopia de fluorescência ou microscopia eletrônica	37
SEPARAÇÕES DE POPULAÇÕES CELULARES	- microsferas sintetizadas contendo Fe_3O_4 e marcadas com anticorpos específicos	- separação de populações celulares, por exemplo, linfócitos T e B através de um magneto	38

Para aplicação em imunoenaios, as microsferas precisam apresentar as seguintes características [23]:

- insolubilidade em meio aquoso;
- hidrofiliçidade e densidade próxima à da água para que tenham maior interação com fluidos biológicos;
- presença de grupos funcionais adequados capazes de se ligar covalentemente com antígenos ou anticorpos.

Uma outra característica muito importante a ser considerada, diz respeito ao tamanho das partículas. Para utilização em testes de aglutinação, é importante que as partículas possuam homogeneidade em tamanho, para que propiciem condições uniformes de reação. E tenham um tamanho tal que durante as etapas de lavagens, não obstruam as membranas de filtração.

Poucos são os métodos que produzem microsferas com uma estreita distribuição de tamanho, por exemplo da ordem de 2 μm , como conseguido por Wang e Zhang em 1991 [39]. Segundo estes autores, polimerização por emulsão ou dispersão produzem microsferas com tamanhos abaixo ou próximos de 1 μm , enquanto que polimerização por suspensão produz partículas com ampla distribuição de tamanhos. Rembaum e col. [23], através de polimerização em emulsão, verificaram que esta se constitui na técnica mais conveniente para síntese de microsferas com diâmetros na faixa de 0,01 a 8 μm . O uso da polimerização em emulsão para preparar látices poliméricos com estreita distribuição de tamanho de partículas, teve como pioneiro o trabalho de Van der Hoff e col. [40,41,42] no final da década de 60.

1.6 - POLIMERIZAÇÃO EM EMULSÃO

O termo "Polimerização em Emulsão" usualmente refere-se a uma reação na qual partículas muito pequenas do polímero são formadas na fase aquosa. O produto é um látex que consiste de partículas esféricas de polímero dispersas na água com dimensões tipicamente coloidais [43,39]. Como a maioria destes sistemas está numa faixa de tamanho de 1 nm a 1 μm [44] eles têm sido adequadamente denominados "**Polímeros Coloidais**" por se constituir num sistema coloidal estável, invariavelmente fluido, no qual a fase dispersa é o polímero.

A seguir será feito um breve relato histórico sobre os primeiros trabalhos utilizando polimerização em emulsão e as literaturas consultadas que constituíram o embasamento teórico sobre este assunto neste trabalho, encontram-se citadas nas referências 44,45,46,47,48 e 49.

1.6.1 - BASES TEÓRICAS

Dinsmore em 1929 foi, historicamente, um dos primeiros a registrar seu trabalho na língua inglesa sobre polimerização em emulsão (U.S. Patent 1,732,795), muito embora haja registro de uma outra patente alemã, anterior a esta (German Patent 250, 690,1909, Farbenfabrik Bayer A.G.). Dinsmore usou ácido oléico e caseína como emulsificantes na polimerização em emulsão de butadienos, num trabalho conduzido pacientemente, cuja reação foi conduzida por um período de 6 meses na faixa de 50-70°C. Ainda hoje o termo "polimerização em emulsão" continua sendo usado para descrever processos que iniciam com uma emulsão do monômero e termina com uma dispersão do polímero.

Em 1932, Harkins e McBain, independentemente, observaram que partículas de polímero se formam a partir de monômeros de baixa solubilidade em água, mesmo na ausência de emulsificantes.

Fikentscher em 1937, notou que mesmo na presença de micelas de emulsificante, a fase aquosa, e não as gotas de monômero, era o provável lugar da polimerização.

Mais tarde, entre 1943-1945, em trabalhos quantitativos Heller e Klevens demonstraram o relacionamento entre a concentração de emulsificante e o número de partículas formadas, ambos, acima e abaixo da concentração micelar crítica (CMC).

Harkins em 1947, publicou uma série de estudos sobre estireno e isopreno, ambos na presença e ausência de micelas, observando que a taxa de polimerização foi muito maior quando as micelas estavam presentes. Com base nesta evidência foi proposto que o local de polimerização fosse a micela.

Na polimerização em emulsão, geralmente estão presentes 4 componentes: monômero, água, iniciador e um emulsificante (surfactante).

Monômero (M) - é distribuído no sistema em emulsão, geralmente como gotas reservatórios de monômero, ou dissolvido parcialmente na fase aquosa. Considerando que o monômero encontra-se na sua maior parte como gotas estabilizadas pelo emulsificante e também em polimerização dentro das micelas, pode-se classificar o sistema consistindo de 3 tipos de partículas:

- gotas de monômero: reservatórios;
- micelas inativas: ainda sem o iniciador;
- micelas ativas: em polimerização.

No momento em que adiciona-se o monômero na água, este fica disperso no meio na forma de partículas estabilizadas pelas moléculas de emulsificante que adsorvem à sua superfície, formando micelas.

Emulsificante (E) - é parcialmente dissolvido na água, mas a maior parte de suas moléculas se agregam formando micelas. As terminações hidrofóbicas



de suas moléculas ficam orientadas para o interior da micela e as terminações hidrofílicas voltadas para a água.

A formação das micelas ocorrerá quando a concentração do emulsificante exceder a chamada "concentração micelar crítica", encontrando-se em excesso no meio.

Uma representação esquemática de uma gota de monômero estabilizada pela agregação das moléculas de emulsificante pode ser vista pela figura 5.

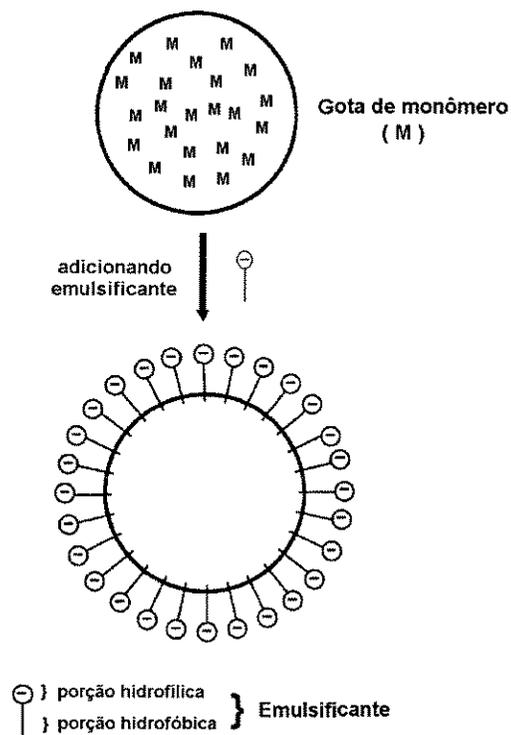


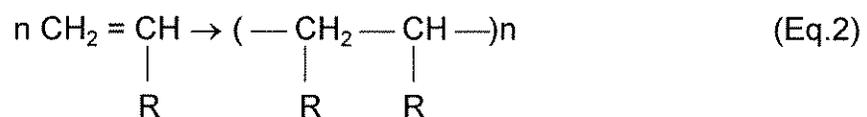
Figura 5: Representação esquemática da formação de uma micela e sua estabilização pela ação do emulsificante [45]

Iniciador (I) - na maioria das vezes são utilizados iniciadores solúveis na fase aquosa, podendo também ser utilizados iniciadores solúveis na fase orgânica, se for este o meio dispersante. As partículas de látex são obtidas usando-se geralmente, persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) como iniciador, o qual produz 2 íons sulfato radicais.

1.6.1.1 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DAS CADEIAS

Polímeros em emulsão são preparados a partir de monômeros que podem ser polimerizados através de um mecanismo via radical livre. Estas polimerizações são rápidas e podem ser caracterizadas por etapas de iniciação, propagação e terminação das cadeias.

A etapa de terminação pode ocorrer por 2 mecanismos: terminação por combinação ou terminação por desproporcionamento. Durante uma reação de polimerização um número (n) de monômeros, por exemplo vinílicos, reagem para formar uma cadeia com (n) unidades no seu comprimento.



Esta reação pode ser representada através de várias fases, de acordo com o seguinte esquema:

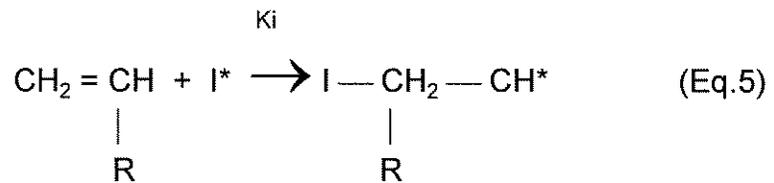
i) **Iniciador (I)** - geralmente utiliza-se um peróxido que ao ser termicamente induzido, se decompõe formando 2 radicais catalíticos I* ; é a etapa mais lenta.



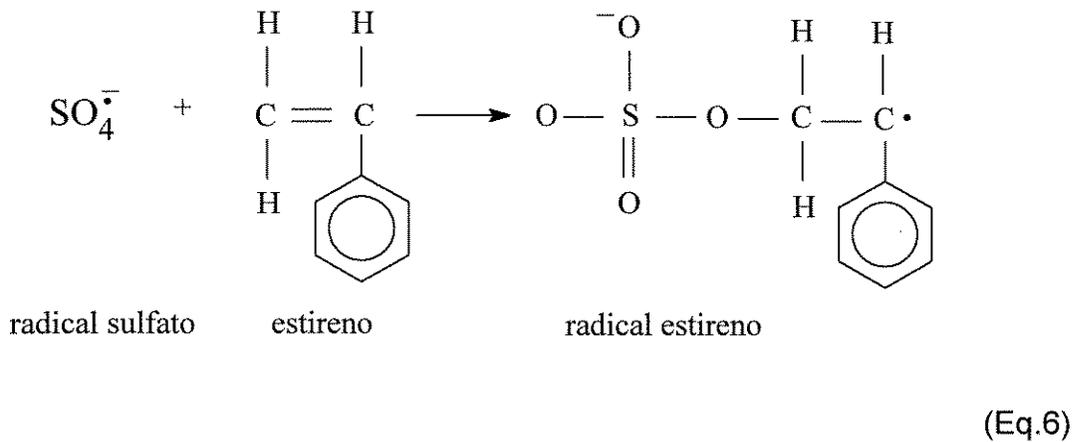
No caso de emulsões de poliestireno, para se obter um látex, geralmente é utilizado persulfato de potássio e os radicais sulfato são gerados termicamente de acordo com a equação 4.



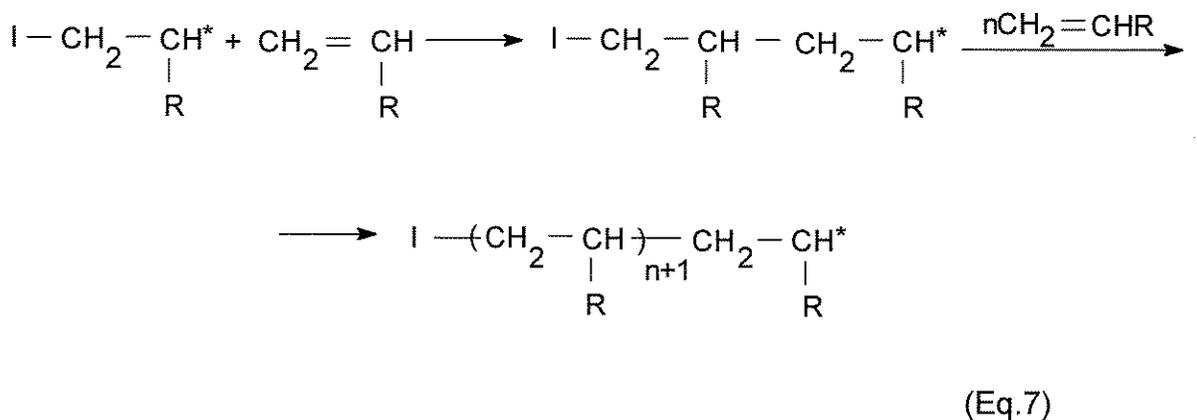
ii) **Iniciação** - o primeiro radical (I^*) reage com uma molécula de monômero iniciando a reação de polimerização, de acordo com a equação 5.



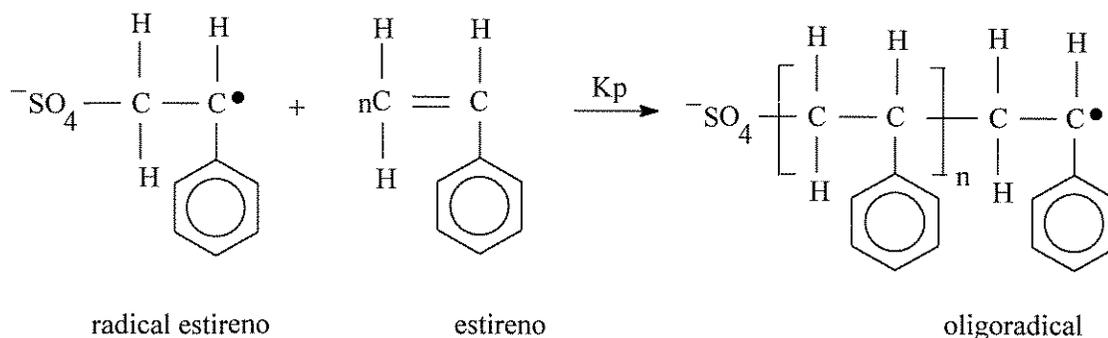
A polimerização ocorre quase que exclusivamente no interior das micelas onde o iniciador reage com o monômero de estireno dando origem a um radical estireno.



iii) **Propagação** - o radical livre formado reage com outra molécula de monômero continuando o crescimento da cadeia.



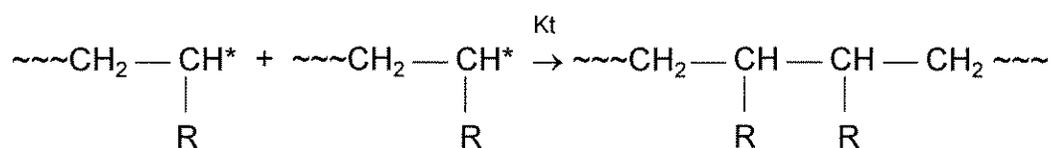
De acordo com a teoria proposta por Harkins e melhorada por Smith e Ewart, o primeiro estágio de propagação numa emulsão também acontece na fase aquosa produzindo oligoradicaís, conforme demonstra a equação 8.



(Eq.8)

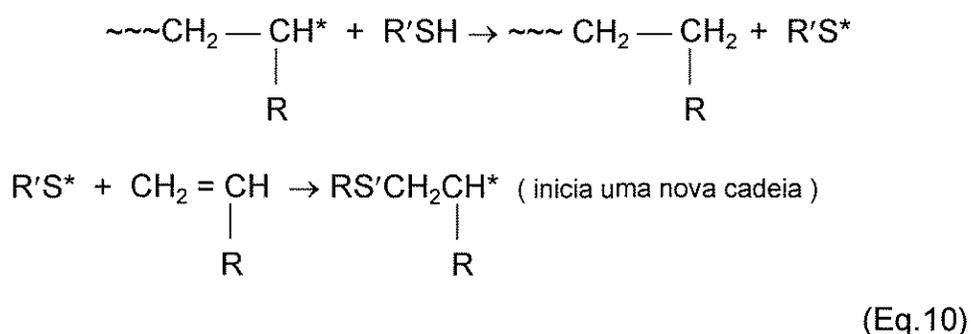
Quando o crescimento da cadeia do oligoradical termina, ele possui cerca de 3 a 5 unidades de estireno. Como sua solubilidade é semelhante à do estireno, ele migra para dentro da micela e continua sua propagação reagindo com as moléculas de estireno já presentes na micela.

iv) Terminação - pode ocorrer por 3 mecanismos; um deles é a reação bimolecular entre 2 radicais poliméricos, também conhecida como terminação por recombinação e resulta na formação de uma única molécula.

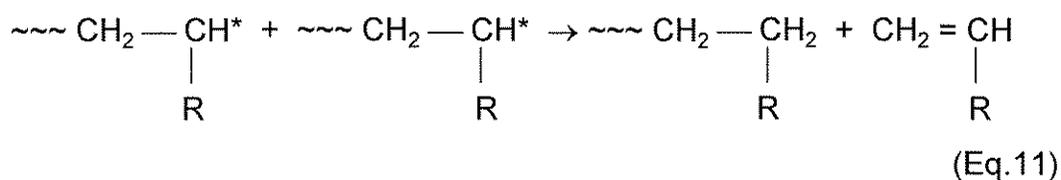


(Eq.9)

A terminação pode também ocorrer por transferência de cadeia, pela abstração de um átomo ou grupo, produzindo uma cadeia terminada e uma nova espécie como radical livre que reagindo com monômeros disponíveis, inicia uma nova cadeia. Estas reações ocorrem principalmente na presença de agentes redutores de radicais, representado genericamente por R'SH abaixo.



Também pode terminar pela desproporção de 2 radicais, levando à obtenção de 2 cadeias terminadas (equação 11).



Segundo a teoria de Smith e Ewart, de um ponto de vista estatístico, somente 50 % das partículas conterão cadeias em crescimento, assim :

$$R^* = N / 2 \quad (\text{Eq.12})$$

onde N é o número de partículas por unidade de volume.

Quanto à taxa de polimerização (R_p), esta dependerá da concentração do monômero (M) na partícula e será proporcional ao número de micelas ativas (N), podendo ser afetada pela escolha do monômero, do qual depende o valor da taxa de propagação (K_p). Assim, R_p pode ser expressa por:

$$R_p = \frac{N \times K_p \times [M]}{2} \quad (\text{Eq.13})$$

Uma vez que o número de micelas depende da concentração de emulsificante, podemos notar pela figura 6 que na polimerização por emulsão do estireno, a maiores quantidades de emulsificante, aumenta-se a taxa de polimerização, pois aumentam-se os núcleos de reação.

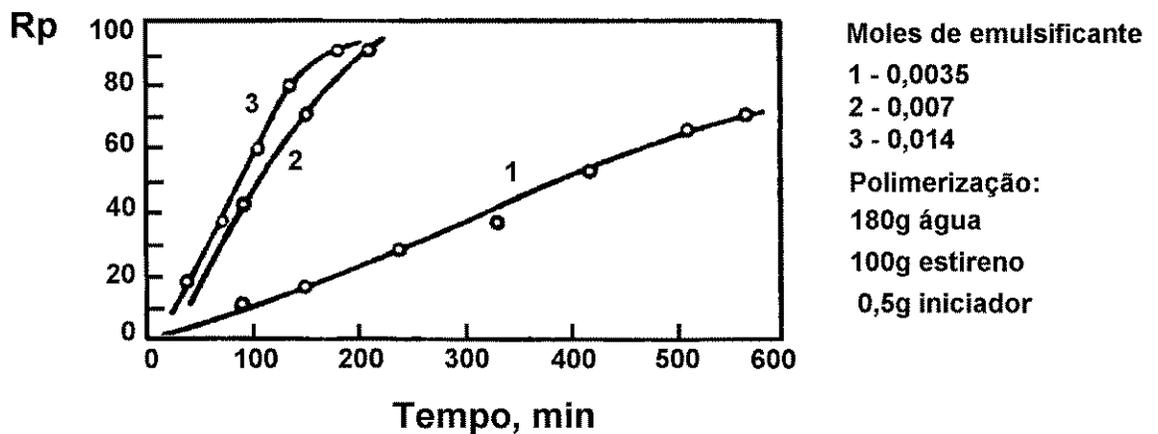


Figura 6: Polimerização do estireno a diferentes concentrações de laureato de potássio[47]

Quando o número de partículas se tornar constante a taxa de polimerização ficará linear, porém a altas conversões esta taxa decrescerá, bem como decrescerá a concentração do monômero e a polimerização será encerrada quando cessar a entrada de radicais iniciadores nas partículas.

1.6.1.2 - ETAPAS DO PROCESSO

Na polimerização em emulsão quando adiciona-se monômero na água, suas gotas ficam dispersas no meio e são estabilizadas pela ação do emulsificante, formando micelas. Cada micela consistirá de 50 a 100 moléculas de emulsificante, com diâmetro variando entre 0,1 a 0,3 μm , contudo, o número de micelas bem como seu tamanho dependerá da quantidade de emulsificante usada e agitação do meio. Quanto maior a concentração de emulsificante, menores e em maior número serão as micelas.

Num típico sistema de polimerização por emulsão, as gotas de monômero geralmente têm tamanhos da ordem de 50 - 5000 μm , enquanto as micelas contendo monômero são bem menores com cerca de 0,025 μm . A concentração das micelas é da ordem de 10^{18} / ml e a concentração das gotas de monômero varia de 10^{10} a 10^{11} / ml, assim, esta diferença evidencia um total de áreas superficiais das micelas maior que o das gotas de monômero.

Na iniciação da polimerização, fase também conhecida como nucleação, os radicais livres formados pela decomposição do iniciador, podem facilmente penetrar as micelas porque estas possuem uma estrutura bem espaçada na superfície. A difusão do monômero para o interior das micelas ocorre pois o meio, no interior das mesmas é muito similar ao fluido hidrocarboneto e no caso do estireno, este é muito mais solúvel em hidrocarbonetos do que na água.

Um radical que se difundiu até uma micela através da fase aquosa, ao encontrar as moléculas de monômero, dá início à polimerização no interior desta micela. Contudo, estes radicais ou oligoradicais, podem iniciar a polimerização nas gotas de monômero ou em moléculas deste que se encontrem parcialmente solubilizadas na fase aquosa.

Considerando que existem em emulsão muito mais micelas do que gotas de monômero, o total de superfícies de micelas é muito maior que o total de superfícies das gotas de monômero. Como a concentração de monômeros é bem maior no interior das micelas, a probabilidade que a polimerização ocorra no interior das micelas será maior.

A polimerização por emulsão tem seu processo comumente dividido em 3 estágios: o de iniciação, crescimento das partículas e terminação quando as partículas se constituem numa fase sólida.

ESTÁGIO I - estágio de iniciação ou nucleação, onde micelas de emulsificante são formadas e o número de partículas cresce à medida que ocorre difusão de monômero e radicais para dentro das micelas. À medida que as micelas são formadas, o emulsificante livre na solução vai sendo consumido e este estágio é considerado encerrado quando todas as micelas de emulsificante tiverem desaparecido. Geralmente estas micelas desaparecem durante os primeiros 10 - 20 % de conversão. Este estágio pode ser ilustrado conforme figura 7, onde pode-se observar o sistema composto por uma fonte de monômero, micelas de emulsificante e micelas em polimerização.

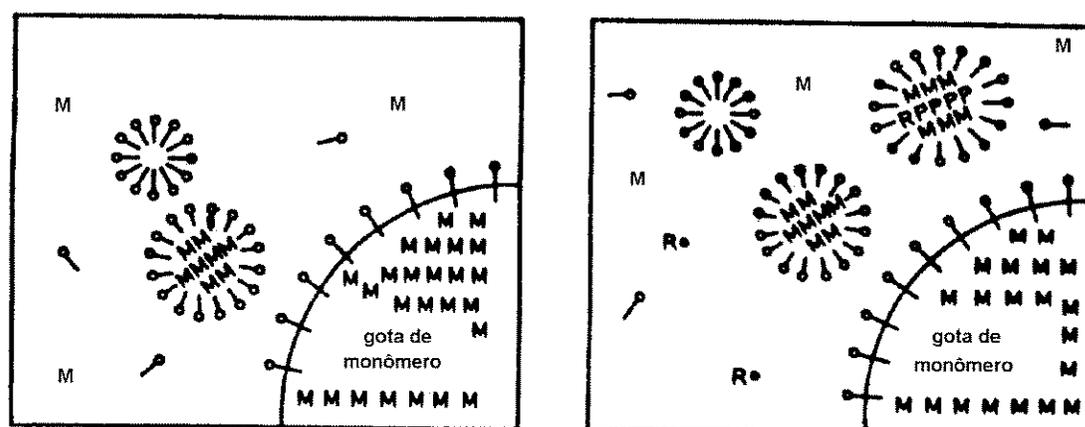


Figura 7: Nucleação - formação de micelas e estágio inicial da polimerização [48]

ESTÁGIO II - é caracterizado pelo crescimento das partículas. Uma vez que é cessado o estágio de nucleação onde todo o emulsificante é consumido, o número de partículas (N) passa a ser constante. O monômero em solução se difunde para dentro das micelas tendendo a um equilíbrio, pois geralmente ele é mais solúvel no seu polímero do que na água. Também ocorre diminuição de monômero nas micelas ativas devido à polimerização, resultando numa redução das gotas de monômero em solução.

Num crescimento competitivo, partículas grandes podem absorver mais monômeros que partículas pequenas, o que implica num aumento de volume destas partículas. Embora isto resulte num aumento de volume, o aumento de diâmetro não é relativamente tão grande; assim, os diâmetros finais não são tão diferentes, resultando numa estreita distribuição de tamanhos.

Um outro fato é que o total de áreas superficiais das partículas pequenas é bem maior que o das partículas grandes. Deste modo as partículas menores tendem a absorver mais monômero, crescendo mais rapidamente, o que contribui para que o sistema seja monodisperso.

O crescimento das partículas na polimerização também pode se dar via coalescência das partículas já existentes. Por exemplo, se duas partículas estiverem insuficientemente estabilizadas, elas podem colidir e coalescer desde que sejam partículas de monômero/polímero fluidas, resultando numa única partícula maior. Neste estágio de crescimento a conversão é de cerca de 20-60 % e pode ser representado pela figura 8 quando não existem mais micelas inativas.

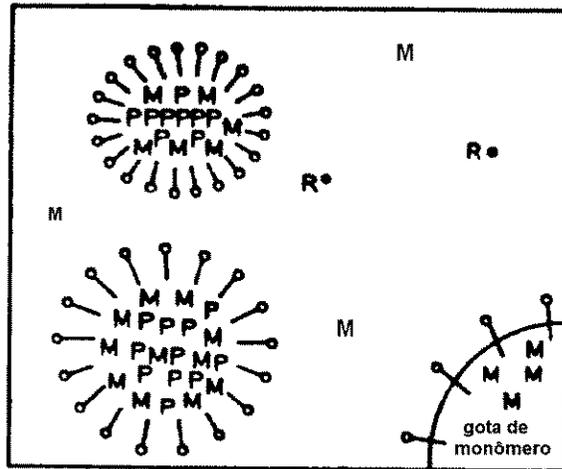


Figura 8: Crescimento das partículas em polimerização [48]

ESTÁGIO III - começa quando as gotas do monômero em solução desaparecem. Isto geralmente ocorre a 60 - 90 % de conversão e é caracterizado por um rápido decréscimo da concentração de monômero na fase aquosa devido estar polimerizado no interior das partículas. O porque da polimerização ocorrer no interior das partículas e não nas gotas de monômeros em solução pode ser respondido considerando as áreas superficiais relativas e o número de cada espécie envolvida. Desde que as gotas de monômero estejam com tamanho da ordem de 50 - 5000 μm e as micelas com cerca de 0,025 μm , o número total de área superficial das micelas excederá amplamente ao número referente ao monômero, então, a probabilidade de um radical gerado na fase aquosa atingir uma micela é muito maior que a de atingir uma gota de monômero. Assim, as micelas se constituem no local preferido ou mais provável de acontecer a polimerização.

Numa reação típica, as relações entre micelas e gotas de monômero podem ser mostradas na tabela 2.

Tabela 2: Relação entre micelas e gotas de monômero

	Nº / g EMULSÃO	ÁREA SUPERFICIAL TOTAL (cm ² / g emulsão)
Gotas de monômero	$\cong 10^{6-9}$	$3 \times 10^{2-3}$
Micelas	$\cong 10^{17}$	3×10^6

Este Estágio III, quando a taxa de polimerização cai à medida que diminui a concentração do monômero na partícula, pode ser ilustrado pela figura 9 que representa uma conversão de aproximadamente 100 %.

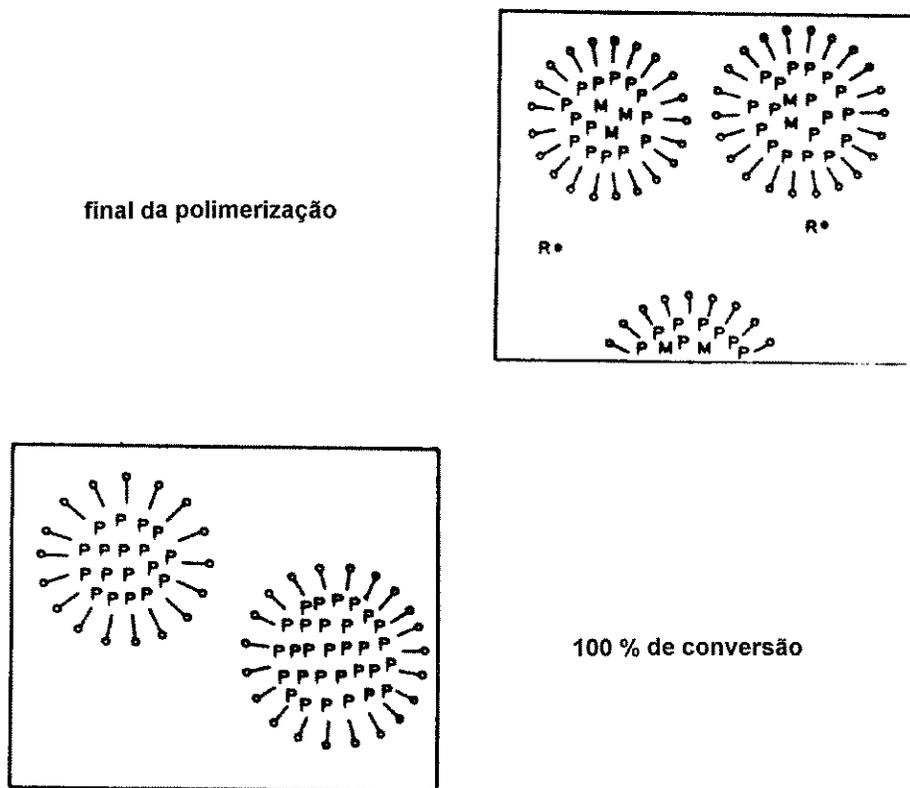


Figura 9: Terminação - estágio final da polimerização [48]

1.6.1.3 - LÁTICES: ESTABILIDADE COLOIDAL

As características pertinentes à região interfacial entre as partículas e o meio dispersante, incluem a natureza e a concentração de grupos funcionais que podem ser quimicamente ligados na superfície das partículas. Neste caso, as propriedades de superfície são importantes na determinação do comportamento coloidal dos látices, estando tais propriedades relacionadas ao método empregado na sua preparação. Estas propriedades frequentemente dependem:

- de grupos provenientes do iniciador usado;
- de surfactantes adsorvidos ou enxertados;
- de polímeros adsorvidos ou enxertados,
particularmente aqueles solúveis no meio de dispersão.

Num meio altamente ionizante, por exemplo a água, grupos ácidos ou básicos, existem na sua forma ionizada em contato com a superfície das partículas, tornando-as eletricamente carregadas por adsorção dessas espécies carregadas. A condição de eletroneutralidade é mantida pelo balanço de cargas entre a superfície do látex e os íons de sinal contrário presentes no meio, formando em torno da partícula a chamada dupla camada elétrica (apêndice I), na qual é estabelecido um equilíbrio entre as forças eletrostáticas como mostra a representação da figura 10.

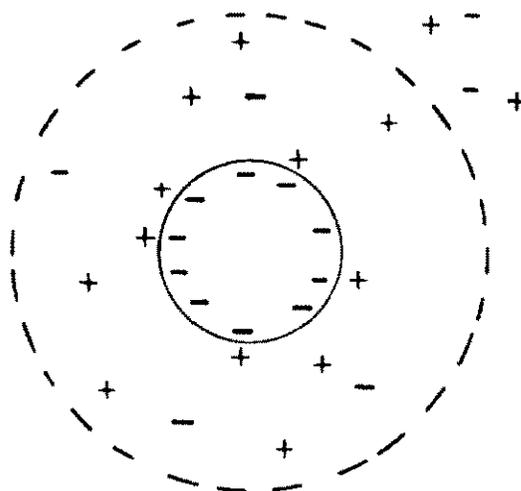


Figura 10 : Ilustração de uma microsfera polimérica carregada negativamente formando uma dupla camada elétrica pela influência de forças eletrostáticas. A linha tracejada indica que a região das forças eletrostáticas pode se estender muito além do tamanho físico das partículas [49]

Quando os látices são preparados em meio não aquoso, em hidrocarbonetos por exemplo, grupos carregados não mais se produzem, não se constituindo este em um meio prático de estabilização das partículas formadas. Sob estas condições, cadeias poliméricas solúveis no meio de dispersão podem ser enxertadas ou adsorvidas na superfície das partículas, ficando estas cadeias não carregadas, extendidas para o interior do solvente como mostra a figura 11.

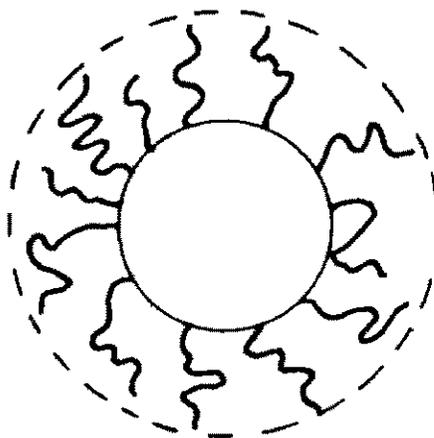


Figura 11: Ilustração de uma partícula de látex não carregada, com cadeias poliméricas adsorvidas ou enxertadas em sua superfície, como se fossem filamentos [49]

A extensão das cadeias poliméricas enxertadas ou adsorvidas a partir da superfície das partículas, determina a distância em que uma partícula pode começar a interagir estericamente com outra, formando o chamado sistema estericamente estabilizado. Um exemplo típico é o uso do ácido 12-hidroxiesteárico que estabiliza partículas de poli-metilmetacrilato em dodecano

Uma combinação de forças eletrostáticas e efeitos estéricos pode ser feita e empregada grafitizando-se cadeias de polieletrólitos à superfície das partículas de látex, como pode ser visto pela representação da figura 12.

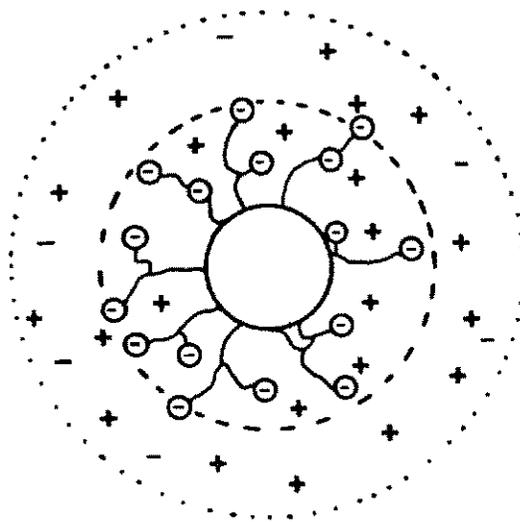


Figura 12: Representação de uma partícula de látex com cadeias de polieletrólitos enxertadas na superfície das partículas [49]

A partir desta descrição qualitativa sobre as partículas de látex, pode-se reconhecer as origens de 3 forças básicas que devem ser consideradas no entendimento do comportamento das dispersões tanto em meio aquoso como não aquoso. Podem ser reconhecidas como:

- efeitos eletrostáticos: geralmente repulsivos, apesar de cargas opostas sobre as partículas poderem induzir à atração;
- efeitos estéricos: resultantes da geometria e conformação de moléculas adsorvidas ou enxertadas;
- efeitos de solvatação: resultantes da organização das moléculas de solvente próximas da interface ou entre as cadeias das macromoléculas adsorvidas.

Numa tentativa de se resumir as propriedades dos látices em meio aquoso na presença de eletrólitos, podem ser observadas no esquema da figura 13 algumas características quanto à estabilidade dos colóides (apêndice II).

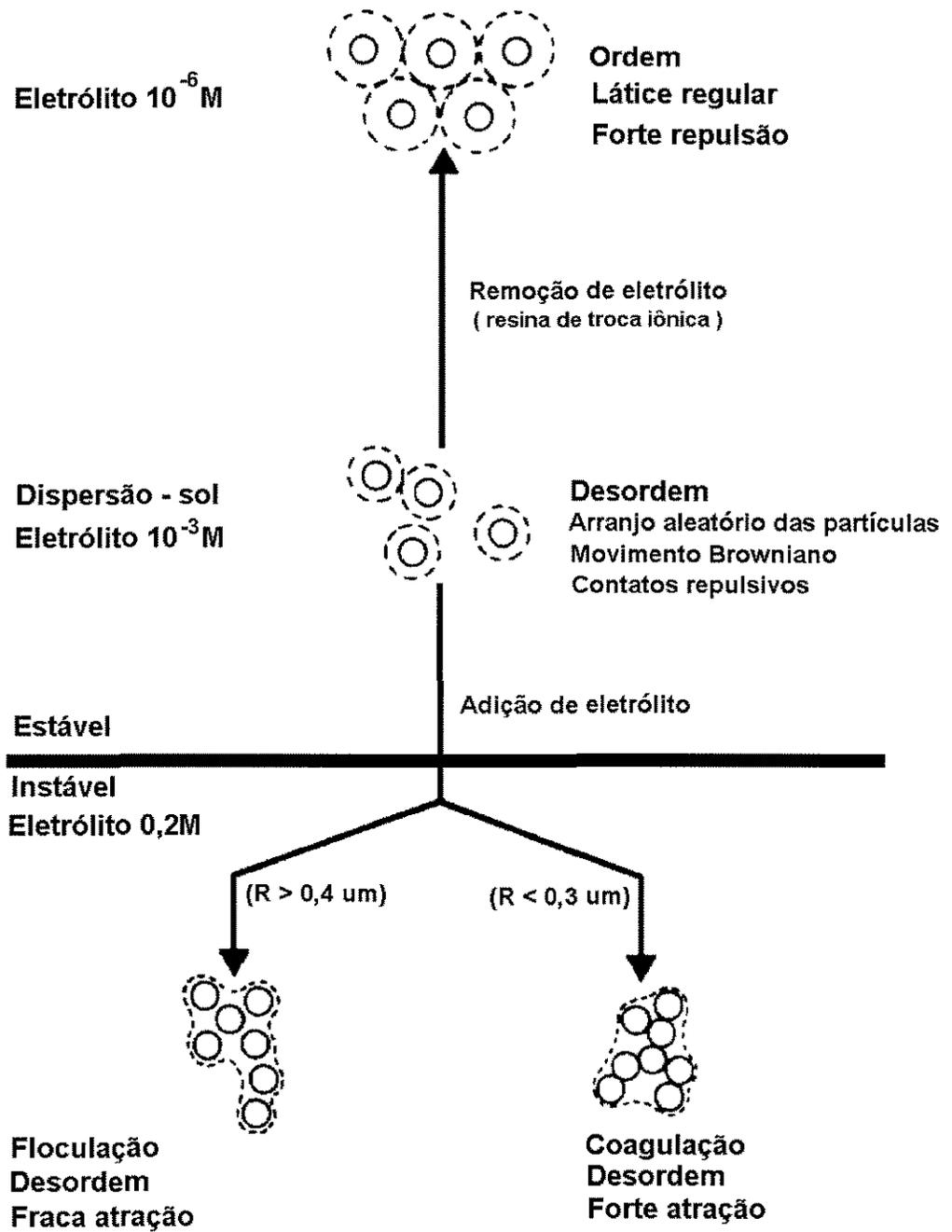


Figura 13: Esquema das propriedades dos látices em meio aquoso [49]

À concentrações intermediárias de eletrólitos ($\cong 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) e à baixa fração de volume da fase dispersante, as partículas carregadas assumem posições aleatórias no sistema e sofrem contínuo movimento Browniano com contatos repulsivos quando as partículas se aproximam umas das outras. Se, a concentração de eletrólitos é reduzida para cerca de $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, o que aumenta a faixa de repulsão eletrostática, ou, se a concentração de partículas é aumentada, uma situação tal é atingida onde as partículas devem manter contatos repulsivos por um longo período de tempo. Consequentemente, um arranjo ordenado das partículas é estabelecido de forma que as mesmas se situam em posições bem separadas como nos latices cristalinos, ou seja é formado um arranjo do tipo "cristal líquido".

Frequentemente, a distribuição do tamanho das partículas é estreita e o termo "monodisperso" é usado para descrever latices deste tipo, os quais mostram coloração brilhante.

A mudança de estabilidade para instabilidade tem sido estudada por muitas gerações de cientistas, desde o final do século passado quando Schulze (1882 - 1893) e Hardy (1900) já investigavam este fenômeno. Hoje, explicações sobre as interações entre partículas estão baseadas de forma quantitativa numa teoria proposta por Derjaguin e Landau (1941) e Verwey e Overbeek (1948), denominada Teoria DLVO em homenagem aos 4 autores, que, entretanto não será estudada neste trabalho.

Em 1970, Dunn e Chong, demonstraram que a adsorção de emulsificante é o fator mais importante na determinação da densidade de cargas superficiais nas partículas determinando então seu tamanho final. Casos onde a polimerização é realizada na ausência de emulsificantes têm sido considerados por Goodwin e colaboradores (1978), com base em que as unidades particuladas formadas inicialmente, contêm somente um pequeno número de cadeias que possuem baixa carga superficial e do ponto de vista coloidal são instáveis.

Recentemente, Kuo e Chen [50] desenvolveram uma pesquisa muito interessante sobre o uso de emulsificantes poliméricos e monoméricos na polimerização por emulsão do poliestireno, bem como com iniciadores inorgânicos ($K_2S_2O_8$) e orgânicos (AIBN). Seus resultados mostraram que quando o emulsificante polimérico é utilizado, pequenas partículas são formadas, as quais são completamente diferentes das obtidas quando surfactantes convencionais e iniciadores inorgânicos são usados para a síntese. Também foi verificado que partículas menores e mais uniformes são obtidas ao se utilizar o iniciador inorgânico. Ainda neste trabalho ficou evidente que é possível se obter uma distribuição bimodal de partículas quando a síntese é feita tanto na presença de emulsificante polimérico quanto de iniciador orgânico (AIBN).

1.7 - FUNCIONALIZAÇÃO: MODIFICAÇÕES QUÍMICAS PARA LIGAÇÕES COVALENTES

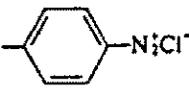
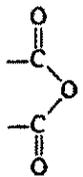
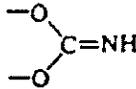
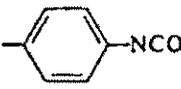
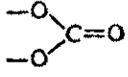
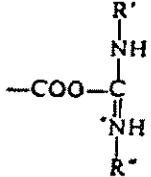
Nos testes imunológicos, assim como na imobilização de enzimas, os materiais poliméricos, por exemplo o poliestireno, utilizados como suportes, não possuem grupos reativos na sua superfície, havendo portanto a necessidade de serem ativados via funcionalização.

Em geral, látices apresentando homogeneidade em tamanho de partícula e com grupos funcionais sobre sua superfície, têm encontrado muita utilidade na química de colóides e na bioquímica [51,52]. Tais látices podem ser preparados através de modificações químicas, como no caso dos suportes poliméricos utilizados em imobilização de enzimas. As reações mais comuns que promovem ligação covalente entre polímeros e proteínas e que são usadas em imobilização de enzimas [53], são:

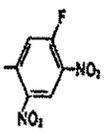
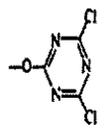
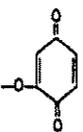
- diazotização; formação de ligação amida; alquilação e arilação; formação de base de Schiff; reação de Ugi; reação de amidação; reação de troca tiol-dissulfeto; interação enzima-mercúrio e ligação induzida por irradiação gama.

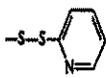
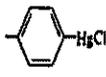
Através destas reações, determinados grupos funcionais são introduzidos nos suportes tornando-os ativados para reagir com proteínas. Os principais grupos funcionais envolvidos em imobilização de enzimas que favorecem ligação covalente, estão demonstrados na tabela 3 e podem ser citados como exemplos de ligação polímero-proteína.

Tabela 3: Grupos funcionais que fazem ligação covalente com proteínas [53]

Grupo funcional	grupos reativos das proteínas	tipo de ligação
 (sal diazônio)	$-NH_2$ $-SH$	ligação diazo
 (anidrido ácido)	$-NH_2$	ligação peptídica
$-CH_2CON_3$ (acil azida)	$-NH_2$ $-SH$	ligação peptídica
 (imidocarbonato)	$-NH_2$	ligação peptídica
$-R-NCS$ (isotiocianato)	$-NH_2$	ligação peptídica
 (isocianato)	$-NH_2$	ligação peptídica
$-CH_2COCl$ (acil cloreto)	$-NH_2$	ligação peptídica
 (carbonato cíclico)	$-NH_2$	ligação peptídica
 (o-acilisouréia)	$-NH_2$	ligação peptídica

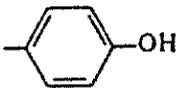
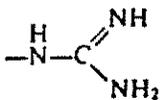
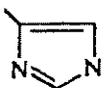
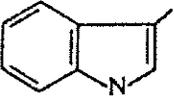
continuação da tabela 3:

$\text{---COO---C=CHCONHC}_2\text{H}_5$  <p>(reagente de Woodward)</p>	---NH_2	ligação peptídica
 <p>(m-fluorodinitroanilina)</p>	---NH_2	arilação
 <p>(triazinil)</p>	---NH_2	arilação
$\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---SO}_2\text{---CH=CH}_2$ (vinilsulfonil)	---NH_2 ---SH ---OH	alquilação
 <p>(ceto vinil)</p>	---NH_2 ---SH ---OH	arilação
---CHO (aldeído)	---NH_2	formação de base de Schiff
	$\text{---CO}_2\text{H}$ ---NH_2	reação de Ugi

$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{---C---OC}_2\text{H}_5 \\ \text{(imidoester)} \end{array}$	---NH_2	amidação
---CN (cianidino)	---NH_2	amidação
 <p>(resíduo dissulfeto)</p>	---SH	tiol-dissulfeto
 <p>(derivado de mercúrio)</p>	---SH	interação enzima-mercúrio
---NH_2 (amino)	---NH_2 $\text{---CO}_2\text{H}$	ligação peptídica
---CONHNH_2 (acilhidrazina)	---NH_2 $\text{---CO}_2\text{H}$	ligação peptídica

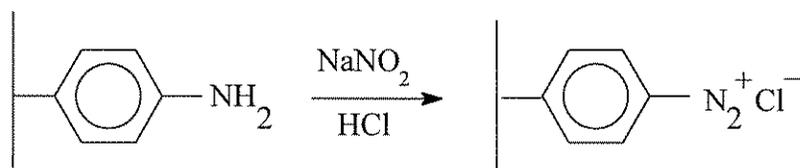
Os grupos funcionais mais comuns das proteínas que são envolvidos em ligações covalentes com polímeros, incluem: amino e carboxil terminais; fenólicos da tirosina; mercapto da cisteína; hidroxil da serina, treonina e tirosina e imidazol da histidina, conforme relacionados na tabela 4.

Tabela 4: Principais grupos funcionais das proteínas que fazem ligação covalente com polímeros [53]

$-\text{NH}_2$	grupos amino terminais da L-Lys
$-\text{SH}$	grupos tiol da L-cys
$-\text{COOH}$	grupos carboxílicos terminais
	grupos fenólicos da L-Tyr
	grupos guanido da L-Arg
	grupos imidazol da L-His
$-\text{S}-\text{S}-$	pontes dissulfeto da L-cistina
	grupos indol do L-trp
$\text{CH}_3-\text{S}-$	grupos tioeter da L-Met
$-\text{CH}_2\text{OH}$	grupos hidroxil da L-Ser e L-Thr

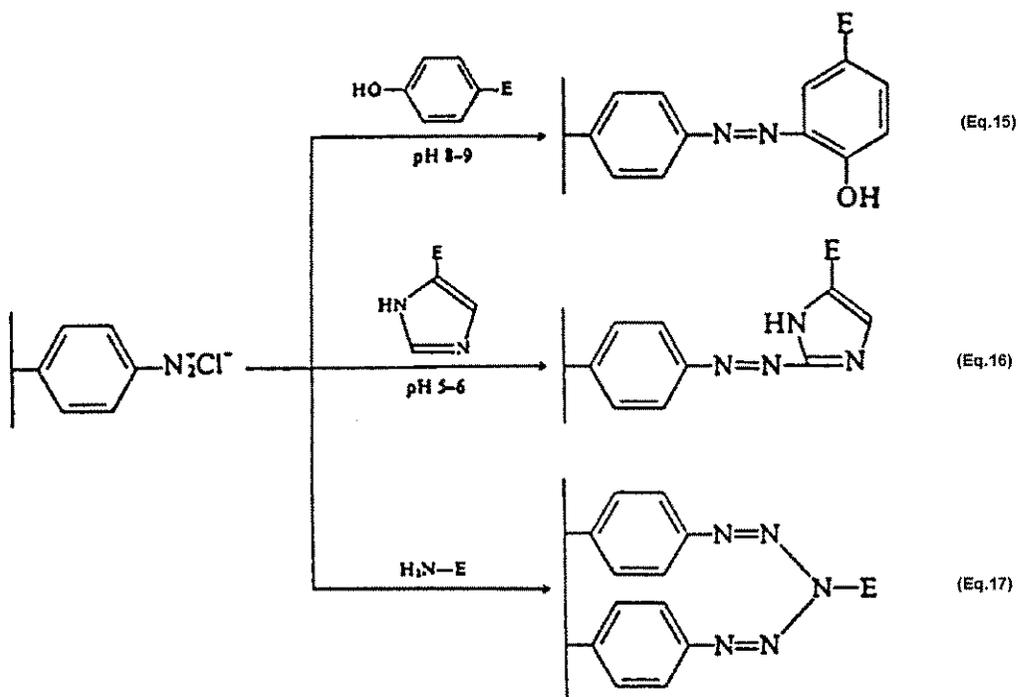
Historicamente, o poliestireno foi o primeiro polímero sintético a ser usado em imobilização de proteínas. Para utilização em reações de aglutinação, microsferas de poliestireno têm sido os sistemas mais amplamente investigados porque além de rígidas são estáveis. Contudo, devido o poliestireno ter baixa energia de superfície [54] e exibir um comportamento hidrofóbico, ele não apresenta boa interação com o meio aquoso no qual os fluidos biológicos se encontram diluídos, havendo portanto a necessidade de introduzir grupos funcionais na sua superfície, tornando-o hidrofílico.

A introdução de grupos funcionais no poliestireno, usualmente envolve tratamentos químicos severos, tal como a formação de aminopoliestireno por nitração seguida de redução, resultando num ligante diazo ($-N=N-$) [55]. O método de ligação através do grupo diazo é um dos mais comumente usados e está entre os mais antigos na literatura [53]. Suportes diazotizados são preparados a partir de polímeros que contenham grupamentos amínicos aromáticos, por tratamentos com nitrito de sódio em meio ácido, conforme representado pela equação 14.



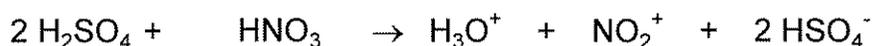
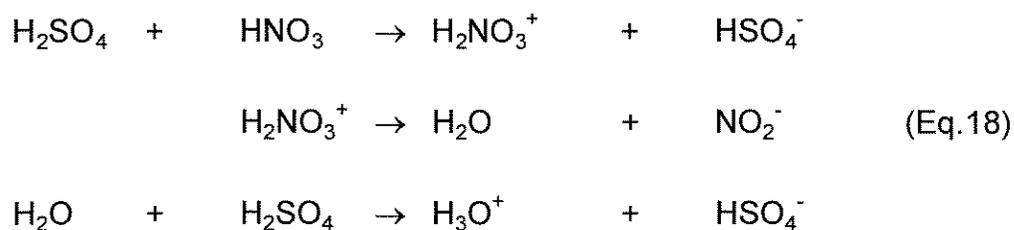
(Eq.14)

Este método é um dos mais utilizados e baseia-se na ligação da proteína a grupos eletrofílicos aril-diazônio do suporte. Os principais grupos das proteínas que participam da ligação via sal de diazônio são o amino, o fenol e o imidazol [56]. Além desses grupos, outros resíduos de aminoácidos em proteínas reagem com sais de diazônio para formar azo-derivados, conforme pode ser visto pelas equações 15 e 16 ou derivados bisazo dissubstituído em aminas primárias como mostra a equação 17.

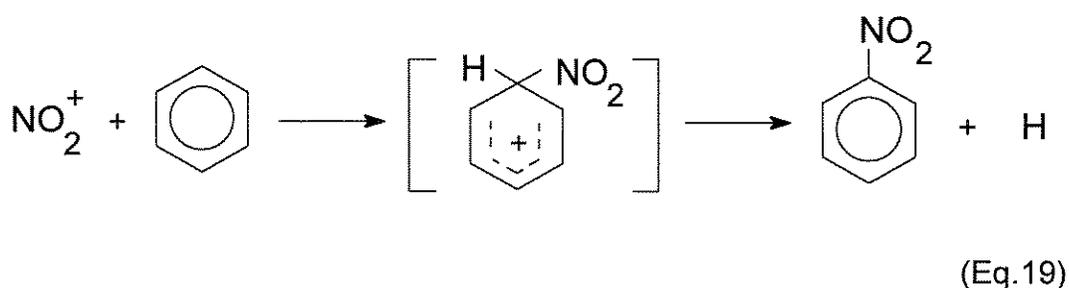


1.7.1 - DIAZOTIZAÇÃO

A diazotização do poliestireno segue os mesmos procedimentos das reações para obtenção de sais de diazônio aromáticos, cujos mecanismos são bem conhecidos na Química Orgânica clássica [57]. Os sais de diazônio são compostos muito reativos, podendo ser preparados pelo tratamento de soluções de aminas em ácidos aquosos e a frio com nitrito de sódio. As aminas em si são obtidas normalmente pela redução dos nitro-aromáticos correspondentes que são produzidos por nitração. A nitração de um anel aromático, utilizando-se uma mistura de ácidos (ácido nítrico e sulfúrico), consiste numa reação de substituição eletrofílica que envolve um íon nitrônio gerado pelo H_2SO_4 , conforme pode ser demonstrado pelas reações abaixo:

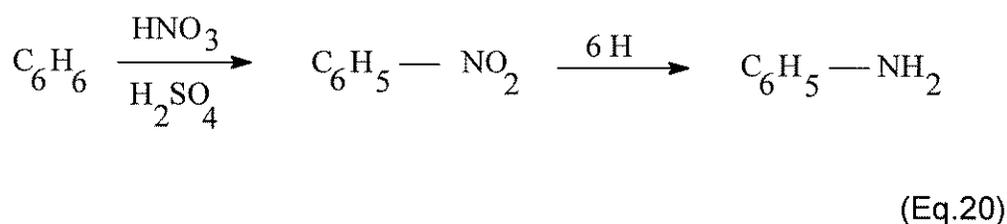


O processo não é reversível e a alta concentração ácida é mantida para assegurar a formação do íon nitrônio. Assim, a nitração de um anel aromático pode ser descrita conforme a equação 19.

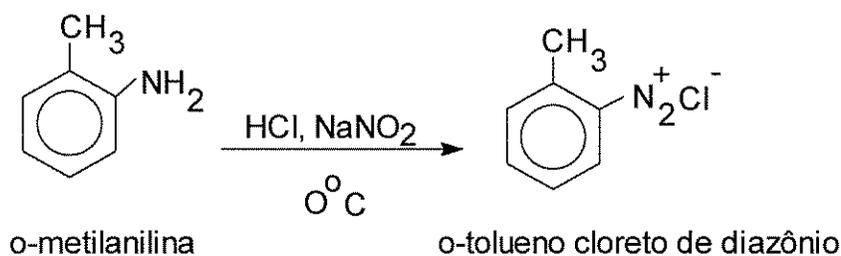


A redução dos nitro-aromáticos a aminas é uma das reações mais estudadas e muitos reagentes são capazes de fazê-la. Dentre eles estão o hidrogênio em presença de catalisadores; Fe, Sn ou Zn com ácido mineral; cloreto estanoso e cloreto de hidrogênio; hidrazina na presença Pd; ditionito de sódio e outros.

A sequência em duas etapas da nitração direta de um composto aromático seguida por redução, é um dos métodos mais práticos de síntese de aminas aromáticas e pode ser representada pela equação 20.



A diazotização de aminas aromáticas é usualmente feita com nitrito de sódio (NaNO_2) em HCl e um exemplo desta reação é a obtenção do o-tolueno-cloreto - diazônio, conforme pode ser visto pela equação 21.



(Eq.21)

A diazotização do poliestireno segue as mesmas etapas de modificações químicas já descritas. Este processo sendo conduzido em emulsão, leva à obtenção de um látex de polidiazostireno, cujas reações podem ser representadas pela figura 14.

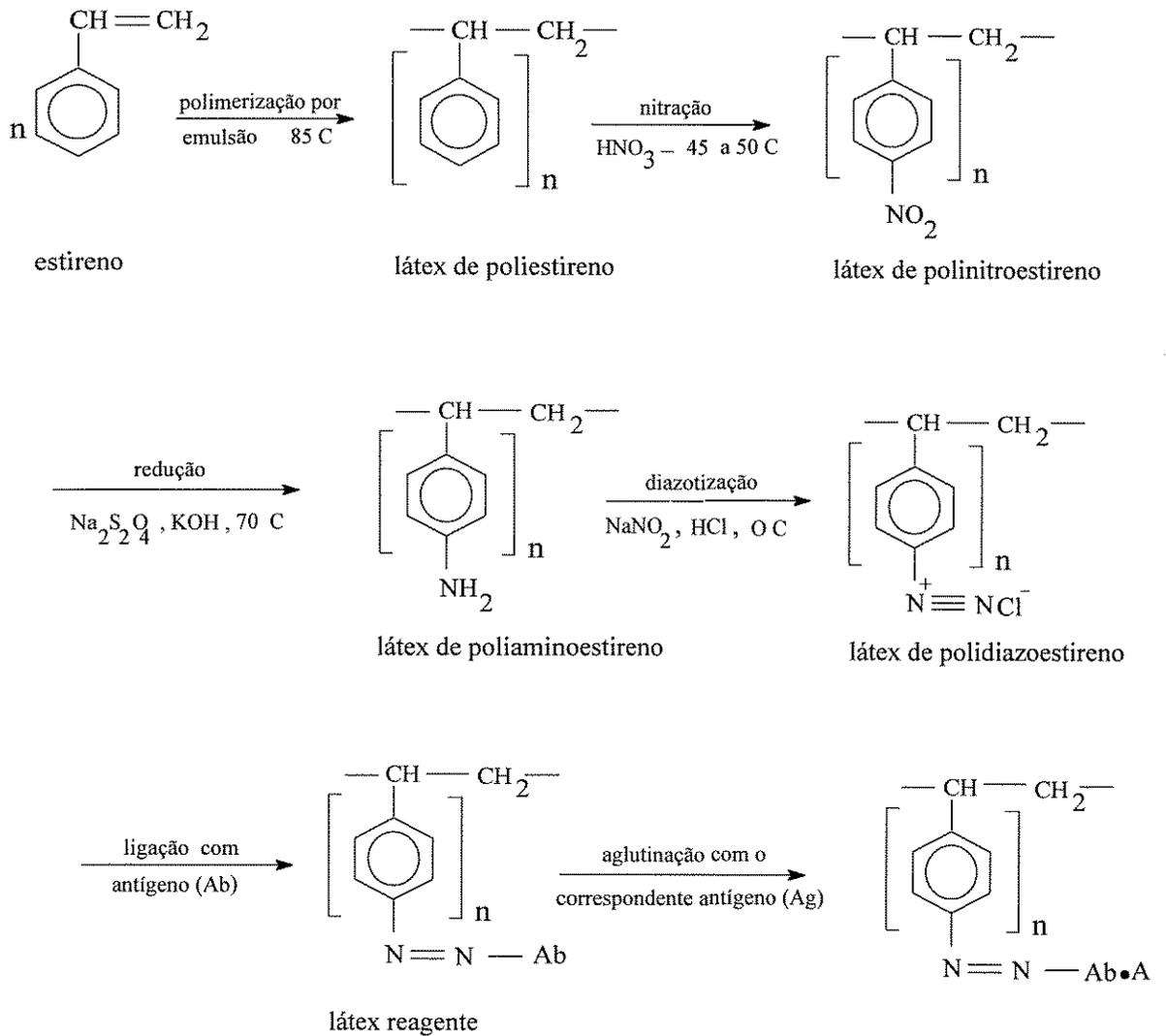


Figura 14: Etapas da síntese do látex de PDS e sua acoplagem com um conjugado antígeno-anticorpo. Ab = anticorpo. Ag = antígeno.

O poliestireno tendo grupos diazo ativos na sua superfície, se constitui num interessante meio de interação com antígenos ou anticorpos, uma vez que estabelecem ligações covalentes com proteínas.

1.8 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- síntese em emulsão do poliestireno a partir do monômero estireno para obtenção de um látex;
- verificação dos tamanhos de partículas do látex, em função da utilização de diferentes quantidades de emulsificante;
- modificação química do poliestireno em emulsão, através de diazotização para obtenção de um látex de polidiazostireno;
- caracterização das etapas da síntese;
- verificação do comportamento do látex diazotizado em reações de aglutinação.

CAPÍTULO 2 - Procedimiento Experimental

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 - DOS MÉTODOS UTILIZADOS

A síntese do poliestireno em emulsão, bem como as etapas de modificação química até obtenção do polímero diazotizado, teve por referência básica o trabalho realizado por Liu e col. [58]. Contudo, algumas adequações foram feitas levando-se em conta também os trabalhos de Tuncel e Pinsky [59] e de Wang e Zhang [39].

2.1.1 - Materiais e reagentes

REAGENTES: o iniciador, persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e o estabilizante, trifosfato de sódio ($Na_5P_3O_{10}$), ambos de qualidade P.A. e de pureza igual a 99 %, foram utilizados sem tratamento prévio de purificação. Como emulsificante foi utilizado o Maranil N-30 (dodecil benzeno sulfonato de sódio à 30%), gentilmente cedido pela Henkel S.A.Indústrias Químicas. Foi utilizada água deionizada em todas as etapas da síntese, até mesmo em lavagens durante filtrações.

O monômero de estireno, P.A., de pureza 99 % e de marca Riedel-de Haën, foi utilizado depois de ter sido lavado com solução de NaOH 10 % e água para remover o inibidor 4-terc-butilpirocatecol.

MATERIAIS: o sistema básico utilizado em todas as sínteses realizadas, contou com a montagem de um reator, conforme ilustra a figura 15.

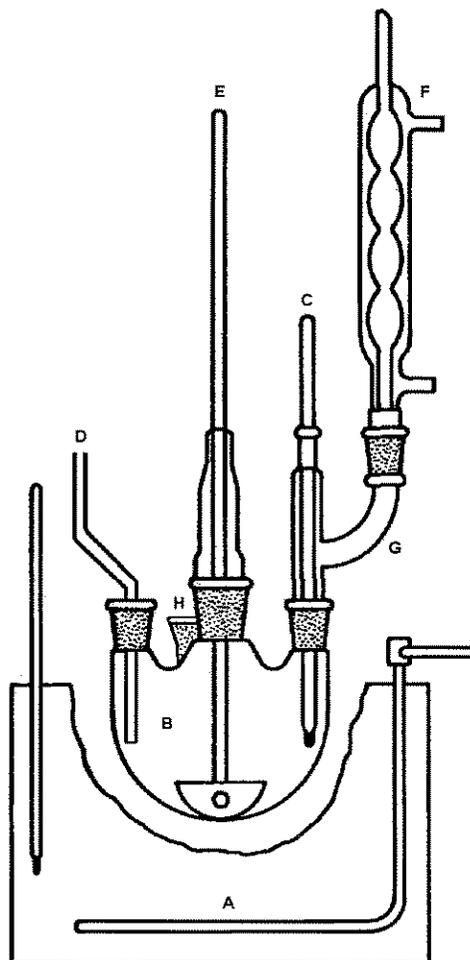


Figura 15: ilustração do reator utilizado nas sínteses, baseada em modelo citado na ref.[60]

Em um banho termostático (A), um balão de 4 bocas de 1000 ml (B) foi equipado com termômetro (C), tubo de entrada para N₂ (D), agitador mecânico (E) e condensador para refluxo (F) conectado com uma junta de segurança (G), restando uma entrada para reagentes (H).

2.1.2 - Síntese preliminar (PS01)

Realizada segundo o método proposto por Liu e col.

REATOR: foram colocados 180 ml de água sob aquecimento até 85 - 87°C e gás N₂ foi borbulhado no meio por 30 minutos para assegurar atmosfera inerte de reação. Foram adicionados 1 ml de dodecil benzeno sulfonato de sódio 1 % (DBS-Na); 0,2 g de Na₅P₃O₁₀; 0,5 g de K₂S₂O₈ e 20 g de estireno previamente lavado. Quanto à velocidade de reação, foi escolhida aleatoriamente 150 rpm para um tempo total de reação de 6 h.

2.1.3 - Síntese definitiva

Uma combinação de métodos foi feita, escolhendo-se como parâmetros fixos de reação, a quantidade de iniciador, temperatura e velocidade de agitação que foram os mais eficientes em termos de conversão do monômero para um tempo total de reação de 3 h, de acordo com os trabalhos de Tuncel e Pinsky. A proporção monômero-água adotada foi de 1/4, escolhida a partir do trabalho de Wang e Zhang que conseguiram obter partículas de poliestireno em emulsão com estreita distribuição de tamanho.

A partir da melhor quantidade de emulsificante (0,4 g), e que resultou em 90 % de conversão em menor tempo de reação (2,5 h), foram utilizadas diferentes quantidades de emulsificante, partindo-se de um valor mínimo próximo de zero e estabelecendo-se o dobro da concentração utilizada na literatura [59] como valor máximo.

As condições experimentais para a realização de 5 sínteses do poliestireno em emulsão, a partir desta combinação de métodos, foram resumidas de acordo com a tabela.5.

Tabela 5: Condições experimentais para polimerização em emulsão do estireno a 82°C, com agitação de 260 rpm e tempo de reação de 3h.

SÍNTESE	EMULSIFICANTE DBS-Na (g)	INICIADOR K ₂ S ₂ O ₈ (g)	MONÓMERO ESTIRENO (ml)	DISPERSANTE H ₂ O (ml)	ESTABILIZANTE Na ₅ P ₃ O ₁₀ (g)
S01	0,05	0,60	75	300	0,20
S02	0,10	0,60	75	300	0,20
S03	0,20	0,60	75	300	0,20
S04	0,40	0,60	75	300	0,20
S05	0,80	0,60	75	300	0,20

PROCEDIMENTO: todas as sínteses foram conduzidas utilizando o mesmo procedimento experimental, obedecendo sempre a mesma ordem conforme descrito no roteiro a seguir.

> 200 ml de água deionizada foram colocados no balão reator, sob aquecimento em banho termostatizado;

> gás N₂ foi borbulhado dentro da água por 30 minutos para obtenção de atmosfera inerte de reação, iniciando agitação que foi mantida constante até o final da síntese;

> em seguida foram adicionados, o emulsificante e o estabilizante previamente diluídos em 50 ml de água e mais o monômero;

> quando foi atingida a temperatura de 82°C, adicionou-se o iniciador já diluído em 50 ml de água, começando então a contagem do tempo;

> terminada a reação, o produto foi estocado em geladeira.

2.2 - DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS

A partir do látex de poliestireno obtido na polimerização do estireno, três etapas de reações químicas se sucederam até a obtenção do polímero diazotizado. Constam destas etapas, nitração, aminação e diazotização. O produto foi sensibilizado com albumina, utilizando-se BSA (soro albumina bovina) e foi submetido a testes de aglutinação.

2.2.1 - Nitração

Foi realizada utilizando-se os ácidos nítrico e sulfúrico concentrados de acordo com o seguinte procedimento:

- > à uma mistura de 25 ml do látex e 25 ml de HNO_3 contida em balão de fundo redondo, sob banho termostático a 45°C e agitação de 900 rpm, foram adicionados 50 ml de H_2SO_4 , gota a gota por um período de 1h;
- > terminada a adição do H_2SO_4 , a reação foi mantida sob agitação constante por 1h;
- > terminada a reação o produto foi vertido para dentro de aproximadamente 1000 ml de água deionizada gelada e foi verificado o pH;
- > um sistema de filtração à vácuo foi montado e um funil de vidro sinterizado n° 4 foi utilizado na filtração e lavagem do produto obtido;
- > o produto de cor amarela foi lavado até pH neutro, posteriormente caracterizado como polinitroestireno (PNS), foi resuspenso em água para um volume de 250 ml e estocado em geladeira.

2.2.2 - Aaminação

A redução do grupo nitro (NO_2) foi realizada de acordo com o seguinte procedimento:

> a um balão de fundo redondo e gargalo triplo, foram conectados um condensador para refluxo e um agitador mecânico, restando uma entrada para reagentes;

> neste reator foram colocados 170 ml de KOH 2N, 12 g de hidrossulfito de sódio e 0,1 ml de DBS-Na 1 % que foram mantidos a 900 rpm de agitação e aquecimento a 70°C sob banho termostatizado;

> 30 ml de PNS foram adicionados, gota a gota ao meio reacional através de um funil de separação e a reação foi mantida sob aquecimento e agitação por 4 h;

> terminada a reação foi verificado o pH e o produto foi filtrado e lavado até pH neutro através de filtração à vácuo utilizando-se funil de vidro sinterizado n° 4;

> o produto de cor branco-gelo, caracterizado como poliaminoestireno (PAS), foi resuspendido em água para um volume de 250 ml e estocado em geladeira.

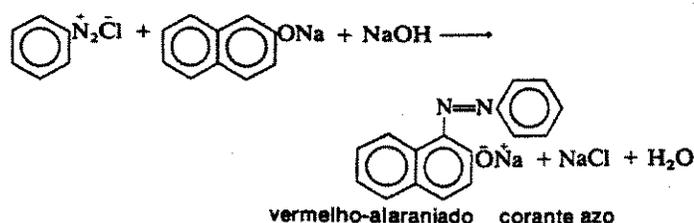
2.2.3 - Diazotização

A partir do PAS, a diazotização foi realizada do seguinte modo:

- > sob banho de gelo, uma mistura de 25 ml de PAS e 42 ml de HCl 0,6N foi mantida sob agitação;
- > de uma bureta foram adicionados 7,5 ml de NaNO₂ 0,1 N e a reação foi mantida sob agitação por 30 minutos;
- > uma coloração azul foi verificada em papel indicador amido-iodeto, indicando um pequeno excesso da solução de NaNO₂;
- > terminada a reação foi verificado o pH e o produto foi filtrado e lavado até pH neutro através de filtração à vácuo utilizando-se funil de Büchner e papel de filtro quantitativo de marca Framex 389³ faixa azul;
- > o produto de cor amarela caracterizado qualitativamente como polidiazostireno (PDS) através de teste com β-naftol, seguiu imediatamente para a etapa de sensibilização (revestimento) com BSA.

teste com β-naftol: teste qualitativo para grupos diazo [61]

- > com auxílio de uma bureta, foram adicionados gota a gota 30 ml do látex de PDS a 10 ml de uma solução de 0,1 g de β-naftol dissolvida em NaOH 10 %;
- > terminada a reação verificou-se coloração vermelho-alaranjado proveniente da formação do azo-corante conforme demonstra a reação:



2.3 - Sensibilização

- > o látex diazotizado teve seu pH ajustado para 7,5 com solução tampão Tris 0,1M contendo 0,2 M de glicina (pH 9), sob agitação;
- > em seguida foi transferido para banho de gelo e foram adicionados gota a gota, 300 mg de BSA em solução, que permaneceu sob lenta agitação;
- > após 2 h de agitação, uma alíquota foi retirada para teste com β -naftol que não indicou a presença de grupos diazo;
- > foram então adicionados 500 mg de glicina em solução, para bloquear possíveis grupos diazo livres e a reação foi mantida sob agitação por 1 hora;
- > uma nova alíquota foi retirada e testada com β -naftol onde não se verificou reação com grupos diazo, indicando que todos os grupos foram ligados às proteínas de BSA e/ou foram bloqueados pela glicina;
- > o produto sensibilizado foi filtrado e lavado com solução de NaCl 0,15M, através de filtração à vácuo utilizando funil de Büchner;
- > após filtração, o reagente obtido foi submetido a testes de aglutinação.

2.3.1 - Teste de aglutinação

- > em lâminas de vidro apropriadas foram colocados 50 μ l dos soros positivo e negativo;
- > em seguida, foram adicionados aos soros 50 μ l do látex sensibilizado e a mistura foi homogeneizada com auxílio de bastonete plástico;
- > as lâminas foram agitadas manualmente, com movimentos circulares durante 2 minutos e após este tempo as reações foram observadas.

2.4 - DAS ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO

2.4.1 - Determinação da conversão

A porcentagem de conversão do monômero estireno para todas as sínteses, foi calculada aplicando-se na equação 22 [39] valores de massa do polímero, obtidos gravimetricamente, após liofilização e pesagens até peso constante de amostras coletadas em triplicata, após término de cada reação de polimerização.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{W \times V_0}{W_0 \times V} \times 100 \quad (\text{Eq.22})$$

onde: W = massa de cada amostra

W_0 = massa total do monômero usado

V = volume de cada amostra

V_0 = volume total da reação

2.4.2 - Determinação do diâmetro das partículas e distribuição dos diâmetros

A determinação do diâmetro médio das partículas e a distribuição dos diâmetros para cada síntese foram feitas utilizando-se um contador de micro partículas de marca Coulter modelo N4MD, que tem seu princípio de operação baseado no movimento Browniano das partículas e espalhamento de luz quando estas são expostas a uma fonte de laser.

Uma gota do polímero em emulsão foi adicionada a 5 ml de água que estavam dentro de uma cubeta de vidro; após homogeneização a amostra foi colocada no compartimento próprio para a cubeta dentro do equipamento e foram feitas as medidas e distribuição dos diâmetros das partículas.

2.4.3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Análises morfológicas de todas as etapas da síntese foram feitas, utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura de marca Cambridge Stereoscan modelo S4-10. As amostras na forma de pó, fixadas num disco suporte através de colagem com uma resina transparente, foram metalizadas com uma fina camada de ouro e foram micrografadas.

2.4.4 - Espectroscopia infra-vermelho (FT-IR)

Através de espectroscopia no infra vermelho as etapas de polimerização do estireno, nitração, aminação e diazotização foram devidamente acompanhadas e caracterizadas pela presença de bandas características, diferenciadas para cada composto, verificadas a partir dos espectros obtidos. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e os espectros foram medidos entre 4000 e 400 cm^{-1} utilizando-se um espectrofotômetro FT-IR marca Perkin Elmer 1600.

2.4.5 - Espectroscopia Raman

Amostras de todas as etapas da síntese na forma de pó, foram compactadas entre 2 lâminas de vidro e foram analisadas através de espectroscopia Raman. Foram obtidos espectros excitados com 20 mW da linha 514.533 nm do laser de argônio, marca Stabilite 2016. O retroespalhamento de luz foi analisado pelo espectrômetro triplo Jobin Yon modelo T 6400, com detecção por CCD ("charged coupled device") de marca Spectraview - 2D. Duas fendas do equipamento foram ajustadas para 200 μm e uma para 13 μm .

2.4.6 - Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de DSC foram realizadas com varredura de temperatura na faixa de 30 - 220°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C / min. As massas das amostras variaram entre 3,70 - 5,13 mg e foram analisadas utilizando o equipamento V4 OB DuPont 2000.

CAPÍTULO 3 - Resultados e discussão

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese preliminar do poliestireno (PS1) foi caracterizada através de FTIR e a porcentagem de conversão do monômero foi calculada através da equação 22. O diâmetro médio das partículas, bem como a distribuição dos diâmetros foram verificados conforme descrito na seção 2.4.2 .

A partir dos resultados de análises preliminares, que encontram-se descritas nas seções seguintes, resolveu-se fazer algumas sínteses utilizando diferentes quantidades de emulsificante a fim de se ter uma idéia da influência deste no tamanho das partículas. A escolha pela combinação dos métodos citados anteriormente, teve por objetivo trabalhar com os melhores resultados divulgados nas publicações mais recentes. Quanto às modificações químicas envolvidas pelas etapas de nitração, aaminação e diazotização, estas encontram-se discutidas neste trabalho de forma qualitativa e foram realizadas objetivando ter um contato inicial com todas as etapas da síntese do látex de PDS, bem como conhecer todas as dificuldades inerentes ao processo.

3.1 - Conversão

As amostras do poliestireno em emulsão ($V = 2 \text{ ml}$), em triplicata, foram liofilizadas e as massas após pesagens até peso constante, foram aplicadas na equação 22 para cálculo da porcentagem de conversão do monômero, cujos resultados estão indicados na tabela 6.

Tabela 6: Conversão (%) através de método gravimétrico.

PS1: síntese preliminar; S01-S05 : sínteses definitivas.

SÍNTESE	MASSA (g) DO POLÍMERO	% CONVERSÃO
PS1	0,6580	52
S01	0,3570	98
S02	0,3274	90
S03	0,3272	90
S04	0,3263	89
S05	0,2977	82

Na síntese preliminar (PS1), após 6h de reação verificou-se a ocorrência de polimerização em volta da haste metálica do agitador, levando à grande perda de massa do polímero. Devido a este fato o agitador teve sua haste trocada por uma outra de teflon, onde verificou-se diminuição da ocorrência de tal problema, melhorando a eficiência das outras reações. Plotando-se num gráfico as porcentagens de conversão das das sínteses S01 à S05 e as quantidades correspondentes de emulsificante utilizadas, pode-se observar pela figura 15 que os níveis mais altos de conversão ocorreram quando foram utilizadas quantidades mais baixas de emulsificante.

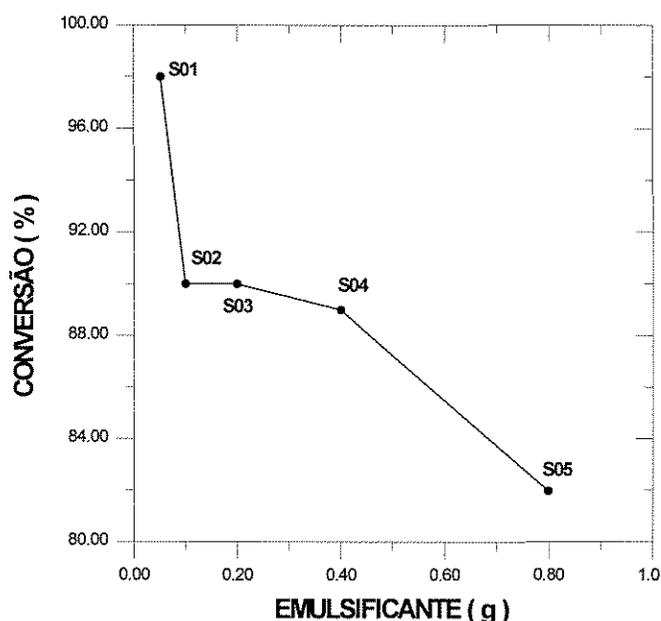


Figura 15: Gráfico - % conversão x quantidade de emulsificante

Não se pode somente por este gráfico afirmar que essas funções são de fato inversamente proporcionais, uma vez que tem-se que levar em conta a importância de outras variáveis que podem influenciar na conversão, como por exemplo, tempo, temperatura e quantidade de iniciador. Considerando que neste trabalho a concentração de emulsificante variou e as demais variáveis como tempo de reação, temperatura e quantidade de iniciador foram as mesmas para todas as sínteses e, sabendo-se que aumentando a concentração de emulsificante, aumenta-se o número de micelas, provavelmente a quantidade de iniciador foi insuficiente para iniciar a formação de cadeias em todas as micelas formadas nas sínteses S02 à S05. Em função disso, possivelmente restaram muitas micelas inativas responsáveis pela queda na porcentagem de conversão dessas sínteses.

3.2 - Diâmetros das partículas e distribuição dos diâmetros

Os diâmetros médios das partículas verificadas nas sínteses, encontram-se resumidos na tabela 7 e a distribuição dos diâmetros estão representadas através dos gráficos a seguir.

Tabela 7: diâmetro médio das partículas

SÍNTESE	DIÂMETRO(μm)	DESVIO- PADRÃO (μm)
PS1	0,149	estrito
S01	0,181	0,039
S02	0,109	estrito
S03	0,081	0,012
S04	0,069	0,012
S05	0,058	estrito

Distribuição dos diâmetro das partículas: gráficos

Figura 16: síntese preliminar PS1

DIÂMETRO (μm)	QUANTIDADE (%)
0,100 - 0,147	84
0,147 - 0,215	16

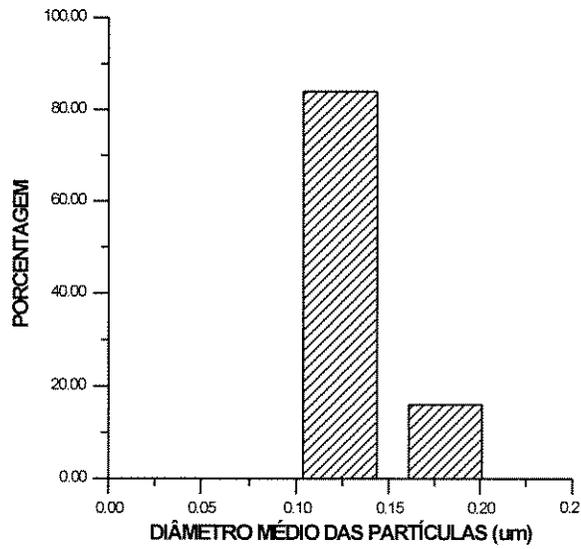


Figura 17: síntese S01

DIÂMETRO (μm)	QUANTIDADE (%)
0,100 - 0,147	48
0,147 - 0,215	52

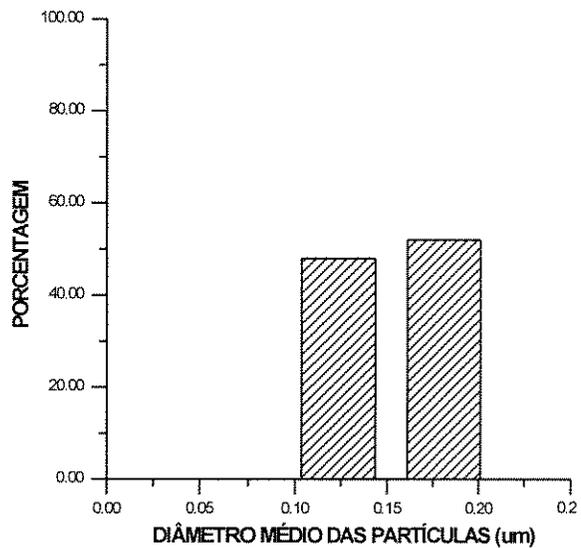


Figura 18: síntese S02

DIÂMETRO (μm)	QUANTIDADE (%)
0,068 - 0,100	93
0,100 - 0,147	7

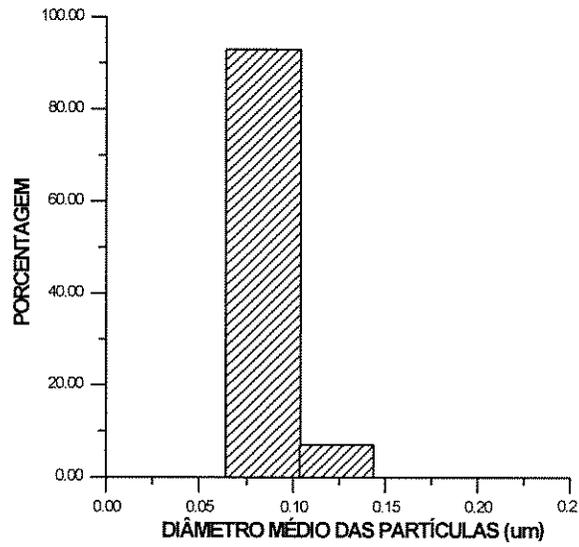


Figura 19: síntese S03

DIÂMETRO (μm)	QUANTIDADE (%)
0,046 - 0,068	30
0,068 - 0,100	69
0,100 - 0,147	1

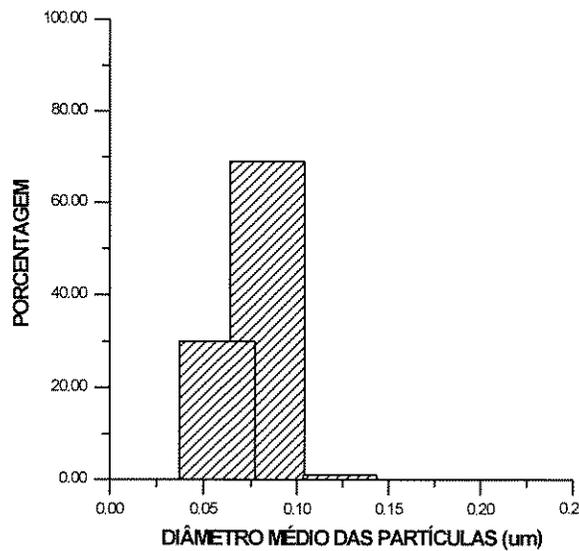


Figura 20: síntese S04

DIÂMETRO (μm)	QUANTIDADE (%)
0,031 - 0,046	5
0,046 - 0,068	82
0,068 - 0100	13

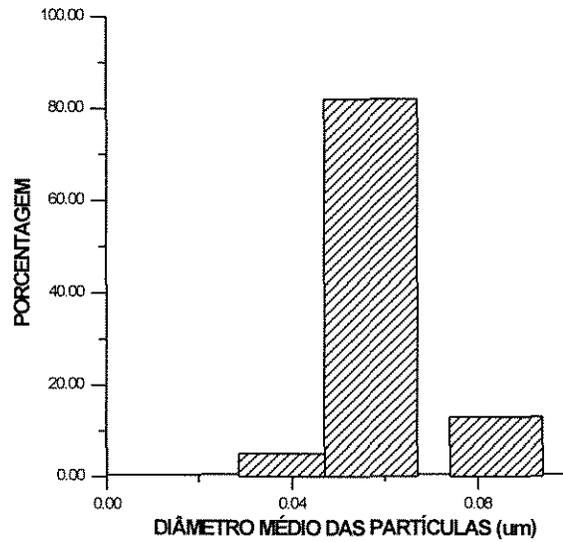
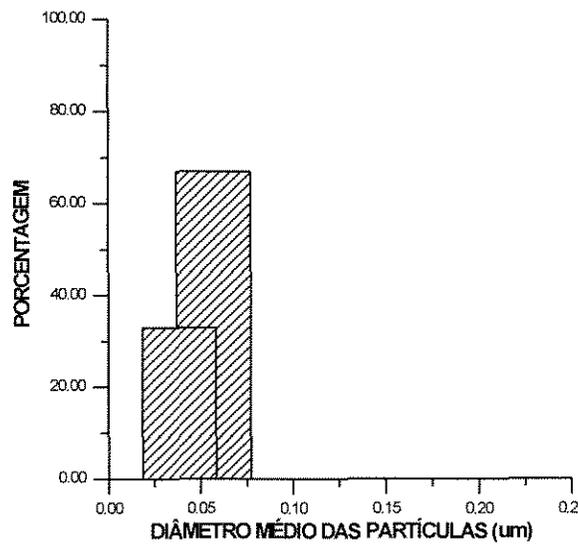


Figura 21: síntese S05

DIÂMETRO (μm)	QUANTIDADE (%)
0,031 - 0,046	33
0,046 - 0,068	67



Relacionando-se o diâmetro médio das partículas e a quantidade de emulsificante utilizada em cada síntese, tem-se os dados mostrados na tabela 8.

Tabela 8 : emulsificante e diâmetros das partículas

SÍNTESE	EMULSIFICANTE (g)	DIÂMETRO MÉDIO (μm)
S01	0,05	0,181
S02	0,10	0,109
S03	0,20	0,081
S04	0,40	0,069
S05	0,80	0,058

Representando estes dados graficamente, pode-se observar que à medida que aumentou-se a concentração de emulsificante, diminuiu o diâmetro médio das partículas, o que concorda com as teorias já mencionadas na introdução deste trabalho.

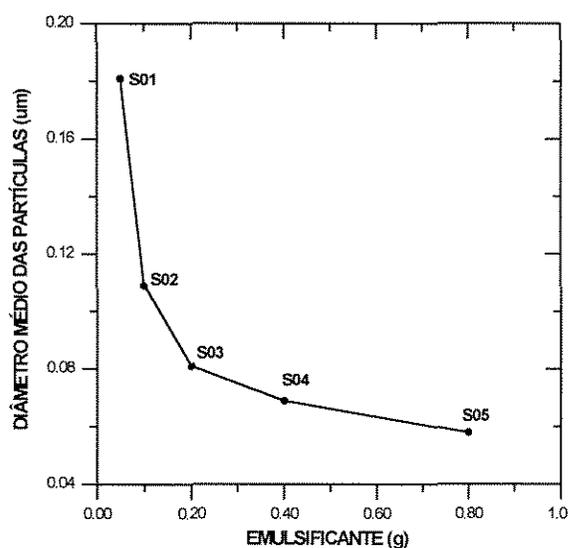


Figura 22 : Gráfico - Diâmetro das partículas x quantidade de emulsificante

No trabalho realizado por Tuncel e Pinsky quando estes utilizaram 0,1 g de emulsificante, obtiveram partículas de 0,3 μm de diâmetro, estando o monômero estireno disperso na água numa razão de 1/3. Utilizando esta mesma quantia de emulsificante e à razão monômero-água de 1/4, neste trabalho conseguiu-se obter partículas de 0,1 μm de diâmetro.

Sun e Ruckenstein [62] trabalhando com polimerização em emulsão concentrada, utilizaram em um de seus experimentos 0,1 g de emulsificante para um volume de 1,11 ml de água e 10 ml de monômero estireno; nestas condições obtiveram partículas de 0,2 μm de diâmetro. Estes autores, ao trabalharem com uma quantia fixa de emulsificante (0,09 g / ml H_2O) e água (1,11 ml) mas variando a quantidade de monômero, verificaram que o tamanho das partículas diminuiu à medida que diminuiu a quantidade de monômero disperso no meio, conseqüentemente a proporção de água em relação ao monômero aumentou.

As observações de Sun e Ruckenstein (A) quando comparadas (tabela 9) com os resultados obtidos por Tuncel e Pinsky (B) e os obtidos neste trabalho (C), sugerem que não só a quantidade de emulsificante mas também a quantidade de dispersante influenciam no tamanho das partículas.

Pelos dados da tabela 9, pode-se observar que quanto maior foi a quantidade de dispersante (água), menor foi o tamanho das partículas, ou, quanto maior a concentração de monômero, maiores os diâmetros de partícula.

A partir dessas observações pode-se supor que quando se teve o monômero disperso em menores quantidades de água, foram produzidas partículas maiores e uma quantidade maior de emulsificante por unidade de volume esteve disponível envolvendo as gotas de monômero, consumindo mais emulsificante por área superficial.

Tabela 9: Relação: diâmetro de partícula e razão monômero-água (M:H₂O)

A - Sun e Ruckenstein; B - Tuncel e Pinsky; C - este trabalho

TRABALHOS	PROPORÇÃO M:H ₂ O (ml)	DIÂMETRO DE PARTÍCULA (µm)	EMULSIFICANTE (g)
A	10:1	0,2	0,1
B	1:3	0,3	0,1
C	1:4	0,1	0,1

3.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises morfológicas feitas através de microscopia eletrônica de varredura, confirmam a homogeneidade na distribuição dos diâmetros das partículas verificada através do Coulter-Counter. Pode-se observar pelas figuras 23, 24, 25, 26 e 27 uma modificação no estado de agregação das partículas.

Quando um látex é espalhado sobre um substrato e a água é evaporada, as partículas devem chegar a um contato íntimo quando o nível de sólidos chegar a 65 - 70 %. À medida que a água remanescente é evaporada dos interstícios entre as partículas, o comportamento subsequente dependerá da temperatura do sistema em relação à temperatura de transição vítrea do polímero. Se a temperatura selecionada para secagem do polímero estiver abaixo da T_g deste polímero, as partículas serão vítreas e o resultado será um tipo de estrutura de empacotamento fechado de esferas duras e tal látex não formará um filme [63].

Como pode-se observar pelas figuras 23 e 24, este comportamento se verificou para o caso do poliestireno. Contudo, tal comportamento não se repetiu estando o polímero funcionalizado. Pode-se observar pelas figuras 25, 26 e 27 que as partículas se aglomeraram de forma desorganizada, possivelmente, como resultado da ação de forças de atração entre cargas existentes na superfície das partículas, ou ainda dispersas no meio, provenientes de resíduos de reagentes

(iniciador, emulsificante e estabilizante) que não foram totalmente removidos nos processos de lavagens e filtração.

Este comportamento também pode ser devido à mudança da característica química do poliestireno (apolar) que após funcionalização tornou-se polar.

Segundo Sun e Ruckenstein que estudaram a dispersividade do látex de poliestireno em função da ação do NaCl, a força iônica parece não alterar o tamanho das partículas mas somente a dispersividade dos látices é afetada, a qual aumenta com o aumento da força iônica. Segundo estes autores a dispersividade aumenta porque aumentando a força iônica a repulsão entre as partículas diminui, o que pode favorecer a coalescência destas.

Considerando-se a polaridade do poliestireno funcionalizado, a contribuição de cargas adsorvidas na superfície das partículas ou ainda dispersas no meio reacional e com base nos estudos feitos por Sun e Ruckenstein, pode-se supor que fortes forças de atração devem ter influenciado na aglomeração desordenada das partículas verificadas pelas figuras 25, 26 e 27, reproduzindo um comportamento semelhante ao que ocorre com o látex no estado líquido.

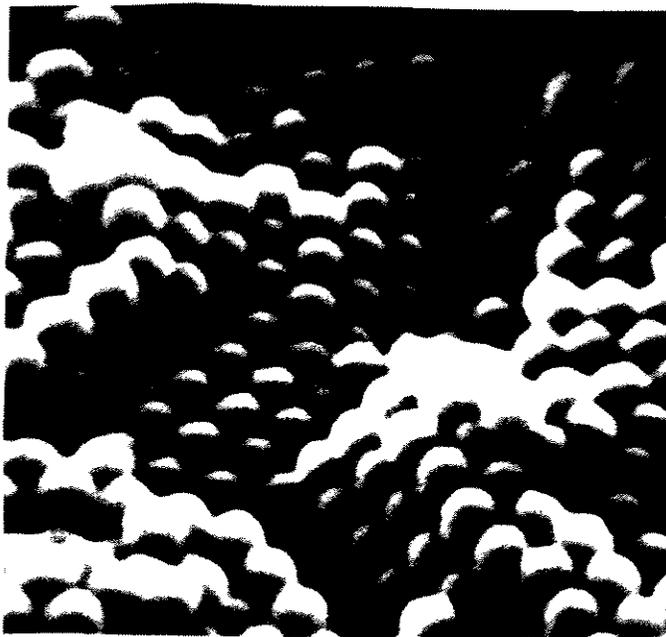


Figura 23: PS-látex; micrografia com aumento de 46000 vezes

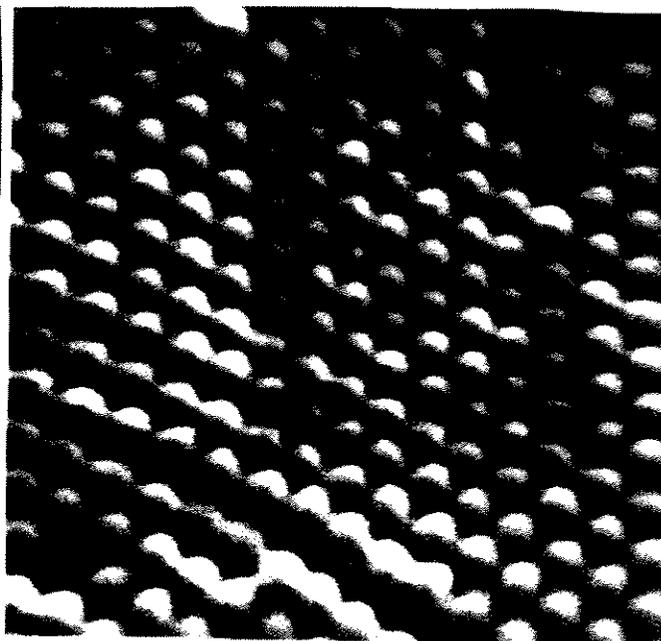


Figura 24: PS-látex; micrografia com aumento de 44000 vezes

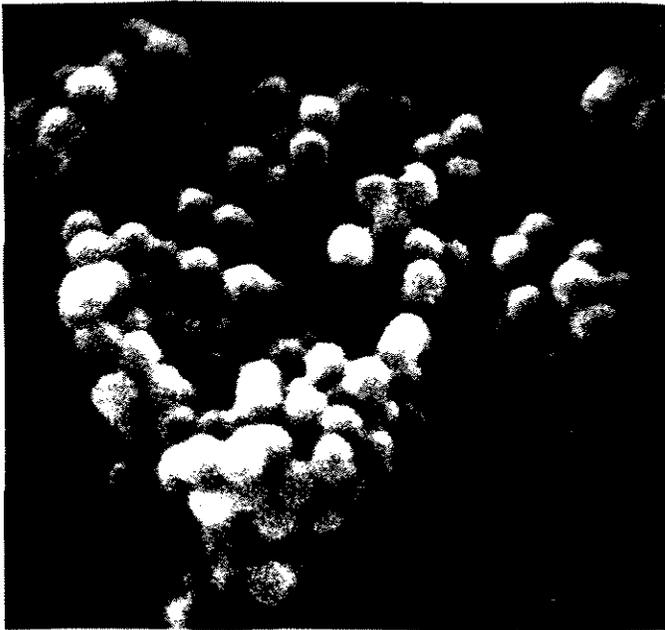


Figura 25 - PNS-látex; micrografia com aumento de 40000 vezes

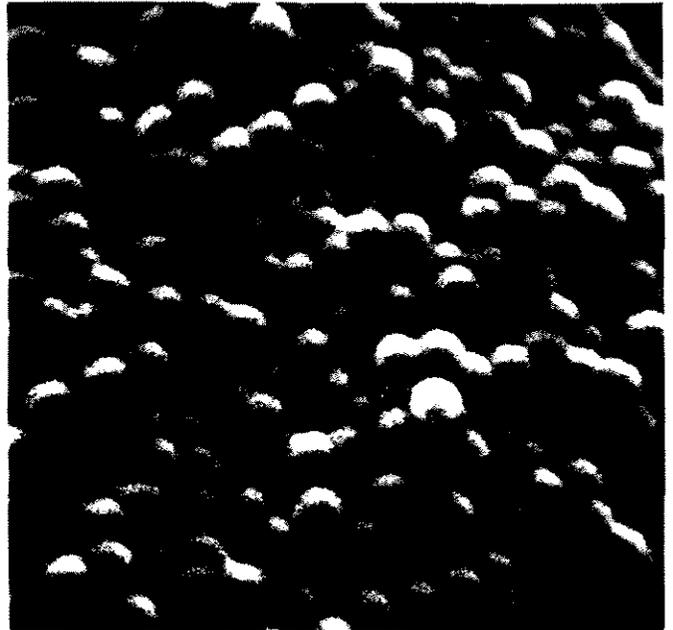


Figura 26: PAS-látex; micrografia com aumento de 42000 vezes



Figura 27: PDS-látex; micrografia com aumento de 40000 vezes

3.4 - CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS

3.4.1 - Espectroscopia infra-vermelho (FT-IR)

As bandas verificadas na análise do produto da primeira etapa da síntese do látex, corresponderam às bandas atribuídas ao poliestireno encontradas na literatura [64], caracterizando a formação do poliestireno em emulsão. Assim, o espectro do poliestireno obtido pode ser visto pela figura 28 cujas bandas encontram-se discriminadas na tabela 10.

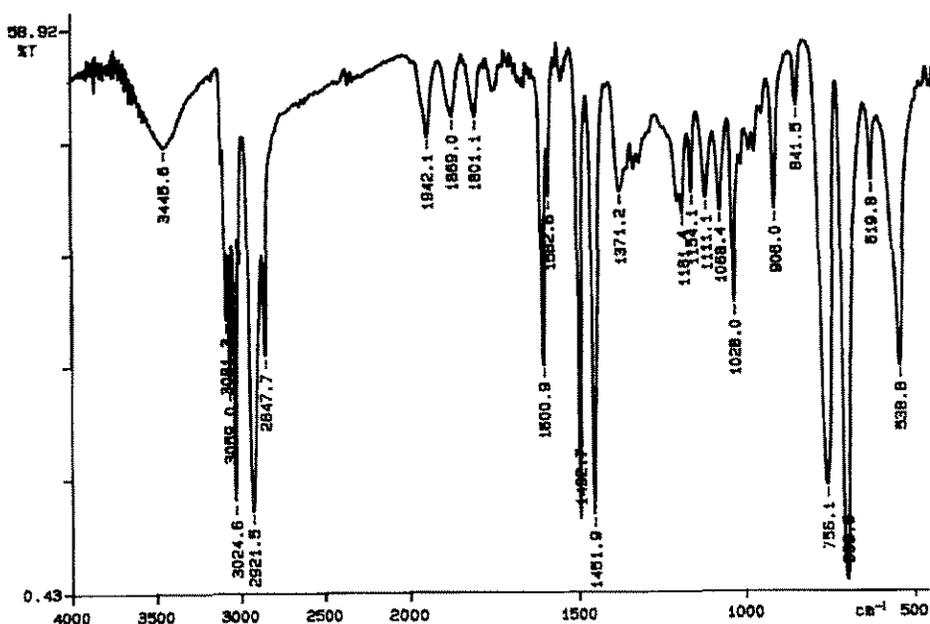


Figura 28: FT-IR - espectro do poliestireno

Tabela 10.: bandas características do poliestireno

FREQUÊNCIA (cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
3024	estiramento C-H aromático
2921	estiramento CH_2 alifático, assimétrico
2847	estiramento CH_2 alifático, simétrico
1600	C=C aromático
1492 e 1451	anel aromático, estiramento no plano
756	H fora do plano
696	anel aromático, estiramento fora do plano

Após nitração, o produto foi caracterizado como polinitroestireno (PNS) através das bandas referentes às deformações do grupo nitro (tabela 11). A figura 29, mostra o espectro obtido.

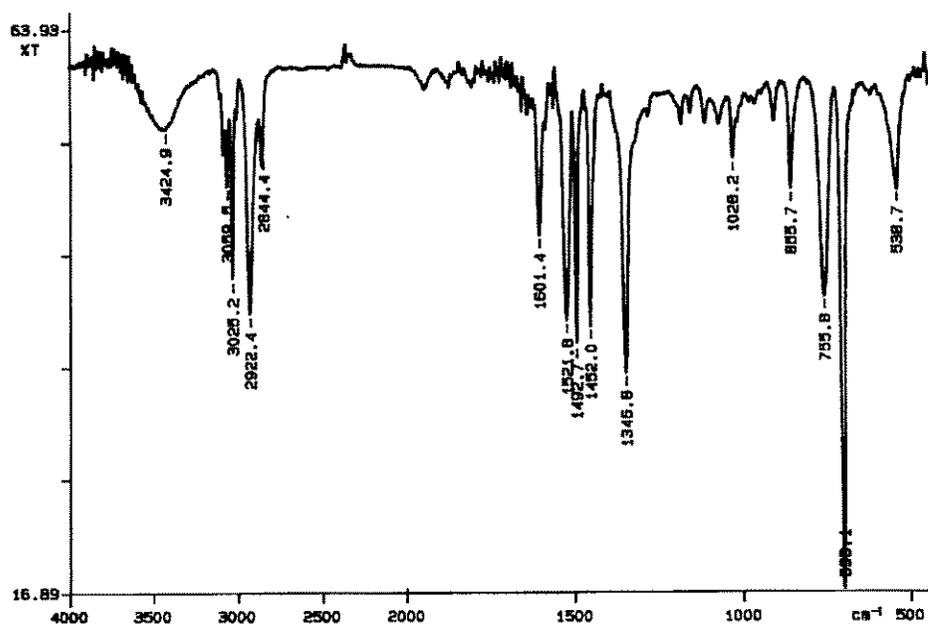


Figura 29.: FT-IR - espectro do polinitroestireno

Tabela 11: bandas características do grupo NO₂

FREQUÊNCIA (cm ⁻¹)	ATRIBUIÇÃO
1521	NO ₂ , estiramento assimétrico
1346	NO ₂ , estiramento simétrico

Após redução do grupo NO_2 , levando à formação de NH_2 , o produto foi caracterizado como poliaminoestireno (PAS) como indicado pelas bandas características descritas na tabela 12. O espectro correspondente pode ser visto na figura 30.

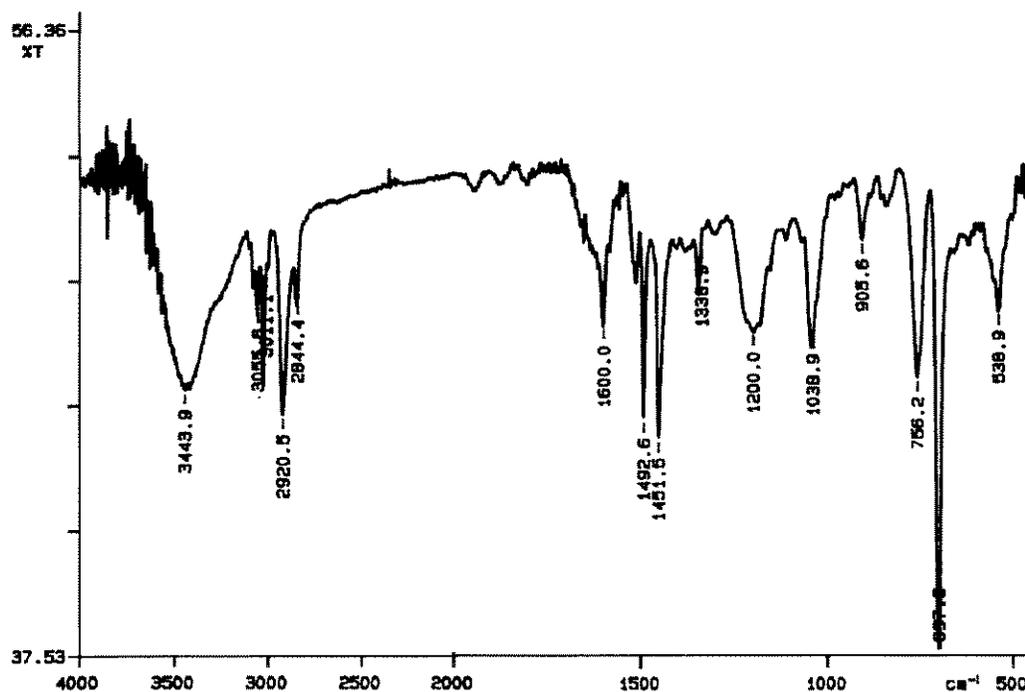


Figura 30: FT-IR - espectro do poliaminoestireno

Tabela 12: bandas características do grupo NH_2

FREQUÊNCIA (cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
3500 - 3400	NH, deformação axial assimétrica e simétrica, aparecendo um ombro no lado de menor frequência
1650 - 1580	NH, deformação angular simétrica no plano
1340 - 1200	deformação axial C-N de aminas aromáticas primárias
905	NH, deformação angular simétrica no plano

Após ter sido analisado o último produto da síntese (polidiazoestireno), pela figura 31, pode se observar que o produto conservou algumas características espectrais referentes à etapa anterior (aminação), por apresentar praticamente as mesmas bandas de absorção do poliaminoestireno, sugerindo que restaram grupos NH_2 que não foram diazotizados. Além disso, os picos em 1516 cm^{-1} e 1344 cm^{-1} podem ser referentes ao grupo NO_2 que pode não ter sido totalmente reduzido a NH_2 . Isto porque, devido à importante ressonância existente nos sistemas aromáticos contendo grupamentos NO_2 e grupos doadores de elétrons (por exemplo o grupo amino em posição orto ou para), a vibração simétrica do NO_2 desloca-se para frequências mais baixas [64].

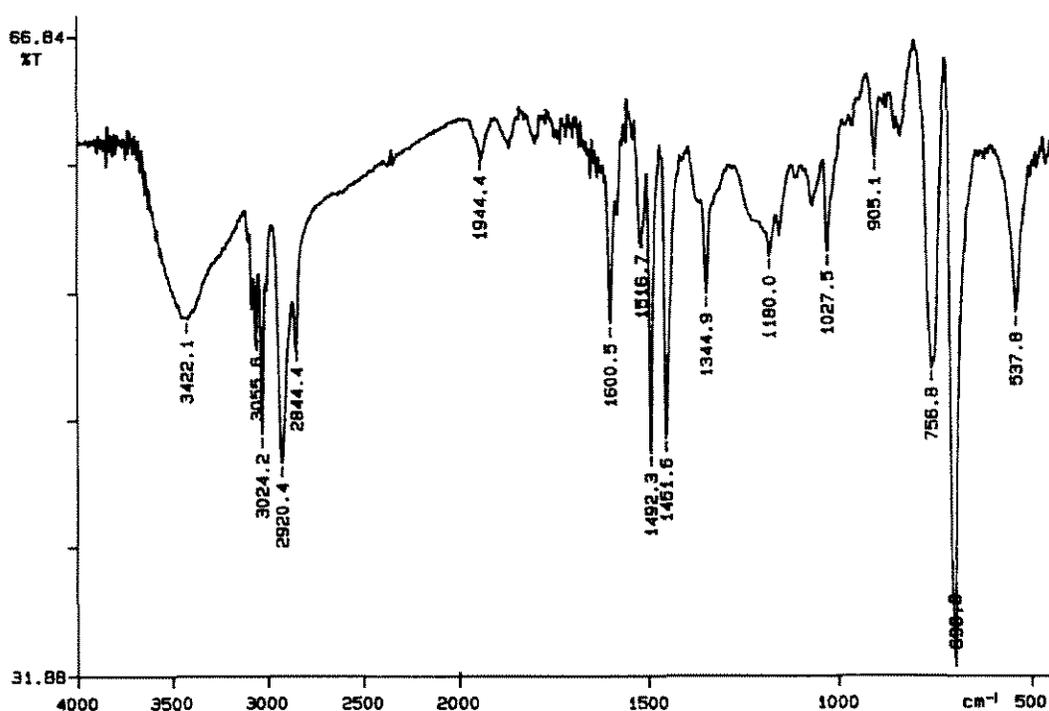


Figura 31: FT-IR - espectro do polidiazoestireno

3.4.2 - Espectroscopia Raman

A vibração de deformação axial -N=N- de um azo-composto é inativa no infra-vermelho mas absorve no espectro Raman [64]. A região de vibração do grupo -N=N- difere de composto para composto, variando entre 1400 - 1600 cm^{-1} , aparecendo em 1573 cm^{-1} para o azometano e em 1442 cm^{-1} para o azobenzeno. Em geral atribui-se a região próxima a 1600 cm^{-1} como sendo a região de vibração deste grupo.

Os anéis benzênicos apresentam uma banda intensa em 1000 cm^{-1} e outra de média intensidade próxima de 1028 cm^{-1} ; apresentam duas bandas fracas próximas de 1170 cm^{-1} e as duplas ligações do anel aparecem em 1600 cm^{-1} [65].

A partir destas informações o produto da última etapa da síntese foi analisado na região entre 900 e 1700 cm^{-1} e foi caracterizado como polidiazostireno (PDS) por apresentar as principais bandas de vibração referentes ao anel aromático em 1000 cm^{-1} e referentes ao grupo diazo em 1600 cm^{-1} , o que confirma o teste qualitativo para grupos diazo feito com β -naftol.

Devido haver na literatura a indicação de que a região de vibração do grupo diazo é a mesma referente às duplas ligações do anel aromático, resolveu-se investigar todas as etapas da síntese, para se verificar tais bandas. Como pode ser visto pela figura 32, as referidas duplas ligações aparecem na região de 1600 cm^{-1} , porém aparentam ser de média intensidade quando comparadas no mesmo espectro, com a banda do anel aromático. Isto não acontece com o polímero diazotizado, onde pode-se notar um aumento de intensidade da banda em 1600 cm^{-1} quando comparada com a banda do anel aromático em 1000 cm^{-1} no mesmo espectro, o que ocorre possivelmente devido à uma superposição de bandas.

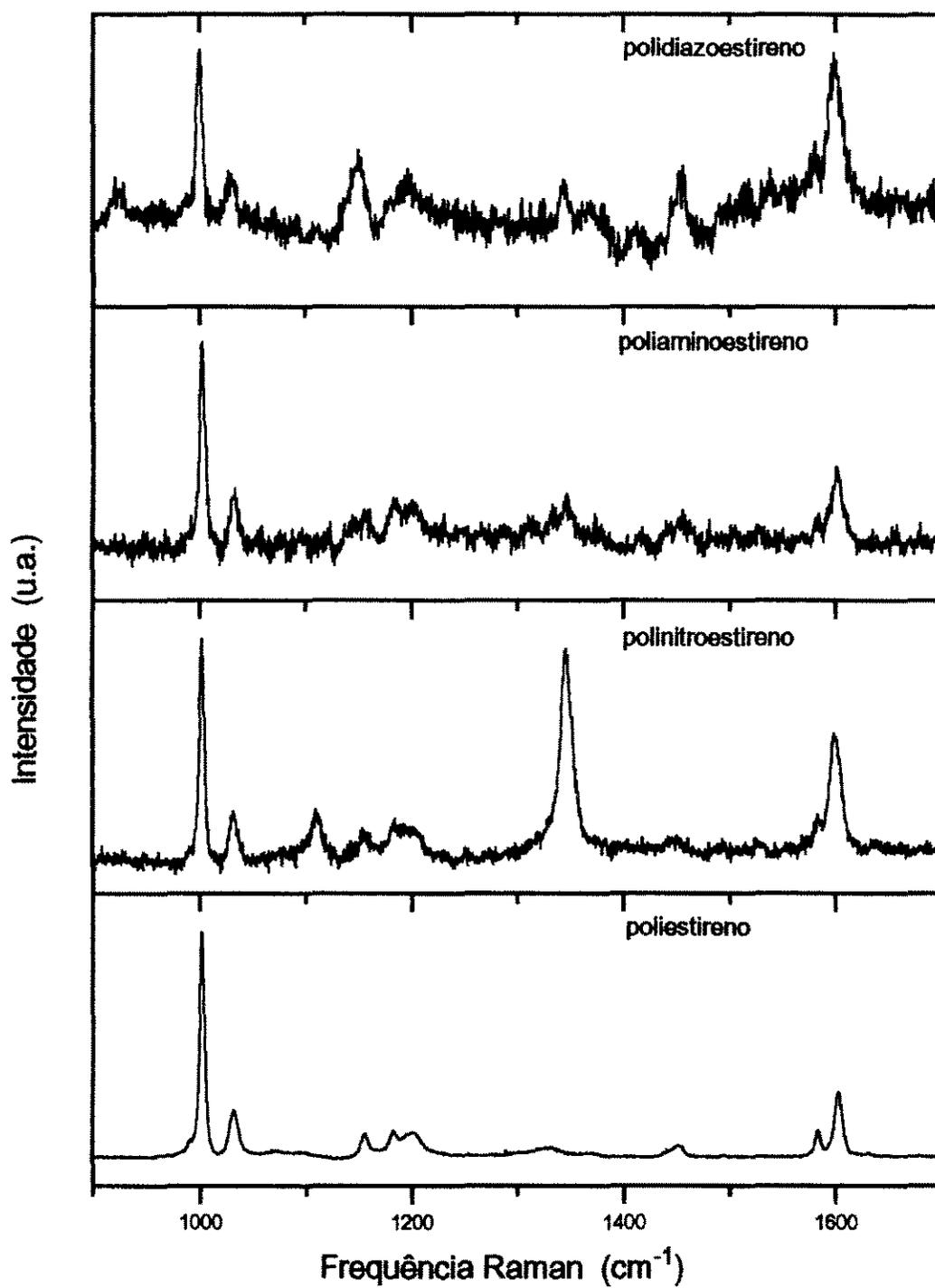


Figura 32.: Espectros Raman

3.5 - Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A partir das análises de IV e Raman onde pode-se verificar terem ocorrido as funcionalizações desejadas, pensou-se em investigar, dadas às modificações químicas feitas no poliestireno, se houve alguma alteração nas propriedades térmicas do material, que conforme se sabe tem sua Tg em torno de 100°C. Para tanto, foram feitas medidas de Tg através de DSC (apêndice III) dos produtos de todas as etapas da síntese, como pode ser visto pela tabela 13.

Tabela 13: Temperatura de transição vítrea

POLÍMERO	Tg °C
PS	106
PNS	109
PAS	111
PDS	106
PDS - BSA	110

Em trabalho realizado por Philipides e col. [66], foi feita a nitração do poliestireno através de 4 métodos diferentes. No método mais eficiente, conseguiram completa monosubstituição do PS em posição para e caracterizaram como poli (4-nitroestireno) que através de análises de DSC apresentou Tg a 195°C. Comparando esse resultado com os obtidos neste trabalho, pode se verificar que não houve nenhuma mudança significativa nas propriedades térmicas do poliestireno funcionalizado, nem mesmo quando o polidiazostireno (PDS) foi sensibilizado com albumina (BSA). Isto sugere ter ocorrido um baixíssimo grau de funcionalização em todas as etapas da síntese, a começar pela nitração que é a etapa precursora das modificações químicas, responsável pela eficiência das etapas subsequentes.

3.6 - Sensibilização e teste de aglutinação

Para a sensibilização do látex de PDS, inicialmente foram escolhidas as sínteses que apresentaram o maior ($0,2 \mu\text{m}$) e o menor ($0,06 \mu\text{m}$) tamanhos de partícula. Devido ao fato das partículas de menor tamanho terem apresentado problemas nas etapas de filtração e lavagem, por obstruírem os poros das membranas de filtração, decidiu-se por trabalhar somente com o látex de maior tamanho de partícula.

Experimentos preliminares com o látex de PDS revestido com BSA, demonstraram boa aglutinabilidade quando este foi homogeneizado na presença de um soro padrão positivo contendo anticorpos anti-BSA. Contudo, o mesmo látex ao ser testado com o soro negativo também demonstrou aglutinabilidade, caracterizando a ocorrência de reações inespecíficas, muito embora, com o soro positivo a reação tenha sido muito mais intensa do que com o soro negativo.

Okubo e col. [67] ao estudarem o comportamento de partículas poliméricas sensibilizadas com anticorpos por adsorção, verificaram a influência do caráter superficial (hidrofílico ou hidrofóbico) sobre a aglutinabilidade através do comportamento do copolímero estireno - hidroxietilmetacrilato (HEMA), quando este teve seu conteúdo de HEMA aumentado, aumentando sua hidrofilicidade como pode ser visto pela figura 33.

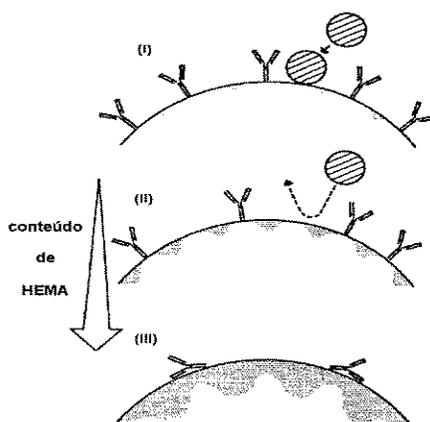


Figura 33: Representação esquemática dos estados de adsorção de anticorpos anti-BSA sobre partículas do copolímero P (S/ HEMA)

Okubo e col. observaram que à medida que foi aumentada a quantidade de HEMA na formulação do copolímero tornando-o mais hidrofílico, a quantidade de proteínas adsorvidas a estas superfícies diminuiu.

Estes autores verificaram que em partículas mais hidrofóbicas (I) os anticorpos adsorveram às superfícies da mesma forma que a verificada para o poliestireno, mostrando tanto reações imunológicas específicas como aglutinações não específicas.

Para partículas mais hidrofílicas (III), observaram que até mesmo nas regiões não cobertas pelo HEMA tornou-se difícil a ocorrência de aglutinações não específicas, contudo não ocorreram aglutinações imunológicas devido aos anticorpos terem adsorvido às superfícies de forma irregular, perdendo sua atividade imunológica.

Para partículas com um conteúdo de HEMA intermediário entre I e III, verificaram que os anticorpos adsorveram predominantemente na região hidrofóbica da superfície, enquanto que a região hidrofílica protegeu as partículas contra aglutinações não específicas.

A partir das análises de DSC que sugerem ter sido baixo o grau de funcionalização e com base nos estudos de Okubo e col., pode-se supor que a maior parte da superfície das partículas não foi coberta pelos grupos diazo, predominando então o caráter hidrofóbico do PS. Isto pode explicar as aglutinações não específicas observadas com soro negativo.

CAPÍTULO 4 - Conclusões

4. CONCLUSÕES

Síntese em emulsão do poliestireno: fixando-se as variáveis temperatura, agitação, tempo, quantidades de iniciador, monômero e água, e, variando somente a quantidade de emulsificante, obteve-se os seguintes resultados:

- aumentando a quantidade de emulsificante a porcentagem de conversão das sínteses diminuiu, possivelmente por ter se formado um elevado número de micelas e a quantidade de iniciador pode ter sido insuficiente frente ao número de micelas formadas, restando então no meio reacional algum monômero para ser polimerizado;
- os diâmetros médios das partículas variaram entre 0,06 μm e 0,2 μm e as distribuições dos diâmetros foram estreitas para todos os casos;
- as porcentagens de conversão para as sínteses S01 à S05 foram satisfatórias e variaram entre 82 e 98 % , estando a síntese S01 com um valor maior que o citado pela literatura (90 %);

Diâmetro das partículas: para utilização em testes de aglutinação deverá:

- ser maior que o testado neste trabalho ;
- ser suficientemente grande de modo a não causar problemas de obstrução das membranas de filtração e facilitar visualização da reação de aglutinação.

Análises morfológicas: através das micrografias pode se verificar:

- a homogeneidade na distribuição dos diâmetros das partículas anteriormente constatada pelas medidas feitas através do Coulter-Counter;
- aglomeração entre as partículas no poliestireno funcionalizado, que pode ter ocorrido devido à ação de forças de atração entre cargas adsorvidas na superfície das partículas e à ação das cargas dos grupos funcionais que foram ligados ao polímero.

Análises espectroscópicas: através das análises feitas pode se verificar:

- a ocorrência das reações de funcionalização, que foram demonstradas através das características espectrais específicas observadas para cada grupo funcional ligado ao polímero;

Nitração: dentre as etapas de modificação química:

- é a mais importante por ser a precursora e dela depender a eficiência das demais etapas; como supôs-se ter sido baixo o grau de nitração, as demais etapas da síntese provavelmente tiveram seu grau de funcionalização baixos.

Testes de aglutinação: tiveram neste trabalho um caráter qualitativo:

- mostraram que a aglutinação com o soro positivo foi muito mais intensa do que com o soro negativo, contudo, experimentos de otimização da técnica deverão ser feitos para a remoção da pequena atividade não específica observada;
- o látex de PDS sintetizado mostrou ser eficiente nas reações de aglutinação e a simplicidade, rapidez e baixo custo sugerem que esta técnica utilizando látex como suporte, pode ter grande utilidade em laboratórios de rotina diagnóstica.

CAPÍTULO 5 - Sugestões para trabalhos futuros

5 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diâmetro de partícula: para aumentar o diâmetro das partículas, sugere-se:

- fazer um planejamento estatístico que organize de forma sistemática as variáveis a serem testadas.

Aglomerção: com relação à estabilidade das partículas:

- melhorar o procedimento de lavagem e filtração com o objetivo de eliminar totalmente resíduos de reagentes em cada etapa da síntese.

Análises de caracterização: fazer Análise Elementar para conhecer as porcentagens de cada elemento presentes na composição do polímero e determinar o grau de funcionalização em cada etapa da síntese, a partir do que pode-se estudar qual é a porcentagem aproximada dos grupos funcionais por unidade de massa, que propiciem as melhores condições para a reação de aglutinação.

Nitração: pesquisar novos métodos para melhorar o processo de modo a garantir a eficiência de todas as etapas de funcionalização subsequentes à nitração.

Sensibilização: fazer experimentos a fim de se determinar as melhores condições de reação em termos de:

- concentração ótima de antígenos para sensibilização;
- pH ideal para sensibilização;
- tempo de incubação;
- acoplagem com diferentes tipos de antígenos para se conhecer a seletividade deste material.

CAPÍTULO 6 - Referências bibliográficas

6- Referências bibliográficas

- [1] - SUTHERLAND, G.B. e CAMPBELL, D.H.,(1958),J.Immunol.80:294
- [2] - CAMPBELL, D.H. et al.,(1951), Proc.Natl.Acad.Sci.,(U.S.A.),37:575
- [3] - GURVICH, A.E. et al.,(1961), Biokhimia,26:803
- [4] - JANGERDORFF,A.T. et al.,(1963),Biochim.Biophys.Acta.,78:516
- [5] - WEETALL,H.H. e WEKELY,N.,(1965),Biochem.Biophys.Acta.,107:150
- [6] - AXÉN,R. et al.,(1967),Chemical coupling of peptides by means of cyanogen halides.Nature, 214:1302
- [7] - PORATH, J. et al.,(1967), Chemical coupling of proteins to agarose. Nature,215:1491
- [8] - CARPENTER, R.R. e REESBERG, M.A.,(1968), J.Immunol. Meth.,100:873
- [9] - ENGVALL, E. e PERLMANN,P.,(1971), ELISA - Quantitative assay of immunoglobulin G.,Immunochemistry 8 (9):871
- [10] - ENGVALL,E. et al.,(1971), Biochem.Biophys.Acta.,251:427
- [11] - ENGVALL,E. e PERLMANN,P.,(1971), J.immunol.Meth.,109:129
- [12] - VOLLER,A. et al.,(1977), Microplat ELISA in virology. In: Chang, T.M.S., Ed.Biomedical application of immobilized enzymes and proteins.,Plenum Press.
- [13] - KATO, K. et al.,(1977), Use of rabbit antibody IgG loaded silicone pieces for the sandwich enzyme immunoassay of macromolecular antigens.,J.Biochem.,81:155
- [14] - CUATRECASAS, P.,(1970), J.Biol.Chem.,245:3059
- [15] - MARCIPAR, A. et al.,(1979), Polyamide-linked immunoabsorbents for diagnostics: *Trypanosoma cruzi* as model system. IRCS Medical Sci.,7:178
- [16] - HENDRY,R.M. e HERMANN,J.E.,(1980),Immobilization of antibodies on nylon for use in ELISA. J.Immunol.Meth.,35:285
- [17] - BITTENCOURT,E. et al.,(1983), Immunoassays conducted with resins treated nylon fabrics. J.Polymer Sci.: Polymers letters Ed.,21:717
- [18] - PERES,L.,(1986), Desenvolvimento e caracterização de imunossorventes e avaliação de desempenho em ensaios imunoenzimáticos. Tese de mestrado. FEQ - UNICAMP
- [19] - LENTFER, D.,(1987), Procedure for the irreversible binding of proteins onto polystyrene surfaces.U.S.Patent n° 4.654.299, mar.31,1987
- [20] - KONDO, A.,et al.,(1990), Immunological agglutination kinetics of latex particles with physically adsorbed antigens. J.Immunol.Meth.,135: 111-119

- [21] - RITTENBURG, J.H.,(1990), Fundamental of immunoassay. In: Development application of immunoassay for food analysis. 2 29-57, Elsevier Science Publishers Ltd.
- [22] - BIER, O.G. et al.,(1977), imunologia básica e aplicada.8: 130-155, Guanabara Koogan, 2 ed.
- [23] - REMBAUM. A. et al. (1979), Synthesis and reactions of hydrophilic functional microspheres for immunological studies. J.Macromol.Sci.Chem., A13(5),603- 632
- [24] - CATT, K. e TREGGAR, G.W., (1967), Science,158:1570-1572
- [25] - CATT, K. e TREGGAR, G.W., (1970), Clin.Chem.Acta., 27: 267-279
- [26] - ENGVALL, E.,(1977), ELISA In: Chang, T.M.S., Ed.Biomedical Appl. of immobilized enzymes and proteins. v.2,Plenum Press
- [27] - WOOD, W.G. e GADOW, A.,(1983),Immobilization of antibodies and antigens on macro solid phases - a comparison between adsorptive and covalent binding. A critical study of macro solid phases for use in immunoassays systems. Part I , J.Clin.Chem.Clin.Biochem.,21:789 -797
- [28] - ENGVALL, E.,(1980), Meth,Enzymol.,70:419-439
- [29] - CONRADIE, J.D. et al.,(1983), ELISA solid phase: partial denaturation of coating antibody yields a more efficient solid phase. J.Immunol.Meth.,59:289-299
- [30] - SHARAR, M. et al.,(1986),Synthesis and characteristics of microspheres of polystyrene derivatives. J.Polym.Sci.Polym.Chem.,24:203-213
- [31] - SINGER, J.M. e PLOTZ, C.M.,(1956), The latex fixation test: (I) Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. Am.J.Med.,21:888-892
- [32] - BLOOMFIELD, N. et al.,(1963), Detection of *Cryptococcus neoformans* antigens in body fluids by latex particle agglutination. Proc.Soc.Exp.Bio.Med.114: 64 - 7.
- [33] - HADFIELD, S.G. et al.,(1987), A novel coloured latex test for the detection and identification of more than one antigen. J.Immunol.Meth.,97: 153-158
- [34] - FAVARA, B.E. et al.,(1972), The antistreptolysin O latex test.,Am.J.Dis.Child.,123:462-464
- [35] - SATO, K. et al.(1987), Detection of toxoplasma IgM antibody by passive latex agglutination reaction.,J.Immunol.Meth.,101: 183-191
- [36] - SINGER, J.M. et al.(1957), The latex fixation test: (III) agglutination test for C-reactive protein and comparison with the capillary precipitin method.,Am.J.Clin.Pathol.,28: 611-617

- [37] - REMBAUM, A. et al., (1978), Labeled cells, Chem. Technol., 182
- [38] - MOLDAY, R.S. et al. (1977), Application of magnetic microspheres in labeling and separation of cells. Nature, 268:437
- [39] - WANG, S. e ZHANG, X. (1991), Polystyrene microspheres with narrow particle size distribution. Polymer for advanced technologies, 2: 93-95
- [40] - BOVEY, I.A. et al., (1955), Emulsion polymerization., Interscience, N.Y.
- [41] - VAN der HOFF et al., (1967), Solvent properties of surfactant solutions., v.II, p.285, Marcel Dekker
- [42] - VAN der HOFF et al., (1970), Clean Surfaces: their preparation and characterization for interfacial studies., p.15, Marcel Dekker
- [43] - NUSTAD, K. et al., Monodisperse polymer particles in immunoassays and cell separation. In: Microspheres: medical application, p.53-75
- [44] - GOODWIN, J.W. et al., (1978), Control of particle sizes in the formation of polymer latices. The British Polym. J., 10:73-180
- [45] - KINE, B.B. e REDLICH, G.H., (1988), The role of surfactants in emulsion polymerization. In: surfactants in chemical. Process Engineering, 28: 263-314, Marcel Dekker
- [46] - SEYMOUR, R.B. e CARRAHER, C.E., (1988), Polymerization techniques. In: Polymer chemistry, p.332-347, 2 ed., Marcel Dekker
- [47] - ODIAN, G., (1970), Emulsion Polymerization., In: Principles of polymerization. p.279-300, Ed. McGraw Hill, Inc.
- [48] - DUCK, E.W., (1971), Polymerizations reactions. In: Plastics and rubbers., p.40-43, Ed. Butterworth and Co (Publishers) Ltd.
- [49] - PIIRMA, I. (1982), The stability and instability of polymer latices. In: Emulsion polymerization., p.1-50, Ed. Academic Press
- [50] - KUO, P.L. e CHEN, C.J., (1993), Functional polymers for colloidal applications. V. Novel behavior of polymeric emulsifiers in emulsion polymerization. J. Polym. Sci. Part A: Polymer chemistry, 31: 99-111
- [51] - KAVAGUCHI, H. et al., (1984), Modification of polymer latex., J. Colloid and interface science., v.97, n^o 2
- [52] - KAVAGUCHI, H. et al., (1989), Fundamental Study on latex reagents for agglutination tests., Biomaterial v.10

- [53] - SCOUTEN, W.H.,(1983), Immobilized enzymes.,In: Solid phase biochemistry.,p.253-392, John Wiley e Sons Inc.
- [54] - MATSUDA, T. et al.,Modification and characterization of polystyrene surface used for cell culture.In: Biomedical application of polymer.,Ed.Harry P.Gregor
- [55] - HOBBS,R.N.,(1989), Solid-phase immunoassay of serum antibodies to peptides., J.Immunol.Meth.,117: 257-266
- [56] - TREVISAN,C.H.,(1990),Imobilização de glicose oxidase em suportes silícicos. Tese de Mestrado.,FEQ - UNICAMP
- [57] - ALINGER, N.L.,(1978),Química Orgânica, Ed.Guanabara Dois
- [58] - LIU, Y.C. et al.,(1989),Preparation of diazotized polystyrene latex and its use in agglutination assays.,J.Immunol.Meth.,124:159-163
- [59] - TUNCEL,A. e PINSKIN,E.(1991), Polystyrene latex particles: preparation and properties.,Biomat.,Art.Cells & Immob.Biotech.,19(1),229-253
- [60] - Encyclopedia of polymer science and engineering.,(1987),Emulsion polymerization,v.6,p.14,John Wiley &Sons, Inc.
- [61] - SHRINER,R.L. et al. (1983), Identificação sistemática dos compostos orgânicos.,p.186, 6 ed.,Guanabara Dois
- [62] - SUN,F. e RUCKENSTEIN,E.(1993), Preparation of high molecular weight monodisperse polystyrene latex by concentrated emulsion polymerization., J.Appl.Polymer Sci.,48: 1279-1288
- [63] - ALFREY,T. e GURNEE,E.F.,(1971),Polímeros orgânicos,cap.8.p.119,Ed.Edgard Blücher Ltda
- [64] - SILVERSTEIN.R.M. et al.,(1979), Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.,p.65-140,3a. edição, Guanabara Dois
- [65] - DOLLISH,F.R. et al.,(1974),Characteristic Raman frequencies of organic compounds.,Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- [66] - PHILIPPIDES,A. et al.,(1993),The nitration of polystyrene.,Polymer , 34 (16):3509 - 3513
- [67] - OKUBO, M. et al.,(1987),Immunoactivity of polymer microspheres with their hydrophilic / hydrophobic heterogeneous surface sensitized with an antibody., Colloid & Polymer Sci.,265: 1061-1066

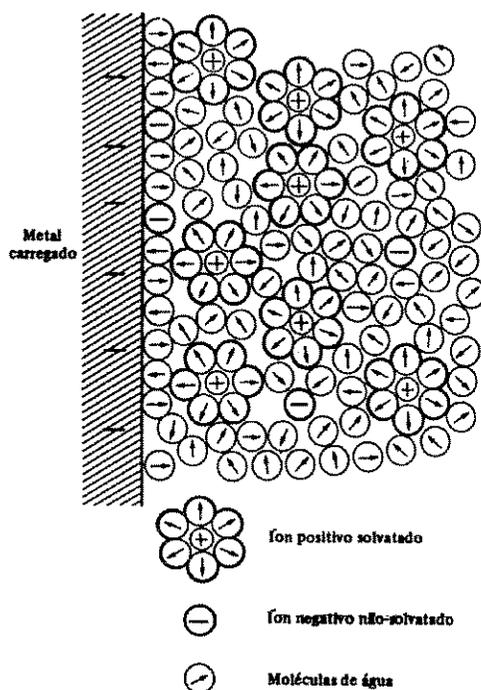
APÊNDICES

APÊNDICE (I)

FENÔMENOS ELÉTRICOS NAS INTERFACES - A DUPLA CAMADA

Quando duas fases de constituições químicas diferentes estão em contato, estabelece-se uma diferença de potencial elétrico entre as duas fases. Esta diferença de potencial é acompanhada por uma separação de cargas, sendo um dos lados da interface carregado positivamente e o outro negativamente. Por simplicidade, assumiremos que uma fase é um metal e a outra uma solução eletrolítica, sendo este metal carregado positivamente e a solução possuindo carga negativa de mesmo valor absoluto.

Em um modelo elegante e bem sucedido, Grahame reconheceu dois planos de íons. O mais próximo da superfície é o plano de maior proximidade dos centros dos ânions adsorvidos quimicamente à superfície do metal; este é o chamado plano interno de Helmholtz. Além deste plano, começa a camada difusa que está à distância de maior proximidade dos centros dos cátions hidratados. Este modelo representado na figura abaixo, tem sido usado com bastante sucesso na interpretação de fenômenos associados à dupla camada elétrica.



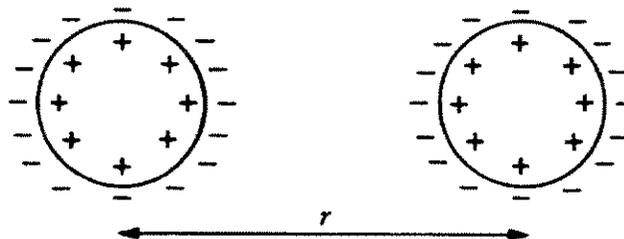
APÊNDICE (II)

A DUPLA CAMADA ELÉTRICA E A ESTABILIDADE DOS COLÓIDES

Há duas subdivisões clássicas nos sistemas coloidais:

- colóides líofilos: também chamados gel;
- colóides líofobos : também chamados sol.

Os colóides líofobos são, invariavelmente, substâncias altamente insolúveis no meio de dispersão. A estabilidade de um colóide líofobo é uma consequência da dupla camada elétrica na superfície das partículas coloidais. Por exemplo, se duas partículas de um material insolúvel não possuem uma dupla camada, elas podem aproximar-se o suficiente para que a força atrativa de Van der Waals possa fazê-las ficar juntas. Em contraste a este comportamento, se por exemplo duas partículas, como mostra a figura abaixo, têm uma dupla camada, elas se repelem a grandes distâncias de separação.



Esta repulsão impede uma proximidade maior das partículas e estabiliza o colóide. A adição de eletrólitos ao sol suprime a dupla camada difusa, isto reduz drasticamente a repulsão eletrostática entre as partículas e precipita o colóide.

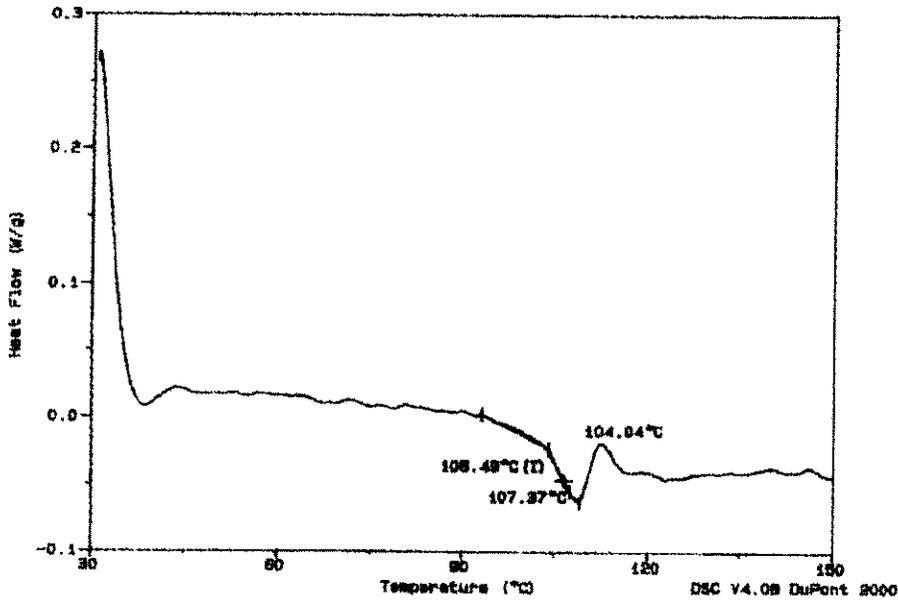
Os colóides são particularmente sensíveis aos íons de sinal oposto. Um íon que possui a mesma carga da partícula coloidal não tem muito efeito sobre a coagulação, exceto pela supressão da camada difusa. Quanto maior a carga do íon, maior a sua eficiência na coagulação do colóide.

APÊNDICE (III)

ANÁLISES DE DSC

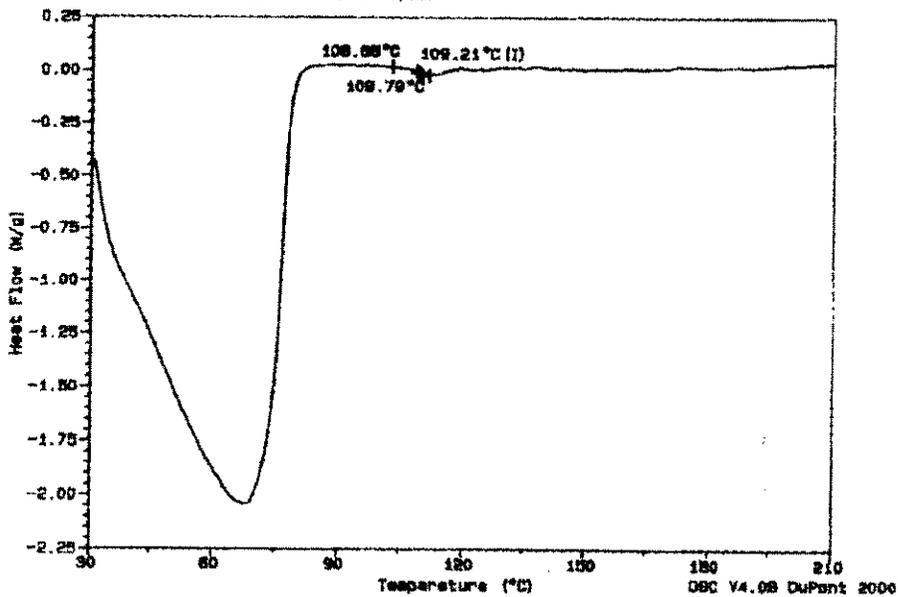
Sample: P901-AMOSTRA 1
 Size: 4.9500 mg
 Method: LUCIA
 Comment: EG. 30°C AQ. 220° RAMPA 10°C/MIN

DSC



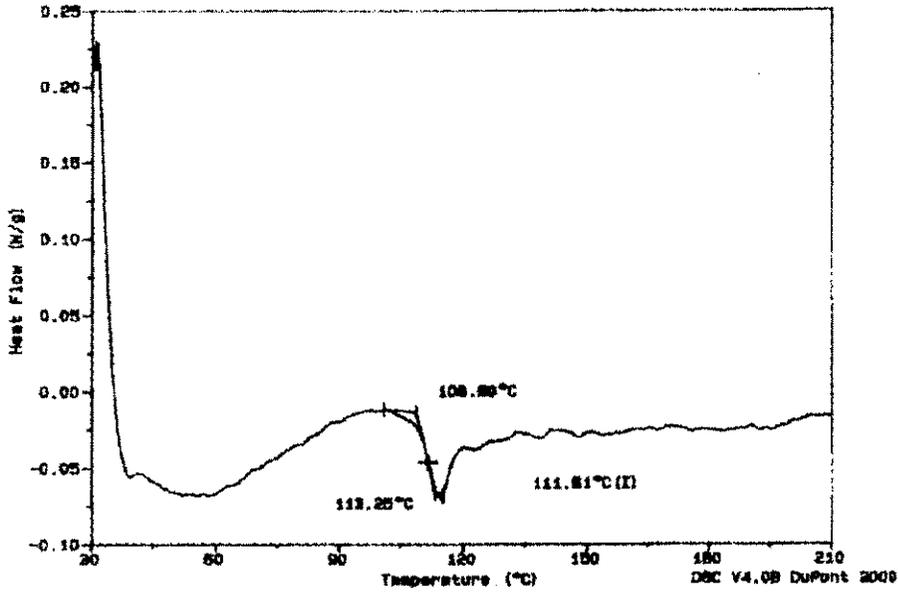
Sample: P901-AMOSTRA 2
 Size: 0.1300 mg
 Method: LUCIA
 Comment: EG. 30°C AQ. 220° RAMPA 10°C/MIN

DSC



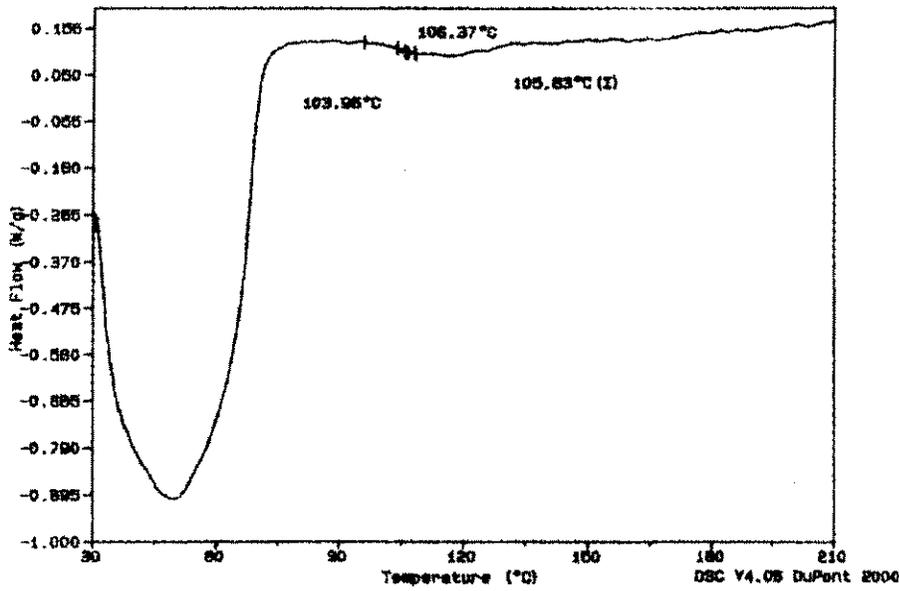
Sample: PASO1-AMOSTRA 3
 Size: 4.8800 mg
 Method: LUCIA
 Comment: EG, 30°C AR, 220° RAMPA 10°C/MIN

DSC



Sample: PDE-AMOSTRA 5
 Size: 4.2100 mg
 Method: LUCIA
 Comment: EG, 30°C AR, 220° RAMPA 10°C/MIN

DSC



Sample: P0801/ALB-AMOSTRA 4
 Size: 9.7000 mg
 Method: LUCIA
 Comment: EQ. 90°C AD. 220° RAMPA 10°C/MIN

DSC

