

**ELIS MOURA STORI**

**ESTUDO MORFOLÓGICO DE MICRO-PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO  
PRODUZIDAS POR ELETROSPRAY PARA USO EM SISTEMAS DE  
DIAGNÓSTICO**

**Orientador: Prof. Dr. Cyro Ketzer Saul**

**Curitiba  
2010**

**ELIS MOURA STORI**

**ESTUDO MORFOLÓGICO DE MICRO-PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO  
PRODUZIDAS POR ELETROSPRAY PARA USO EM SISTEMAS DE  
DIAGNÓSTICO**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre. Área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Cyro Ketzer Saul**

**Curitiba  
2010**



*“Os caminhos que conduzem o homem ao saber são tão maravilhosos quanto o próprio saber.” (Johannes Kepler)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Airton e Valéria, pelo carinho, dedicação e amor incondicional ao longo de toda a minha vida.

Ao meu namorado Dario pelo carinho, amor e compreensão a mim dedicados nos últimos anos.

Ao meu irmão, Rafael, pelo companheirismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Cyro Ketzer Saul pelas orientações e apoio ao longo deste trabalho de pesquisa.

Aos meus amigos, Andressa, César, Lucieli, Caroline, Natasha e Thiago, cujo companheirismo e amizade foram de fundamental importância nos últimos anos.

Aos colegas do Laboratório de Inovação Tecnológica em Sensores pelas oportunidades de trocas de informações e opiniões.

À CAPES e ao IBMP pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Wido Herwig Schreiner pelo apoio e colaboração e pelas análises de XPS.

Ao Leonardo Foti do IBMP pelo auxílio com a ativação das micropartículas de PS.

Ao Prof. Dr. Cezar Petzhold e à aluna de mestrado Paula Poli (ambos do IQ-UFRGS) pelo fornecimento de PS.

À Innova – Petrobrás pelo fornecimento de PS.

Ao CPqD pelo fornecimento de equipamentos.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Lucimara Romagna Stolz (Flexitec) pelo fornecimento de lâminas de FTO.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Resumo .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>viii</b>
<b>Capítulo 1 – Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aspectos Gerais .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Objetivo Geral .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>2</b>
<b>Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Eletrospray .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Micro-contas utilizadas em sistemas de diagnóstico .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Poliestireno .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4 Fabricação de micro-partículas por emulsão .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Métodos de Microscopia .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.2 Microscopia Confocal de Varredura a Laser .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) .....</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo 3 – Materiais e Métodos .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Eletrospray .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Estudo Morfológico .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Ativação Biológica das Micro-partículas .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Análise Química por XPS .....</b>	<b>24</b>
<b>Capítulo 4 – Resultados e Discussões .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Estudo Morfológico .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.1 Taxa de Vazão .....</b>	<b>26</b>

<b>4.1.2 Campo Elétrico .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.3 Massa Molecular e Concentração .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.4 Solvente .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1.5 PS Carboxilado .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Ativação Biológicas das Micro-partículas .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Análise Química por XPS .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Micro-esferas aptas para utilização em sistemas de diagnóstico .....</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo 5 – Conclusões .....</b>	<b>47</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>48</b>

## RESUMO

A técnica de eletrospray consiste em ejetar uma solução polimérica carregada através de um campo elétrico. Devido às instabilidades eletrohidrodinâmicas, a solução se converte em uma pluma de gotículas ou de filamentos líquidos que se depositam em um substrato. Este trabalho teve como objetivo a análise de micro-estruturas de poliestireno (PS) depositadas por eletrospray/eletrospinning, levando-se em consideração os diferentes parâmetros de deposição como taxa de vazão, campo elétrico aplicado, massa molecular do polímero utilizado, concentrações das soluções poliméricas, características físicas dos solventes utilizados (ponto de ebulição, viscosidade absoluta e tensão superficial) e o caráter de acidez do PS utilizado (utilizando-se o copolímero PS carboxilado) visando o uso em sistemas de diagnósticos. Foram feitos estudos morfológicos das estruturas depositadas, os quais envolveram análise de distribuição de tamanho e características da superfície das estruturas. Grande parte dos dados obtidos é consistente em relação à bibliografia consultada, o que indica que se tem um controle razoável da técnica. Ao efetuar o teste de bio-ativação, obteve-se um resultado inesperado, sendo que partículas sem carboxila, que não deveriam ser biologicamente sensíveis, foram ativadas no ensaio biológico. Isso levou a uma análise mais detalhada da composição química das partículas depositadas pelo método e pôde-se constatar que, quando depositadas em um meio aquoso e iônico, as partículas, anteriormente compostas de PS puro, passam a possuir carboxila. Esse fato indica que as moléculas de poliestireno recebem uma carga elétrica alta o suficiente para ionizarem e receberem os íons presentes na água, formando carboxila. Este resultado se mostrou muito surpreendente e conveniente, uma vez que o polímero PS é muito mais facilmente obtido do que o copolímero PS carboxilado, de difícil síntese e que se mostra resistente em formar uma partícula esférica quando depositado por eletrospray. Os resultados obtidos oferecem uma rota alternativa de produção de particulado biologicamente ativo para emprego em diagnóstico.

## ABSTRACT

The technique of electrospray consists in ejecting a charged polymeric solution through an electric field. Due to the electrohydrodynamic instabilities, the solution converts to a plume of small droplets or liquid filaments that are deposited in a substrate. This work had as objective the analysis of microstructures of polystyrene (PS) deposited by electrospray/electrospinning, considering the different deposition parameters as flow rate, applied electric field, molecular weight of the polymer, polymeric solution concentration, physical characteristics of the used solvents (boiling point, absolute viscosity and surface tension) and acid character of the PS (using the carboxylated PS copolymer) aiming at their use in diagnosis systems. Morphological studies of the deposited structures were made, which involved size distribution analysis and surface characteristics of the structures. Great part of the obtained data is consistent to the consulted bibliography, what indicates that we managed to have a reasonable control of the deposition method. When the bio-activation test was done, an unexpected result was obtained, the non-carboxylated particles, which should not be biologically sensitive, were activated during the biologic assay. This led to a more detailed analysis of the chemical composition of the particles deposited by the method and it could be noted that, when deposit in an watery an ionic medium, the particles, previously made of common PS, begin to present carboxyl. This fact indicates that the polystyrene molecules receive a high enough electric charge to ionize and receive the ions present in the water, forming the carboxyl. This result was unexpected and convenient, since the common PS much more easily obtained than de carboxylated PS copolymer, witch is difficult to synthesize and shows itself resistant to form spherical particles when deposited by electrospray. The obtained results offer an alternative route for the production of biologically active particulate for diagnostic applications.

# Capítulo 1. Introdução

## 1.1. Aspectos Gerais

É notável o quanto o mundo atual é baseado em nanotecnologia, tudo tende a ser diminuído não só pela praticidade, mas pelas propriedades físicas que caracterizam essa diminuição. Juntamente com esses estudos, caminha a preocupação do ser humano em se manter vivo por mais tempo, de forma que a pesquisa na área biomédica está em expansão.

Para tal é importante que se desenvolvam dispositivos cada vez mais inovadores que estejam ligados à saúde do ser humano. Estão todos em busca da tecnologia que ocupe menos espaço, seja mais lucrativa e mais eficiente.

O estudo de pequenas estruturas envolve o conceito de razão área/volume. Considerando um objeto esférico, seu raio será sua dimensão característica ( $l$ ). Considerando sua área e seu volume, a razão  $R$  entre sua área e seu volume é proporcional ao inverso da dimensão característica  $R \sim l^{-1}$ .

Desta forma, quando o tamanho de algo é diminuído a micrômetros ou nanômetros, a razão  $R$  é proporcional a  $10^6$  e  $10^9$  respectivamente, ou seja, é muito alta. No caso de sensores biológicos, que é um dos grandes interesses hoje em dia, isto significa uma maior área de interação entre o sensor biológico e o analito. Isto representa menor gasto de material, necessidade de menores quantidades de amostras biológicas (sangue, urina, linfa, ou outros tecidos biológicos) e uma maior eficiência. [1]

Uma das maneiras de se obter nano e micro-partículas é a técnica de eletrospray. Ela foi amplamente utilizada para outras finalidades, como espectrometria de massa, e sua irmã gêmea, a técnica de eletrospinning, utilizada para a fabricação de micro e nano-fibras. Porém somente recentemente as atenções se voltaram à técnica como um método de fabricação de pequenas partículas [2,3].

O interesse pela técnica durante este trabalho, que até então era conhecida como eletrospinning, levou à sua exploração de forma que se pudesse fabricar partículas poliméricas [4] além das fibras comumente presentes na pesquisa bibliográfica inicial, antes que fosse consultada uma

bibliografia mais especificamente voltada à utilização da técnica para fabricação de micro e nano-partículas.

O método de eletrospray consiste em ejetar uma solução polimérica carregada através de um campo elétrico. A gota de solução sofre um alongamento e devido à instabilidade eletrohidrodinâmica há a ruptura da mesma em um filamento microscópico de solução que mais tarde se rompe em uma pluma de gotículas micrométricas que podem sofrer outras quebras ao longo da trajetória até o anteparo. [5,2]

Nesse trabalho foi estudada a possibilidade de utilização de micro-partículas depositadas pela técnica de eletrospray em sistemas de diagnóstico baseados em fluorescência.

## ***1.2. Objetivo Geral***

Os objetivos desse trabalho consistem na fabricação e caracterização de micro-partículas de poliestireno depositadas pela técnica de eletrospray quanto à sua morfologia e possibilidade de utilização em sistemas de diagnóstico.

### ***1.2.1. Objetivos Específicos***

- Caracterizar morfologicamente as micro-partículas quanto aos seguintes parâmetros: taxa de deposição, concentração da solução depositada, massa molecular do polímero utilizado, campo elétrico aplicado, solvente utilizado nas soluções e acidez do PS utilizado (carboxilado ou não).

- Estudar a bio-ativação das partículas empregando técnicas específicas a utilização em sistemas de diagnóstico.



# Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

## 2.1. Eletrospray

Em 1882, Lord Rayleigh, constatou que se uma gota de líquido for submetida a uma carga excessiva sofre uma ruptura assim que a força repulsiva entre as cargas na superfície da gota excede a tensão superficial da mesma [5,6]. A chance de ruptura da gota pode ser descrita pela “fissibilidade” ou limite de Rayleigh  $X$ , determinada pela razão entre a força eletrostática repulsiva e a tensão superficial.

$$X = \frac{q^2}{64\pi^2\sigma\epsilon_0 R^3} \leq 1 \quad \text{Eq. (1)}$$

Conforme demonstrado por Rayleigh, para  $X < 1$  a forma esférica da gota carregada é preservada, mas conforme  $X$  se aproxima de 1 a repulsão de cargas causa uma instabilidade da forma e, assim, uma alongação da gota, que se transforma em uma elipsóide. Com a contínua alongação, ocorre uma ruptura na gota em duas gotas menores e idênticas e de mesma carga. O caso em que  $X \gg 1$  foi descrito por Rayleigh com as seguintes palavras: “o líquido é ejetado em jatos finos, cujo estreitamento tem um limite”. [5] Experimentos modernos mostraram que a ruptura de gotas foi observada, para a maioria dos casos, abaixo do limite de Rayleigh, mas que esse parâmetro é importante para a compreensão da ruptura de gotas altamente carregadas de vários líquidos. [6; 5]

Esse princípio é fundamental para o entendimento do funcionamento da técnica de eletrospray ou eletrospinning. A técnica consiste em ejetar uma solução polimérica carregada através de um campo elétrico em direção a um anteparo aterrado. Enquanto o líquido é bombeado através de um capilar, a gota que é formada na ponta se deforma devido ao campo elétrico, assumindo uma forma cônica cuja extremidade possui dimensões micrométricas, conhecida como cone de Taylor [7,2,5]. Quando o campo elétrico é forte o suficiente para romper a tensão superficial do líquido um filamento capilar é ejetado da ponta do cone de Taylor, que se rompe em múltiplos capilares de diâmetros ainda menores devido à instabilidade de Rayleigh do líquido

carregado [5,2]. O primeiro registro desse fenômeno foi feita por John Zeleny em 1914 [5,8] e a física da interação de um líquido em capilares com campos elétricos foi estabelecida por Taylor há 40 anos [5]. Um detalhe do cone de Taylor pode ser observado na figura 2.1.

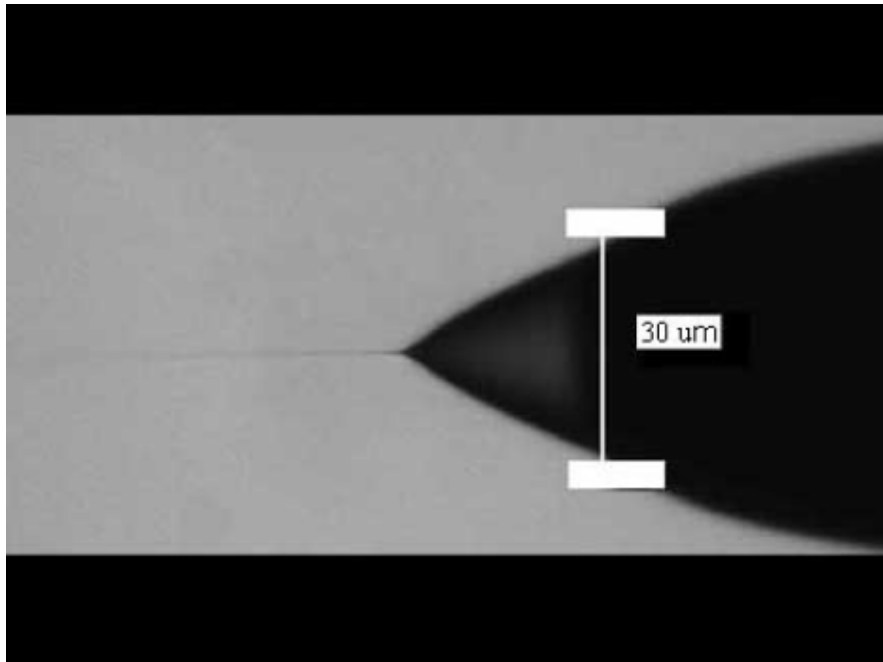


Figura 2.1: Detalhe de um jato capilar sendo ejetado do cone de Taylor. [5]

Para fluídos de baixa viscosidade cada capilar da solução se rompe em micro/nano gotas (ou uma pluma). Durante a viagem das gotas em direção ao anteparo elas perdem líquido devido à evaporação, causando um aumento da concentração do soluto e da densidade superficial de carga. Com isto ocorrem rupturas devido à força coulombiana e se reduz ainda mais o diâmetro das gotas que se depositam no substrato, como pode ser observado esquematicamente na figura 2.2. Nesse caso a técnica leva o nome de eletrospray [5].

Para soluções com mais alta viscosidade não há o rompimento dos filamentos secundários em pluma e ocorre a deposição de fibras sobre o substrato. Neste caso a técnica leva o nome de eletrospinning [2]. Um diagrama esquemático da técnica pode ser observado na figura 2.3.

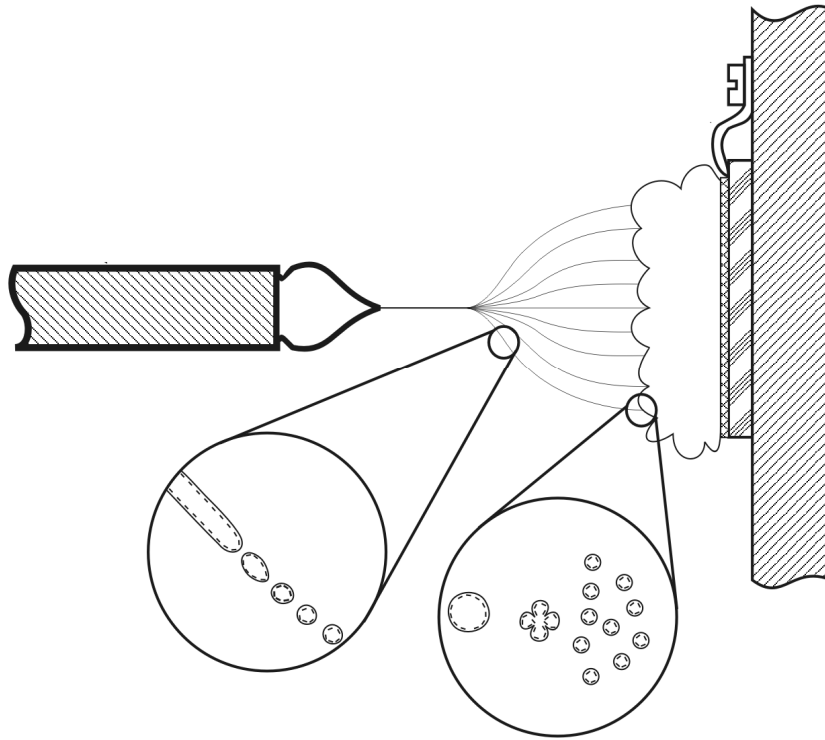


Figura 2.2: Esquema da ruptura dos filamentos em uma pluma (micro/nano gotas)

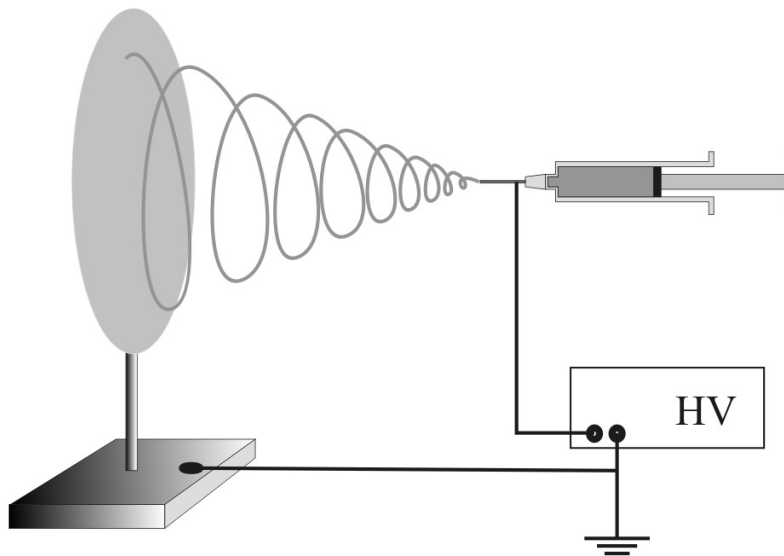


Figura 2.3: Diagrama esquemático do equipamento utilizado em ambos os métodos de eletrospinning e eletrospray.

As estruturas depositadas por eletrospray/eletrospinning são de três naturezas, como pode ser observado na figura 2.4: contas, fibras com contas e

fibras livres de contas. O que determina a estrutura a ser depositada é o grau de emaranhamento das moléculas contidas na solução polimérica. Para maiores graus de emaranhamento, se observa a formação predominante de fibras. Para graus intermediários, há a formação de micro-contas (*beads*) ao longo das fibras. Para graus mínimos de emaranhamento ocorre somente a formação de micro-contas [6].

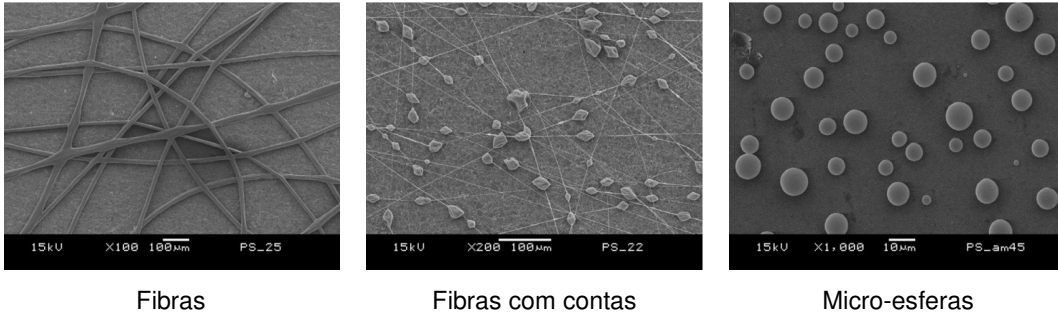


Figura 2.4: Diferentes morfologias obtidas ao realizar o processo de eletrospinning/eletrospray com soluções de PS em função da viscosidade da solução (imagens obtidas neste trabalho)

Em uma solução uma molécula polimérica pode assumir uma conformação que é confinada em um volume conhecido como volume hidrodinâmico. Para soluções bem diluídas estes volumes que contêm as moléculas estão suficientemente dispersos no solvente para que não ocorram interações apreciáveis entre as moléculas poliméricas. Há uma concentração limite de soluções diluídas  $C^*$  na qual os volumes hidrodinâmicos começam a se, e há uma concentração  $C_e$ , chamada de concentração de emaranhamento, que separa os regimes de solução semi-diluída emaranhada e semi-diluída não emaranhada. Essas duas concentrações críticas são importantes para prever o grau de emaranhamento da solução. São dadas por

$$C^* \approx \frac{1}{[\eta]} \quad \text{Eq. (2)}$$

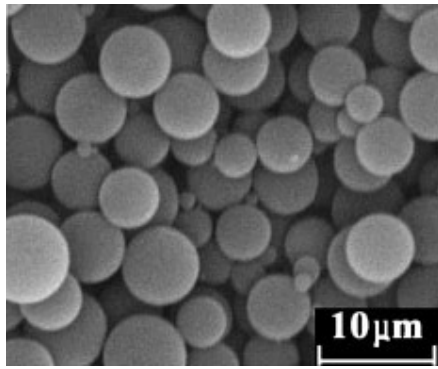
$$C_e \approx \frac{\rho M_e^0}{M} \quad \text{Eq. (3)}$$

em que  $[\eta]$  é a viscosidade intrínseca,  $M$  a massa molecular do polímero,  $\rho$  sua densidade e  $M_e^0$  a massa molecular média entre emaranhamentos no polímero não diluído. Estruturas fibrosas estáveis são observadas quando  $C > C_e$ . As fibras com contas aparecem quando  $C \approx C_e$ , e há a dominância de contas quando  $C^* > C > C_e$ . [6].

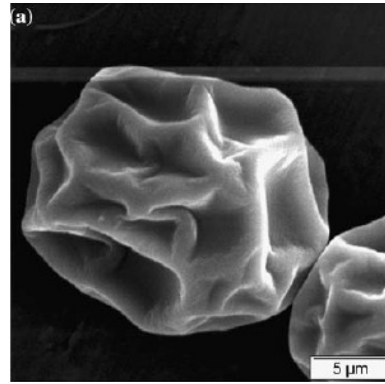
D. Fantini *et al.* sugerem que, como a quantidade de solvente na solução afeta a morfologia das contas, quanto menor a concentração, mais irregulares são as mesmas. Portanto para se obterem esferas, o ideal é usar maiores concentrações e massas moleculares menores.

As próprias micro-partículas podem assumir diferentes morfologias, como formatos de esferas, uvas-passas, cascas ocas, copos, pratos, toróides, entre outros. Em geral as partículas são rugosas e irregulares, o que sugere que uma casca polimérica se forma durante o vôo da partícula em direção ao anteparo, sendo que o interior da partícula continua úmido de solvente. Se a casca for suficientemente resistente ela não colapsa e uma partícula oca pode ser formada. Caso contrário, há a formação das estruturas tipo copos e pratos. As partículas em forma de pratos têm bordas, o que sugere que a solução é empurrada para as extremidades, quando a partícula colapsa, e que, portanto, os toróides são formados pelo stress radial causado pela evaporação do solvente das bordas [6,9]. Algumas destas estruturas podem ser observadas na figura 2.5.

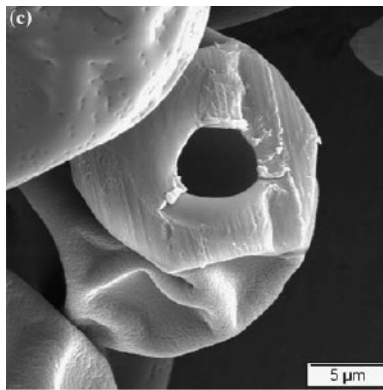
As estruturas depositadas podem conter poros ou não (figura 2.6), cuja formação é uma combinação de vários fatores e parâmetros, como umidade do ar, velocidade de deposição do solvente, massa molecular, poli-dispersão do polímero, entre outros [6, 7]. Casper *et al.* [apud 6] sugerem que a formação de poros é um processo complexo que pode vincular uma seqüência de eventos, envolvendo separação de fase [9]. G. Eda *et al.*, observando que nas estruturas em forma de copos os poros internos são maiores que os poros externos, sugere que o tamanho do poro pode depender dos estresses sofridos devido ao colapso da partícula.



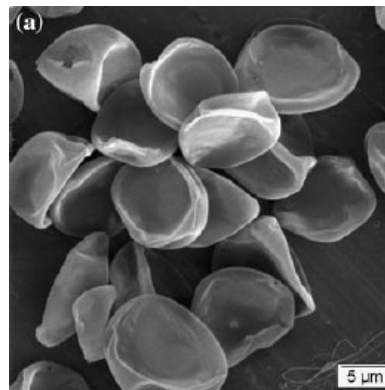
(a)



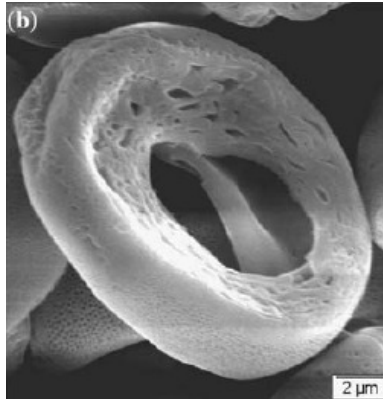
(b)



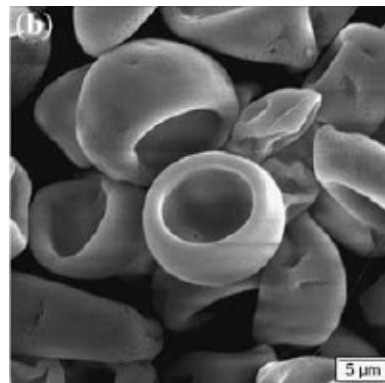
(c)



(d)

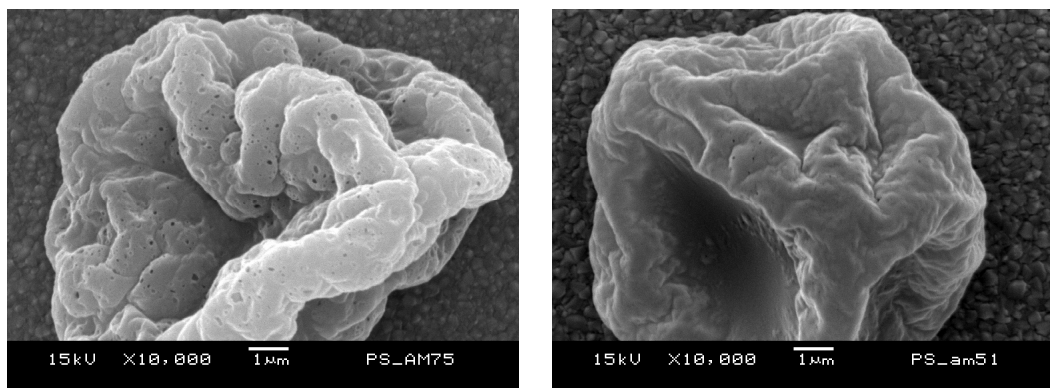


(e)



(f)

Figura 2.5: Diferentes formas de partículas depositadas por eletrospray: (a) micro-esferas [2] (b) uva-passa, (c) casca polimérica oca, (d) pratos, (e) toróides, (f) copos [6]



(a)

(b)

Figura 2.6: Partículas de PS (a) com poros (b) sólida (imagens obtidas neste trabalho)

O diâmetro das estruturas depende da concentração da solução utilizada e por isto, no caso do eletrospinning, quanto menor a concentração, menor o diâmetro das fibras e, no caso do eletrospray, quanto menor a concentração, menor o diâmetro da partícula. Desta forma, para a obtenção de fibras de menor diâmetro, o aparecimento das contas ao longo das mesmas sempre foi encarado como um problema a ser eliminado, sendo que uma tentativa de evitá-las foi o aumento da condutividade das soluções com a adição de sais. Mais recentemente surgiu o interesse em estudar justamente essas estruturas [1,2,10,11]. Os estudos realizados neste trabalho se basearam no interesse em explorar a técnica, até então conhecida eletrospinning, para a fabricação de micro-partículas polimérica ao invés de fibras, comumente abordadas na pesquisa bibliográfica inicial [4].

Outro parâmetro importante para o tamanho da partícula é a taxa de bombeamento à qual a solução é submetida. De acordo com estudos realizados por C. H. Park *et al.*, o tamanho médio das partículas aumenta com o aumento desta taxa. A voltagem também exerce influência sobre o tamanho da partícula, mas não de forma direta, já que ela é responsável pela forma do jato de solução a ser depositada. Como pode ser observado na figura 2.7, para voltagens abaixo da voltagem crítica, a gota de solução simplesmente pinga, sem sofrer efeito do campo para formar a pluma. Para a voltagem crítica há a formação do cone de Taylor e o jato é estável, para voltagens acima da crítica o jato se curva em diferentes ângulos e voltagens ainda mais altas geram jatos múltiplos.

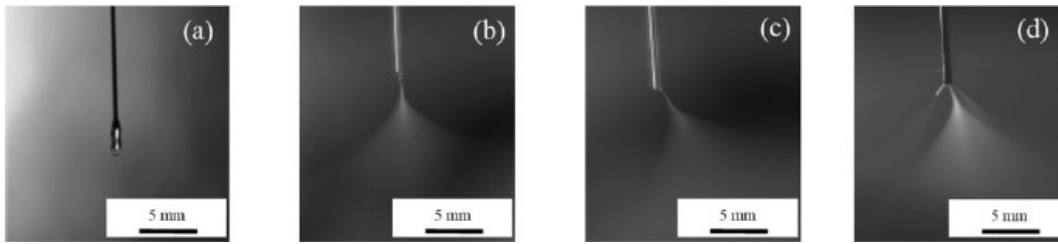


Figura 2.7: Mudança no jato devido ao aumento da tensão aplicada entre agulha e substrato [9]

Na figura 2.8 pode-se observar o aumento do tamanho médio da partícula com a taxa de vazão. Com relação ao aumento da tensão aplicada, para o modo de mono-jato, o tamanho médio das partículas não sofre alteração significativa, mas isto muda quando há múltiplos jatos, resultando em partículas menores. No entanto, a distribuição de tamanhos é mais larga, o que indica uma não uniformidade nas forças eletrohidrodinâmicas [9].

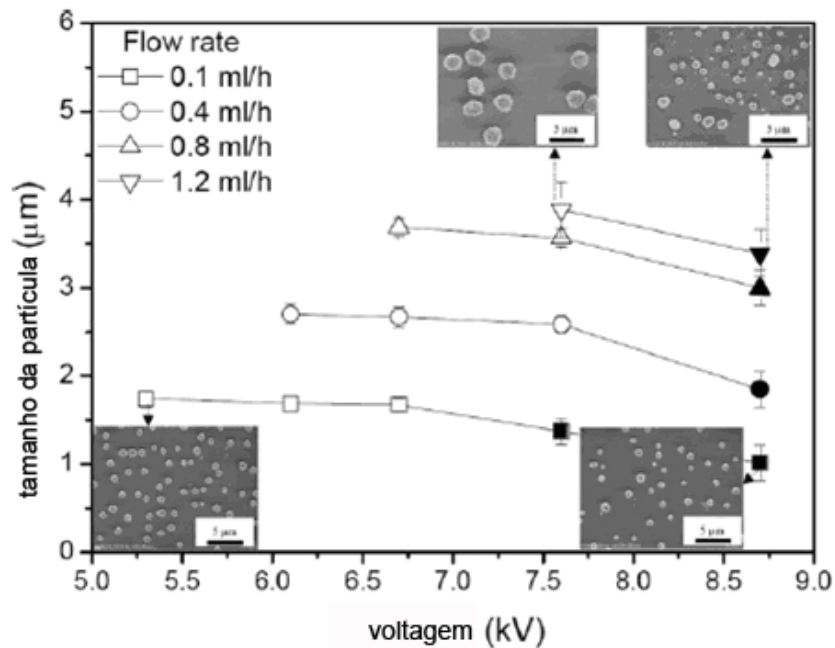


Figura 2.8: Tamanho médio das partículas em função da taxa de vazão e do campo elétrico aplicado [adaptado de 9].

O solvente utilizado exerce influência não só no tamanho das partículas, como também em seu formato e sua porosidade. Como pode ser observado na figura 2.9, em um estudo também realizado por C.H. Park *et al.*, o tamanho das partículas têm alteração conforme o ponto de ebulição do solvente, quanto maior esta temperatura, menor o tamanho médio das



partículas depositadas. Quanto ao formato, para maiores temperaturas de ebulição (em geral  $>150^{\circ}\text{C}$ ) as partículas são esféricas e suas superfícies se mostram menos rugosas [9].

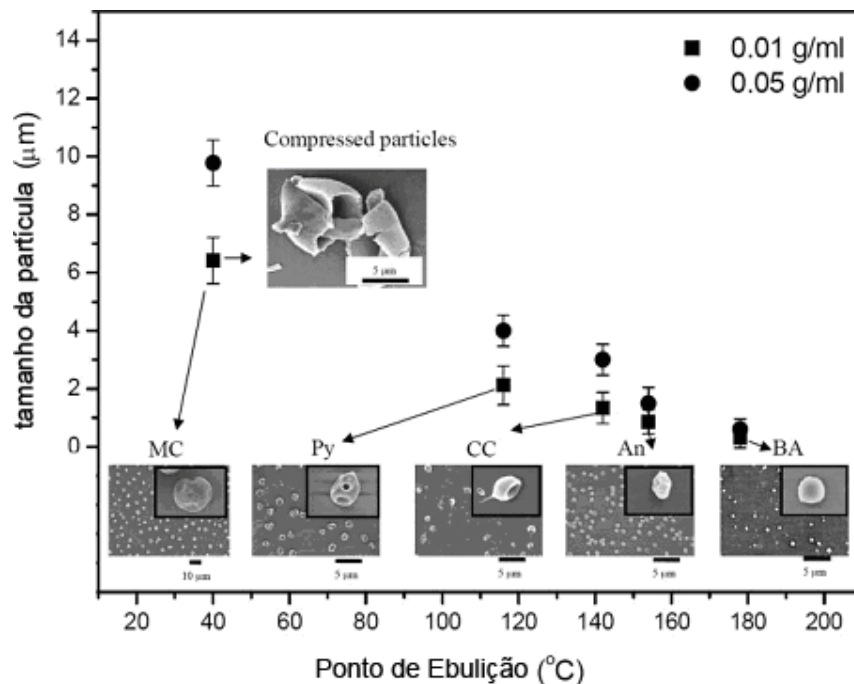


Figura 2.9: Tamanho médio das partículas em função da concentração da solução depositada e do ponto de ebulição do solvente [ adaptado de 9].

## 2.2. Micro-contas utilizadas em sistemas de diagnóstico

A utilização de pequenas partículas em sistemas de diagnósticos permite que os ensaios sejam realizados em três dimensões ao invés de em uma superfície plana. Micro-partículas têm uma maior razão área/volume, sendo necessária uma menor quantidade de material, o que possibilita uma maior quantidade de análises.

A empresa Luminex (Austin, Texas) desenvolveu micro-esferas codificadas com fluoróforos, que podem ser revestidas com vários tipos de ligantes. Quando as partículas são submetidas a uma solução contendo certo tipo de analito, a partícula revestida com o ligante compatível irá capturar o analito e uma molécula repórter rotulada por fluorescência irá conectar-se ao

analito. As esferas, então, passam por um equipamento de citometria de fluxo, em que os rótulos fluorescentes são iluminados por laser. A fluorescência resultante da esfera e da molécula repórter dá informações sobre a natureza e a quantidade da molécula capturada [12]. Uma imagem ilustrativa de como o processo de bio-deteção ocorre pode ser vista na figura 2.10.

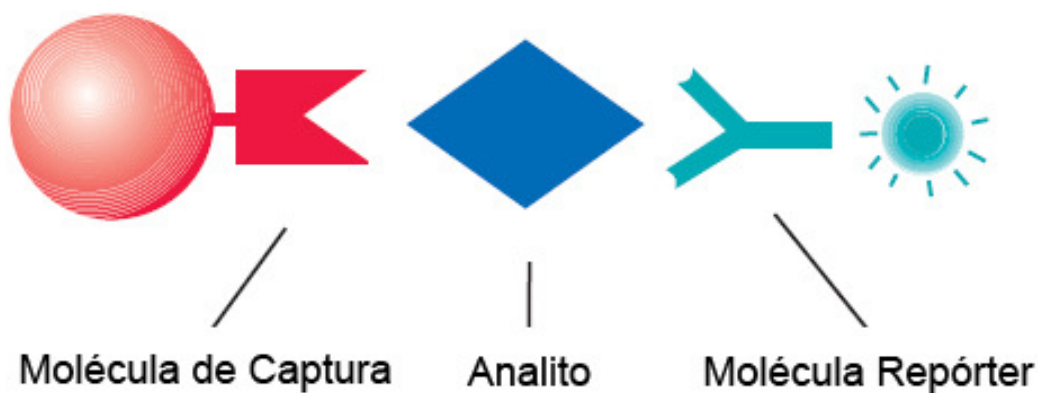


Figura 2.10: Esquema de detecção de um analito por uma micro-esfera ativada por uma molécula ligante de captura. [adaptado de 13]

O processo de revestir um ligante a uma partícula, se chama imobilização do ligante ou da biomolécula, que pode se dar de duas formas: adsorção, que se baseia em interações não covalentes (ou seja, de natureza física) ou ligação covalente de grupos funcionais específicos a superfícies funcionalizadas.

A ligação covalente permite um acoplamento muito forte e os grupos mais comumente utilizados para este tipo de acoplamento são os radicais amino, carboxi, hidroxil e tiol. Desta forma, grupos semelhantes devem estar presentes na superfície da partícula a ser ativada e, para tal, geralmente é necessária uma funcionalização ou modificação da mesma [14].

Esta modificação deve permitir o acoplamento da biomolécula sem que haja desnaturação ou desativação e tampouco deve gerar fluorescência para não interferir na análise [15].

O tipo de modificação de interesse para este trabalho é a adição de moléculas do grupo das carboxilas (COOH) na superfície das partículas. Através da ativação destas partículas carboxiladas com EDC (*1-Ethyl-3-(3-*

*dimethylaminopropyl)carbodiimide*) e S-NHS (*sulfo-N-Hydroxysuccinimide*), qualquer molécula contendo moléculas livres do grupo amino pode ser acoplada e imobilizada nas micro-partículas. A maneira com que isso ocorre pode ser observada esquematicamente na figura 2.11.

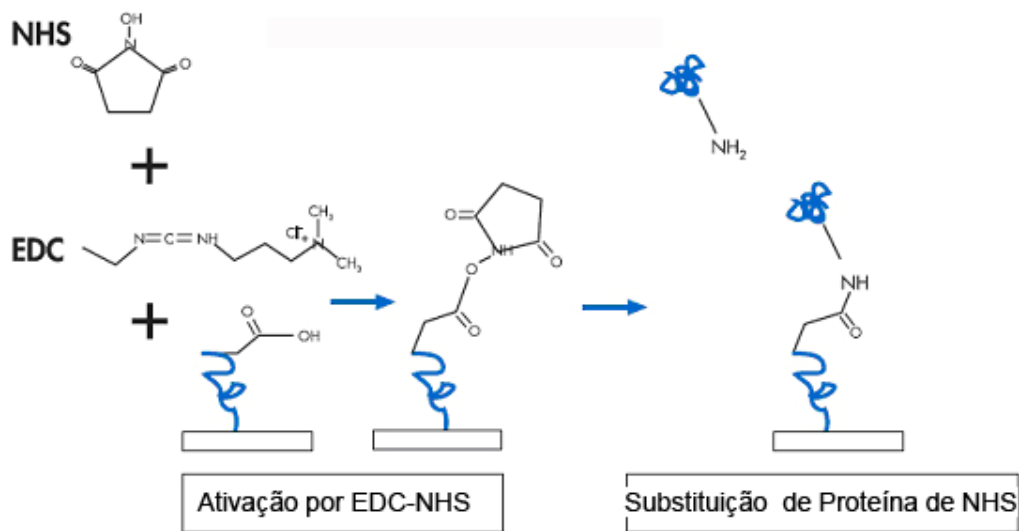


Figura 2.11: Ativação de uma molécula carboxilada e detecção de uma molécula do grupo amina [adaptado de 13]

## 2.3. Poliestireno

O poliestireno é um polímero linear de grande peso molecular de formula molecular,  $[-CH(C_6H_5)CH_2-]_n$ . Este é um polímero estável, de fácil fabricação e de baixo custo. Sua fórmula estrutural pode ser observada na figura 2.12 [16].

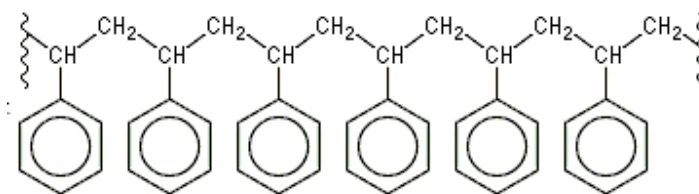


Figura 2.12: Fórmula estrutural do poliestireno

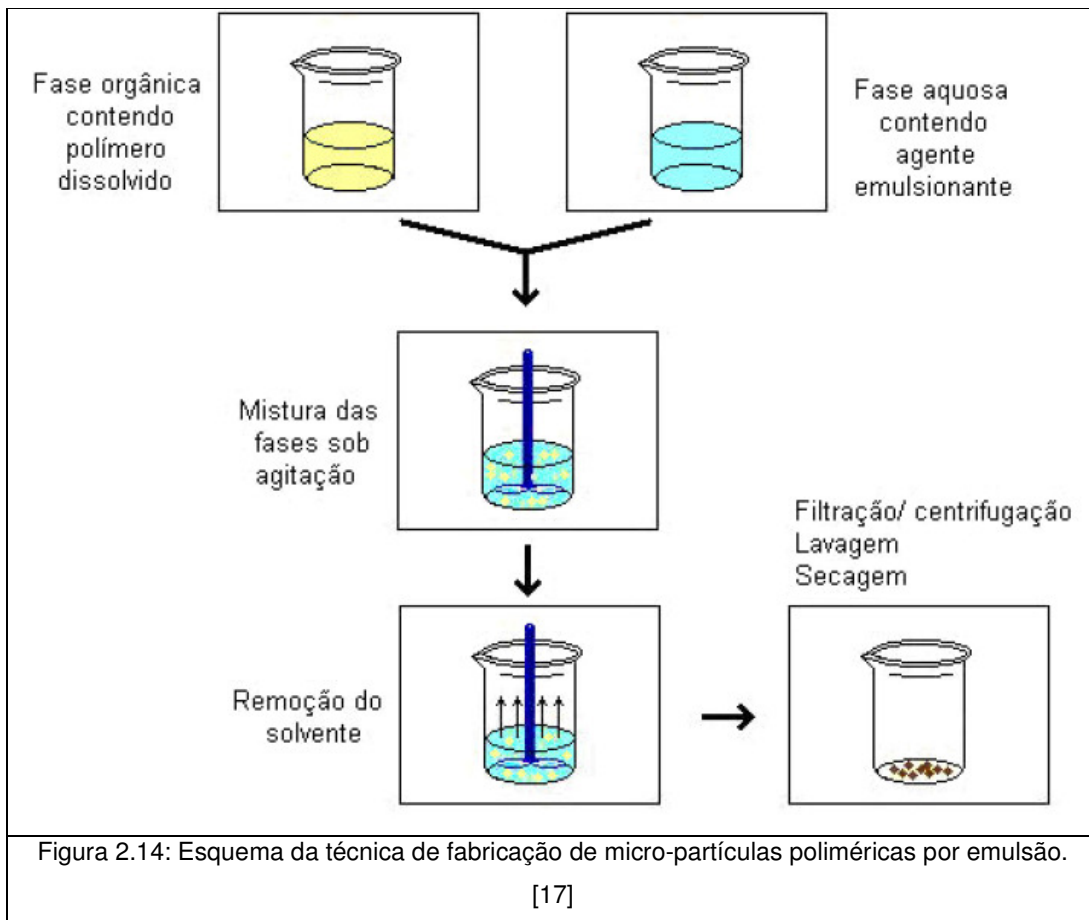
O PS é um polímero inerte ao corpo humano, ou seja, não causa problemas se ingerido, inalado ou em contato com os olhos e a pele, isto o torna muito eficaz para aplicações biológicas como em bio-diagnósticos (citometria de fluxo) e administração de drogas pois não reage com os fluídos corpóreos [16].

Outras aplicações são possíveis para micro e nano-estruturas de poliestireno, como o uso em sensores (adicionando um metal ao polímero e realizando a pirólise das estruturas) ou em fluídica (adicionando partículas magnéticas ao polímero) [16].

## ***2.4. Fabricação de micro-partículas por emulsão***

Esse método é tradicionalmente utilizado em escala industrial para a produção de micro-partículas poliméricas com uma distribuição controlada de tamanhos [2].

O método consiste em adicionar uma solução polimérica ou monomérica em uma fase líquida imiscível contendo agente estabilizante e, sob agitação, emulsificar a solução no líquido imiscível. O estabilizador age de forma com que as gotículas da solução fiquem em suspensão dentro do líquido imiscível e não migrem para a superfície de forma a se juntarem. O solvente da solução é removido, geralmente por aplicação de calor, e o resultado são partículas poliméricas em suspensão no líquido. Um esquema da técnica pode ser observado na figura 2.14. [17]



## 2.5. Métodos de Microscopia

Nessa seção serão abordadas brevemente duas técnicas de microscopia que tiveram importância para o escopo deste trabalho, que são a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL).

### 2.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica se baseia na formação de imagens utilizando um feixe de elétrons ao invés de um feixe de luz. No caso de varredura, o feixe de elétrons varre a amostra e o que se analisa são os elétrons refletidos ou secundários.

A formação de imagem na MEV se dá pela emissão de elétrons secundários ou elétrons retro-espalhados. Os elétrons secundários são

provenientes do espalhamento inelástico entre os elétrons do feixe e os elétrons da amostra, ou seja, o feixe de elétrons fornece energia suficiente aos elétrons da amostra para que sejam ejetados. Os elétrons retro-espalhados são elétrons do feixe que foram espalhados elasticamente, ou seja, elétrons do feixe que interagem com a amostra e retornam com aproximadamente a mesma energia. Os elétrons secundários coletados são provenientes da região superficial devido à sua baixa energia, que é de cerca de 2 a 5eV [18].

Átomos mais pesados são mais responsáveis pelo espalhamento elástico dos elétrons que átomos leves, por isto em imagens feitas com elétrons retro-espalhados, as regiões escuras representam elementos leves, enquanto que regiões claras representam elementos pesados. Portanto o contraste é dado pela composição química elementar.

No caso de elétrons secundários, que são provenientes da superfície, se obtém uma imagem em que o contraste é dado pelo relevo da superfície, como pode ser observado na figura 2.15 [19].

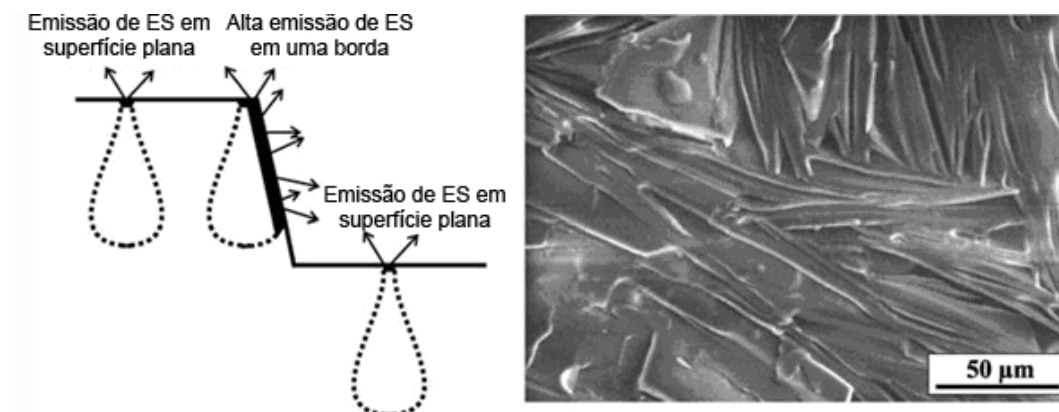


Figura 2.15: Imagem por elétrons secundários mostrando a morfologia. [19]

As imagens por microscopia eletrônica de varredura realizadas neste trabalho se basearam em imagens obtidas a partir de elétrons secundários, uma vez que o interesse maior de análise das amostras é com relação à morfologia das estruturas depositadas pelo método de eletrospray.

### 2.5.2. Microscopia Confocal de Varredura a Laser

O microscópio confocal é um microscópio óptico. A maior aplicação da microscopia confocal é na área de ciências biomédicas para análise de tecidos marcados com fluoróforos. No microscópio convencional, fluorescência de várias regiões da amostra interfere na resolução da estrutura em foco. O microscópio confocal diminui, com ajuda de uma fenda, a fluorescência de outros planos que não o focalizado.

A iluminação em um microscópio confocal é dada pela varredura de um laser ao longo da amostra. As imagens obtidas desta maneira são chamadas de secções ópticas, o que permite que uma amostra seja vista por dentro sem que haja necessidade de uma secção física. Essas secções podem ser combinadas para a formação de uma imagem com perspectiva 3D. [20]. Um esquema do microscópio pode ser observado na figura 2.16.

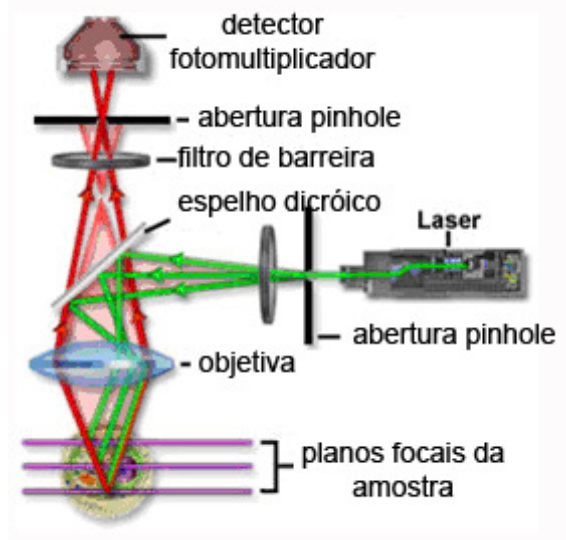


Figura 2.16: Esquema do microscópio confocal de varredura a laser [adaptada de 21].

O interesse deste método de microscopia para o escopo do trabalho é analisar capacidade das partículas depositadas por eletrospray de se adequarem para o uso em sistemas de diagnóstico, detectando a fluorescência nas bordas das partículas, que confirma sua bio-ativação e adesão do fluoróforo.

## 2.6. X-Ray Photoelectron Spectrometry (XPS)

XPS é um método sensível que permite que se identifique e quantifique elementos químicos na região superficial de um sólido, fornecendo informações sobre estados de ligação dos elementos. O método usa o efeito fotoelétrico como ferramenta analítica.

O raio-X com energia bem determinada incide na amostra e elétrons são ejetados da mesma. O equipamento determina a energia cinética com a qual estes elétrons escapam do material. A profundidade de análise por este método é de aproximadamente 10nm, pois os elétrons que escapam a uma profundidade maior que essa têm grandes chances de interagir com outros elétrons, perdendo energia cinética e, assim, não contribuindo com a informação espectroscópica [22].

A energia cinética analisada é dada por:

$$E_k = h\nu - E_B - \Phi_S, \quad \text{Eq. (4)}$$

em que  $E_K$  é a energia cinética medida do fotoelétron,  $h\nu$  é a energia do raio-x que incide na amostra,  $E_B$  é a energia de ligação do elétron e  $\Phi_S$  é a função trabalho. [23,24]

Espectros de XPS são dispostos em gráficos em termos da intensidade de elétrons por energia de ligação  $E_B$ . Desta forma, linhas elementares têm a mesma energia de ligação, independente da energia de excitação de raio-X utilizada.

O espectro fotoelétrico reproduz a estrutura eletrônica de um elemento de forma bastante precisa, uma vez que todos os elétrons com uma energia de ligação menor que energia do fóton incidente na amostra vão aparecer no espectro. Os elétrons que são excitados e escapam sem perda de energia, contribuem para os picos característicos do espectro, aqueles que sofrem espalhamento inelástico e, dessa forma, perda de energia, contribuem para o *background* do espectro [24].

Quando a energia de ligação sofre pequenas alterações (geralmente menores que 10eV), é caracterizado um desvio químico, que são resultado das ligações, das diferenças do potencial químico e da polaridade dos



componentes. Se vários tipos de ligação de um elemento estão presentes simultaneamente, ajustes ao espectro fornecem valores de desvios químicos e a fração de cada ligação [23]

# Capítulo 3. Materiais e Métodos

## 3.1. Eletrospray

Ao longo deste trabalho foram realizados diferentes testes para o domínio da técnica de eletrospray. Primeiramente foi necessário que se tentasse caracterizar a técnica, até então pouco explorada para a obtenção de micro-partículas.

O aparato utilizado para o processo de eletrospray consiste de uma fonte de alta tensão de 0-30kV (METEC), uma bomba de seringa (fabricação própria), que é alimentada por uma fonte bipolar Tectrol (TC-20) e tem velocidade de bombeamento monitorada por um multímetro digital FLUKE 8600A. Como anteparo, foi utilizada uma placa circular de alumínio. Foi utilizada uma seringa hipodérmica de 3ml que contém a solução que é ejetada por uma agulha hipodérmica (com a ponta lixada) de calibre 25G (0,55mm de diâmetro). Uma foto do equipamento pode ser observada na figura 3.1.

As amostras foram preparadas sob diferentes condições e parâmetros. Para tal foram utilizados 4 diferentes solventes (clorofórmio, tolueno, metil-etil-cetona – MEK e tetrahidrofurano – THF). Utilizou-se poliestireno (PS) com diferentes massas moleculares além de poliestireno carboxilado. Soluções com diferentes concentrações foram preparadas. Outros parâmetros foram variados através dos controles do equipamento, como taxa de vazão e campo elétrico aplicado.

O PS utilizado foi fornecido pela Innova – Petrobrás (mM=175000–185000g/mol – ao longo desse trabalho será utilizada a média 180000g/mol para fins de simplificação) e pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do sul (mM = 52700g/mol e carboxilado mM=44257g/mol, mM = 40073g/mol e mM=33856g/mol)

Foi preparado um total de 180 amostras ao longo deste trabalho, entre testes e amostras com parâmetros controlados de forma de que as análises aqui apresentadas pudessem ser feitas.

Nos tópicos a seguir são apresentadas as maneiras com que estes parâmetros foram variados de forma que se pudesse ser analisar os resultados de interesse.

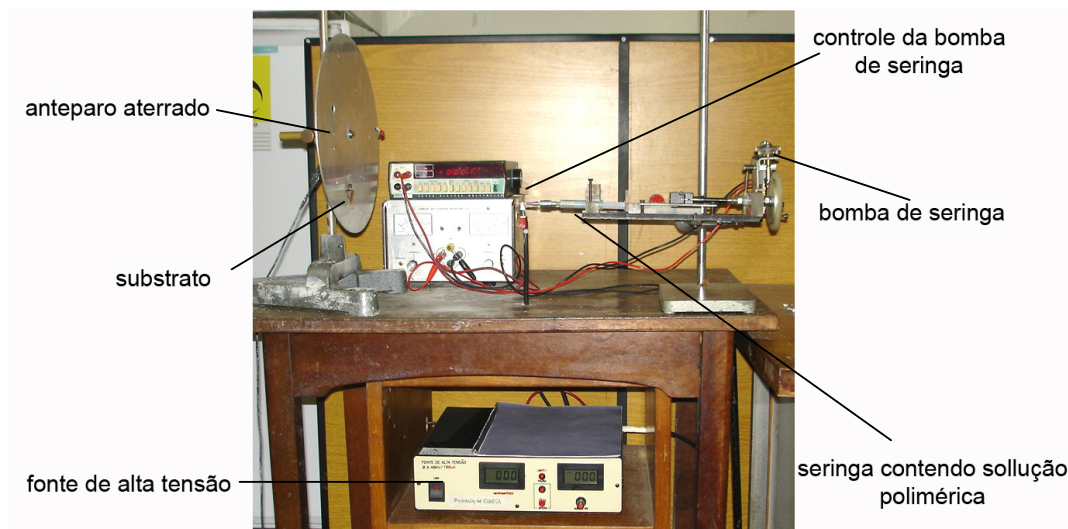


Figura 3.1: Equipamento utilizado no processo de eletrospray.

## 3.2. Estudo morfológico

O estudo morfológico baseou-se em seis parâmetros distintos: concentração das soluções depositadas, massa molecular do poliestireno, taxa de vazão, campo elétrico, as diferentes características físicas dos solventes utilizados e o caráter de acidez do poliestireno (se carboxilado ou não).

O estudo da morfologia compreende a determinação do tamanho médio das partículas das amostras, o formato das mesmas e os detalhes de sua superfície.

Para a análise quantitativa de tamanho médio das partículas, foram considerados seis parâmetros. Primeiramente analisou-se o tamanho em função da taxa de vazão. Posteriormente, fez-se uma análise do tamanho médio das partículas em função do campo elétrico.

Outro parâmetro considerado para o estudo do tamanho médio das partículas depositadas foi a concentração das soluções depositadas. Para a mesma variação de concentração, utilizando PS de massa molecular mais elevada pudemos observar a transição de morfologias para diferentes

concentrações (de contas para fibras com contas e destas para somente fibras) e a diferença entre duas massas moleculares distintas.

Para os diferentes solventes, consideramos três parâmetros diferentes: tensão superficial, viscosidade absoluta e temperatura de ebulição. Todas estas características podem influenciar no processo de eletrospray e, portanto, na morfologia das estruturas depositadas.

Foram preparadas algumas amostras com PS carboxilado, para que se fizesse uma análise de tamanho quanto à taxa de deposição também para esse PS, porém o resultado nos levou a fazer uma análise somente quanto à forma das partículas, como será mostrado posteriormente.

Os estudos de morfologia foram feitos baseados em imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná. Para tal, as amostras analisadas foram depositadas sobre substratos de vidro revestidos com filme de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) fornecido pela Flexitec e posteriormente metalizadas com ouro. Este filme de FTO é importante para o processo de eletrospinning, pois se trata de um material condutor. Houve tentativas de fazer a deposição sobre materiais isolantes, mas o desvio do campo elétrico destes materiais dificulta a deposição das partículas de PS sobre o substrato.

A análise de distribuição dimensional foi efetuada empregando software Image Tool da University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA). Este programa, por contraste de imagem, é capaz de discernir entre partícula/estrutura depositada e substrato e fornecer informações sobre sua forma e tamanho. O software identifica as partículas (figura 3.2) e, calibrando as medidas espaciais, nos dando informações sobre, área, perímetro, alongação, esfericidade e diâmetro da partícula, entre outros.

Os parâmetros utilizados na análise morfológica foram a esfericidade e o diâmetro das partículas. Em várias amostras, as partículas se sobrepõem e, assim, o software não é capaz de identificá-las como elementos distintos e as considera uma partícula única. A esfericidade nos permite escolher as partículas com aspecto mais esférico, eliminando os aglomerados de partículas das estatísticas.

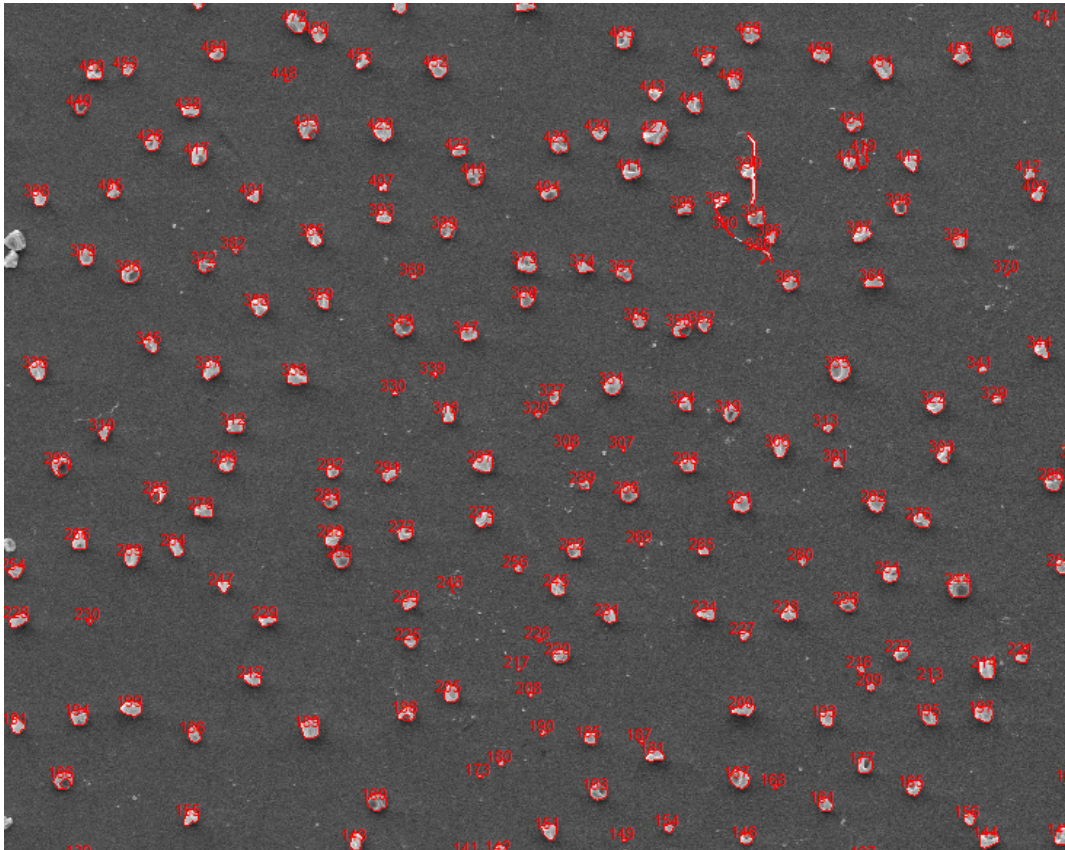


Figura 3.2: Identificação das partículas pelo software Image Tool

### **3.3. Ativação Biológica das Micro-partículas**

A ativação das micro-partículas foi realizada e analisada no Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Antes de analisar a ativação das partículas, dois filmes de PS, um carboxilado e um não carboxilado, depositados com ajuda de uma micro-pipeta, foram submetidos ao teste de ativação.

As amostras para análise de bio-ativação das partículas foram depositadas por eletrospray sobre uma solução aquosa (diagrama esquemático figura 3.3) para que pudessem estar soltas de um substrato e que pudessem ser postas em suspensão em um meio líquido de forma que as reações químicas necessárias se realizassem.

A ativação das micro-partículas foi feita com soluções de 50mg/ml em água deionizada de EDC (*1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*) e S-NHS (*sulfo-N-Hydroxysuccinimide*). Como teste da ativação, foi acoplada às partículas ativadas a proteína GFP (*green fluorescent protein*), diluída em uma

solução fosfato-salina tampão de ativação (PBS – *phosphate buffered saline*). Esta proteína, quando sujeita à luz ultravioleta, emite radiação na faixa da luz verde.

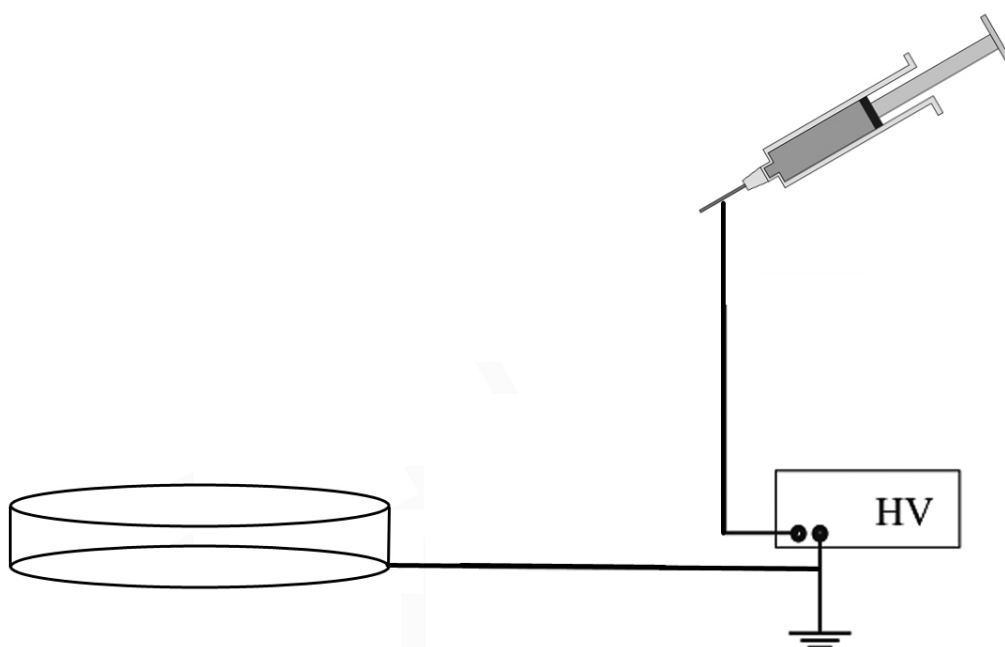


Figura 3.3: Diagrama esquemático do aparato experimental para o processo de electrospray em meio aquoso

A ativação foi feita com a ajuda de filtros, de forma a facilitar a mistura dos componentes e a lavagem das micro-esferas entre os processos. O processo de lavagem é importante para eliminar os resíduos dos componentes EDC, S-NHS e da proteína GFP que não participaram das reações.

A análise da ativação foi feita com ajuda de um microscópio confocal de varredura, que possibilitou a verificação da ativação através da fluorescência das partículas que possuíam acopladas em sua superfície a proteína fluorescente GFP.

### **3.4. Análise Química por XPS**

A análise química das partículas por XPS foi motivada pelos resultados da análise da bio-ativação, que será elucidado posteriormente. O propósito foi observar por que os resultados desta análise não foram os esperados. Para tal,

foram analisadas 3 amostras, sendo que uma delas havia sido utilizada para a análise da bio-ativação. Uma das amostras analisadas foi um filme de PS realizado através da deposição de uma solução de PS em clorofórmio com ajuda de uma micro-pipeta sobre um substrato de silício. Todas as amostras foram preparadas com poliestireno não carboxilado.

As micro-partículas depositadas sobre meio aquoso foram deixadas em suspensão e esta foi depositada sobre um substrato de silício com ajuda de uma micropipeta. Este processo foi realizado várias vezes para garantir uma quantidade adequada de micro-partículas para análise de XPS, e deixada secar naturalmente.

# Capítulo 4. Resultados e Discussões

## 4.1. Estudo morfológico

A seguir são apresentados os resultados do estudo morfológico descrito anteriormente. Ressalta-se que os ajustes lineares (em vermelho) nos gráficos não foram feitos com a suposição que o comportamento do fenômeno analisado seja linear, mas para indicar que os dados seguem um padrão crescente ou decrescente com relação ao parâmetro estudado.

### 4.1.1. Taxa de Vazão

Primeiramente analisou-se o tamanho médio das partículas com relação a diferentes taxas de vazão, conforme estabelecido na tabela 4.1. As imagens resultantes dessas amostras estão dispostas na figura 4.1.

Solvente	Concentração (wt%)	Massa molecular (g/mol)	Campo elétrico (kV/cm)	Taxa de vazão (μl/min)
Clorofórmio	1,0	180000	0,5	7,2
				14,4
				21,6
				28,8

Tabela 4.1: Parâmetros de deposição utilizados para preparação das amostras para análise da distribuição de tamanho em função da taxa de vazão.

Pode-se observar claramente na imagem, que o tamanho médio das partículas é dependente do aumento na taxa de vazão. Ao graficar os dados obtidos pelo software de análise das imagens (figura 4.2), pode-se constatar quantitativamente essa observação. Isso indica que a taxa de abastecimento de solução à ponta da agulha interfere de modo significativo no tamanho final das estruturas.



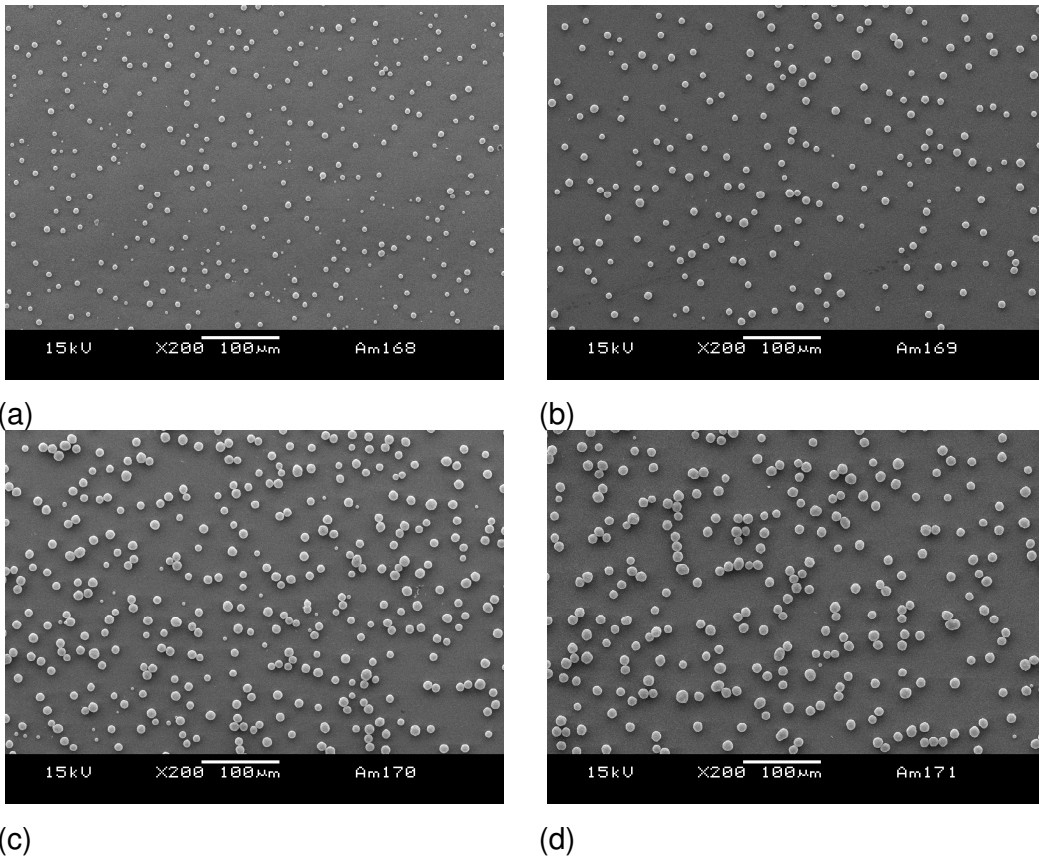


Figura 4.1: Micro-partículas de poliestireno depositadas a diferentes taxas de vazão: (a)7,2μl/min, (b)14,4μl/min, (c)21,6μl/min, (d)28,8μl/min.

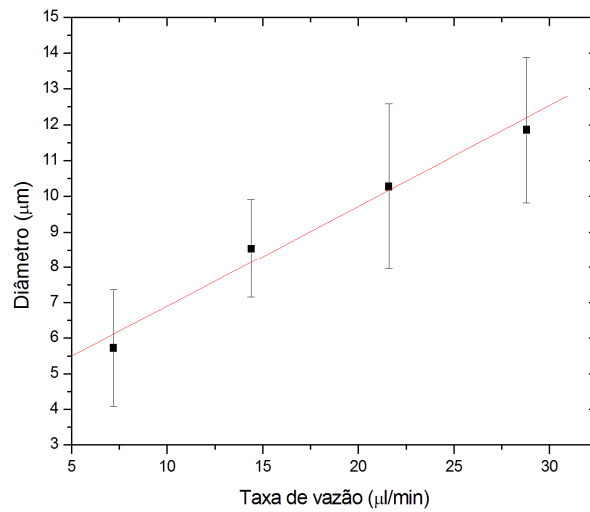


Figura 4.2: Gráfico do tamanho médio das partículas em função da taxa de vazão.

### 4.1.2. Campo Elétrico

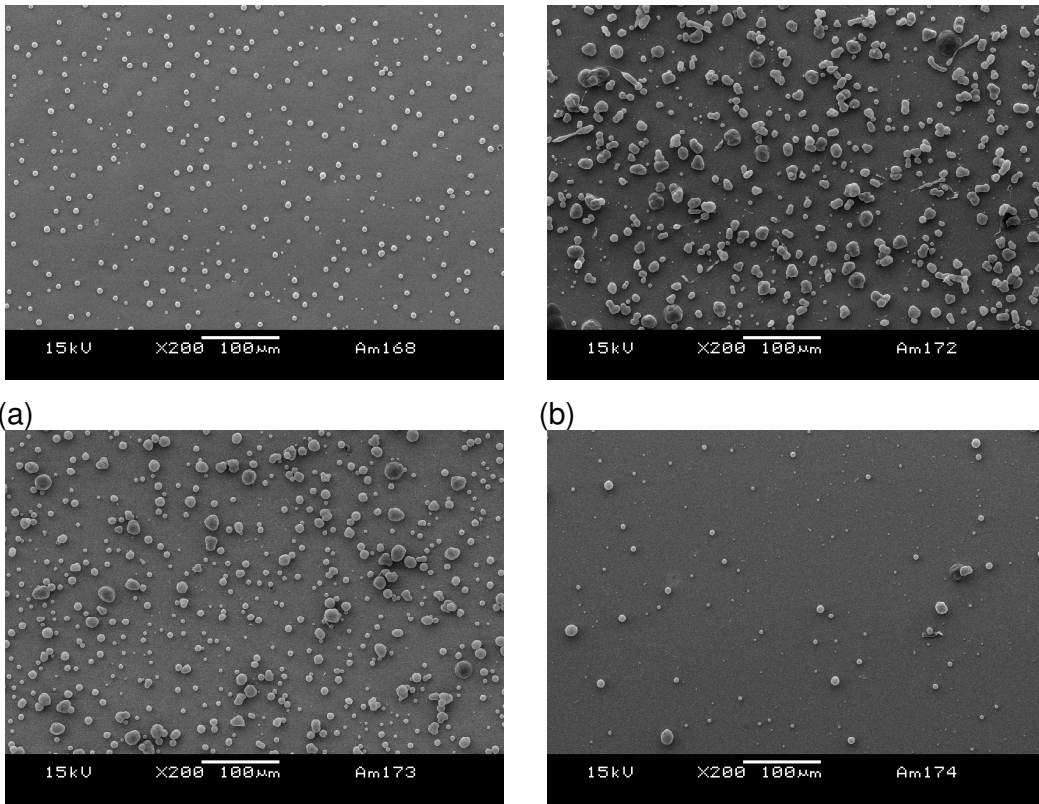
Os resultados para a análise do tamanho médio em função do campo elétrico, cujos parâmetros se encontram na tabela 4.2, não são tão evidentes somente observando as (figura 4.3). Precisamos dos resultados quantitativos para fazer uma melhor avaliação da relação entre o tamanho da partícula e o campo elétrico aplicado durante o processo de eletrospray.

Pode-se observar pelo gráfico (figura 4.4) que não há uma dependência direta entre o tamanho das partículas e o campo elétrico. Podemos observar que o gráfico para esses resultados é semelhante ao da figura 2.8, que mostra o resultado dos estudos de C.H. Park ET AL. No entanto em seu trabalho não é indicada a distância entre a agulha e o anteparo para que se possa fazer uma comparação quantitativa destes dados. Neste trabalho tampouco fizemos uma análise dos jatos em função da tensão aplicada, portanto não podemos analisar o tamanho das partículas em função da tensão aplicada como foi feito no trabalho supracitado.

Solvente	Concentração (wt%)	Massa molecular (g/mol)	Campo elétrico (kV/cm)	Taxa de vazão (µl/min)
Clorofórmio	1,0	180000	0,50	7,2
			0,75	
			1,00	
			1,25	

Tabela 4.2: Parâmetros de deposição utilizados para preparação das amostras para análise da distribuição de tamanhos em função do campo elétrico.

Observa-se claramente na figura 4.3 que as partículas da amostra 173 são consideravelmente maiores que as da amostra 168, no entanto, no gráfico esta diferença não se mostra muito significativa. Este resultado é proveniente de uma dificuldade do software de análise de imagens (Image Tool) em reconhecer as partículas maiores por haver confusão entre substrato e as partículas, dificultando a identificação destas partículas e, portanto, elas acabaram de fora da estatística.



(a) (b) (c) (d)  
 Figura 4.3: Micro-partículas de poliestireno depositadas a diferentes campos elétricos: (a)0,50kV/cm, (b)0,75kV/cm, (c)1,00kV/cm, (d)1,25kV/cm.

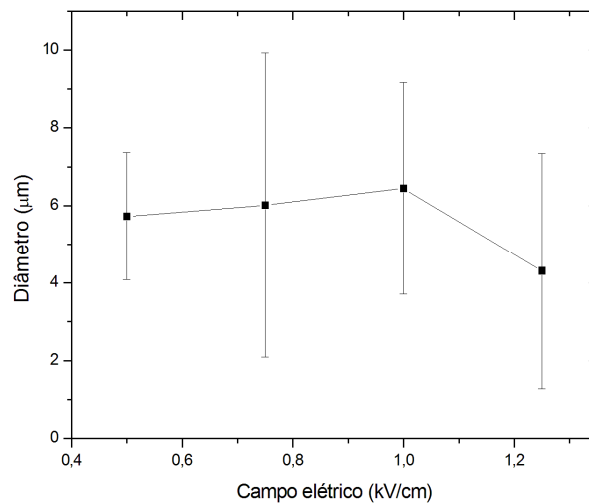


Figura 4.4: Gráfico do tamanho médio das partículas em função do campo elétrico (as linhas traçadas são para efeito de guiar os olhos e não um ajuste).

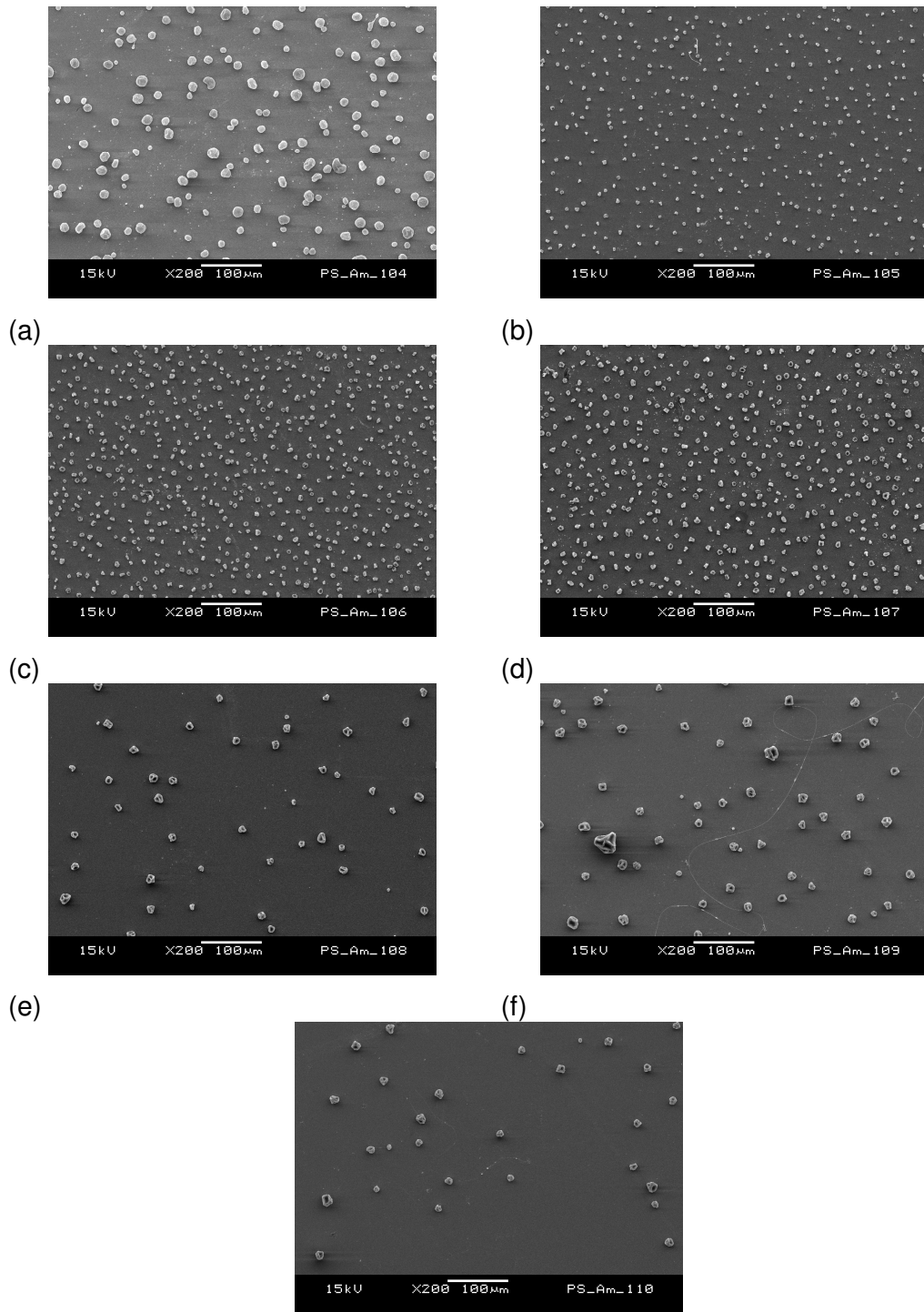
### 4.1.3. Massa molecular e Concentração

Nas imagens contidas nas figuras 4.5 e 4.6 podemos observar a óbvia diferença entre partículas de PS de duas massas moleculares distintas. Observa-se a diferença no tamanho das micro-partículas provindas das soluções de mesma concentração, bem como a diferença na transição de morfologia, ou seja, quando as micro-partículas passam a ser fibras com contas e quando estas passam a ser somente fibras. Os parâmetros de deposição para essa análise estão dispostos na tabela 4.3.

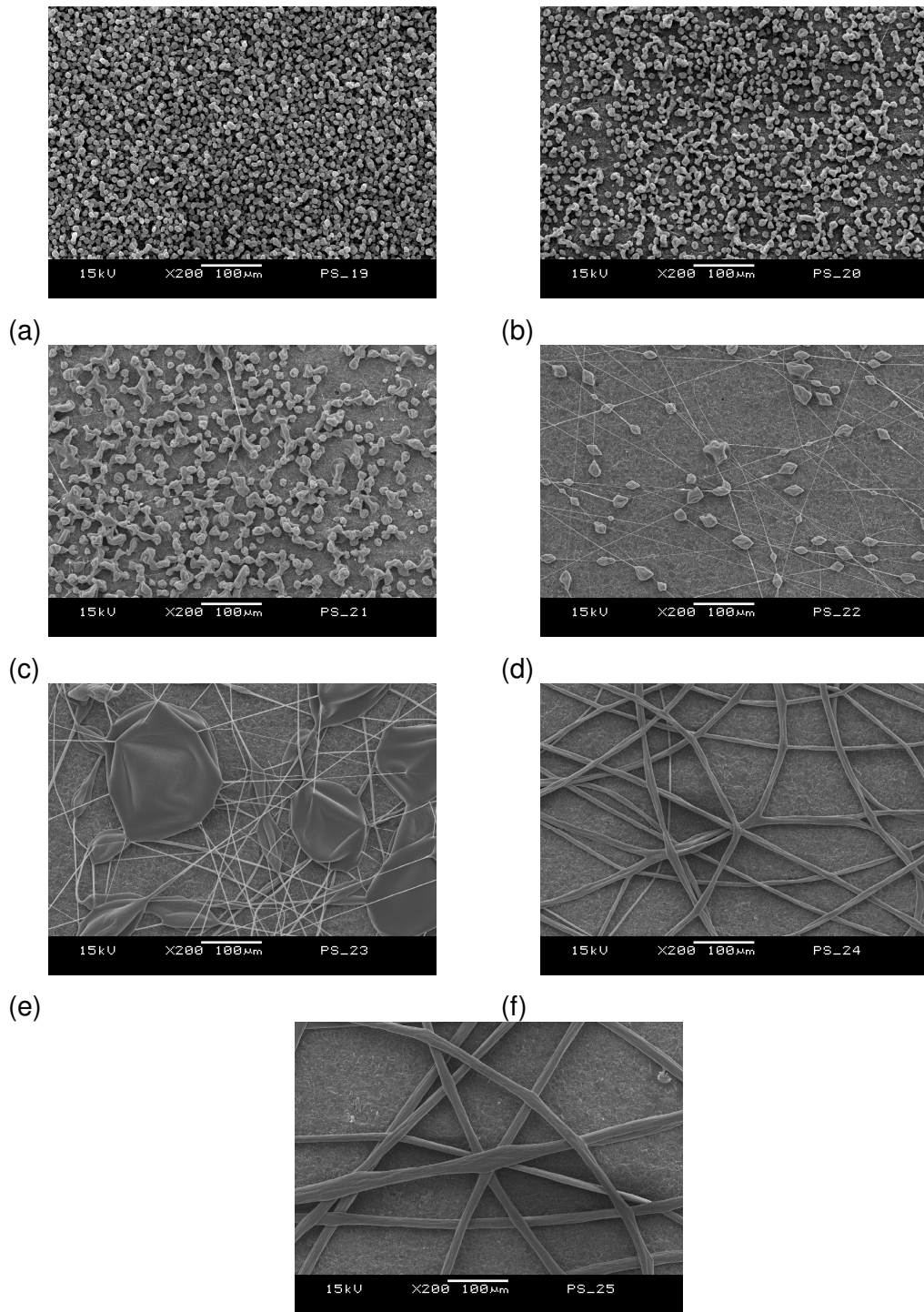
Solvente	Concentração (wt%)	Massa molecular (g/mol)	Campo elétrico (kV/cm)	Taxa de vazão (µl/min)
Clorofórmio	1,0	52700 e 180000	0,5	7,2
	2,5			
	5,0			
	7,5			
	10,0			
	12,5			
	15,0			

Tabela 4.3: Parâmetros de deposição utilizados para preparação das amostras para análise da distribuição de tamanhos em função da concentração e transição de morfologia.

Observa-se na figura 4.5 que para a massa molecular de 52700g/mol as fibras começam a aparecer entre as partículas a partir da concentração de 12,5wt%, enquanto que para o PS de massa molecular 180000g/mol, esta fase transitória se apresenta já à concentração de 5,0wt%. Além disto, para a primeira massa molecular, não há o aparecimento de somente fibras antes dos 15,0wt%, o que indica que a concentração adequada para esta morfologia está além desse intervalo de concentrações, enquanto que esta transição fica clara na figura 4.6 em que mostra que a partir de 12,5wt% somente fibras são depositadas.



(g)  
 Figura 4.5: Micro-partículas de PS de massa molecular 52700g/mol depositadas a diferentes concentrações: (a)1,0wt%, (b)2,5wt%, (c)5,0wt%, (d)7,5wt%, (e)10,0wt%, (f)12,5wt% e (g) 15,0wt%.



(g)  
 Figura 4.6: Micro-partículas de PS de massa molecular 180000g/mol depositadas a diferentes concentrações: (a)1,0wt%, (b)2,5wt%, (c)5,0wt%, (d)7,5wt%, (e)10,0wt%, (f)12,5wt% e (g) 15,0wt%.

A análise do tamanho médio das partículas em função da concentração da solução foi realizada com as amostras representadas na imagem 4.5. Observamos pela figura que há uma anomalia na amostra de concentração 1,0wt%, mas que a partir das amostras seguintes, aparentemente o diâmetro das partículas é crescente conforme o aumento da concentração. Esta observação é confirmada pelo gráfico dos valores obtidos para os tamanhos médios das partículas (figura 4.7). Porém observa-se que duas amostras fogem à aparente regra, a amostra de concentração 1,0wt% e a de concentração 12,5wt%. Para ambos os casos, as barras de erro (que representam o desvio padrão da média dos diâmetros) indicam que esses dados são pouco confiáveis e que há uma distribuição muito larga de tamanhos.

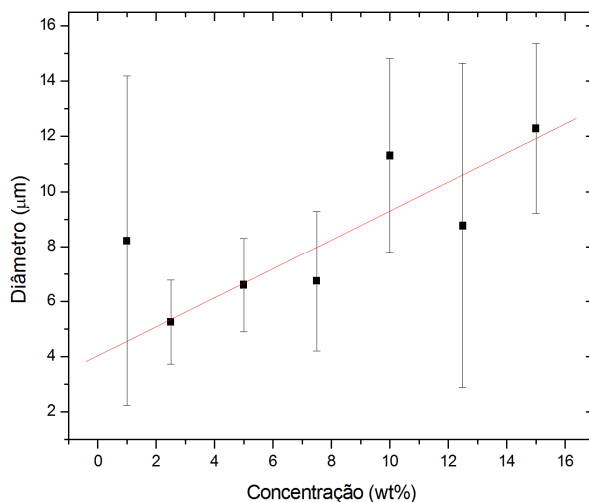


Figura 4.7: Gráfico do tamanho médio das partículas em função da concentração a partir das imagens na figura 4.5.

#### 4.1.4. Solvente

Para a análise quanto à diferença dos solventes (tabelas 4.4 e 4.5), podemos notar, nas imagens apresentadas na figura 4.8, que há uma diferença visível no tamanho das partículas para cada solvente utilizado. Porém, devido ao grande número de parâmetros a observação dos dados graficados ajuda para uma análise mais detalhada.

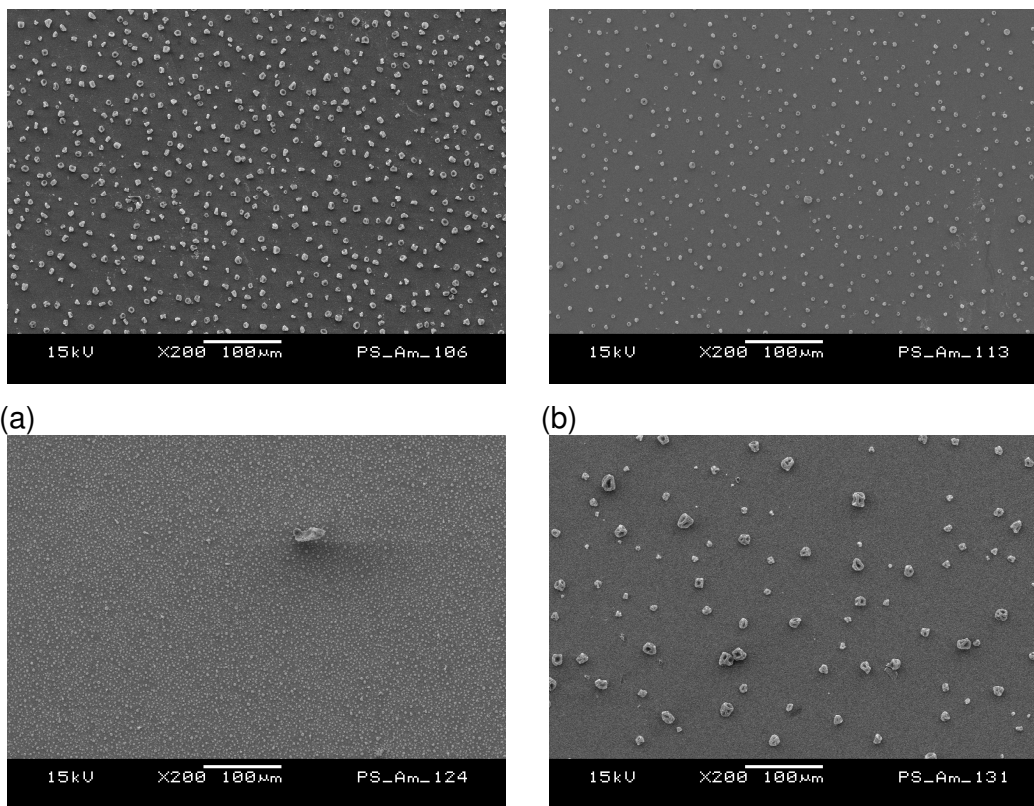


Solvente	Concentração (wt%)	Massa molecular (g/mol)	Campo elétrico (kV/cm)	Taxa de vazão (μl/min)
Clorofórmio	5,0	52700	0,5	7,2
Tolueno				
THF				
MEK				

Tabela 4.4: Parâmetros de deposição utilizados para preparação das amostras para análise da distribuição de tamanhos e diferenças na forma e na superfície das partículas em função das diferentes características físicas dos solventes.

Solvente	Tensão sup. (@20°C dyn/cm)	Viscosidade (@25°C cP)	P. Ebulição (°C)
Clorofórmio	27,16	0,57	61
THF	28	0,55	66
MEK	24,6	0,41	80
Tolueno	28,5	0,59	110,6

Tabela 4.5: Parâmetros de deposição associados aos diferentes solventes.



(a) (b) (c) (d)  
 Figura 4.8: Micro-partículas de PS provenientes de soluções de diferentes solventes: (a)clorofórmio, (b)tetrahidrofurano, (c)metil-etil-cetona e (d)tolueno.



Para três solventes o tamanho médio das partículas seguiu o esperado pelos estudos previamente consultados [9], havendo somente uma amostra que se mostra fora desse padrão. Sendo assim, mais estudos sobre este parâmetro são necessários para que se possa avaliar com maior segurança o comportamento do tamanho das partículas em função do ponto de ebulição do solvente. (figura 4.9). No entanto, as três amostras restantes mostram um comportamento linear decrescente do tamanho das partículas em função do ponto de ebulição o que está de acordo com os estudos previamente consultados.

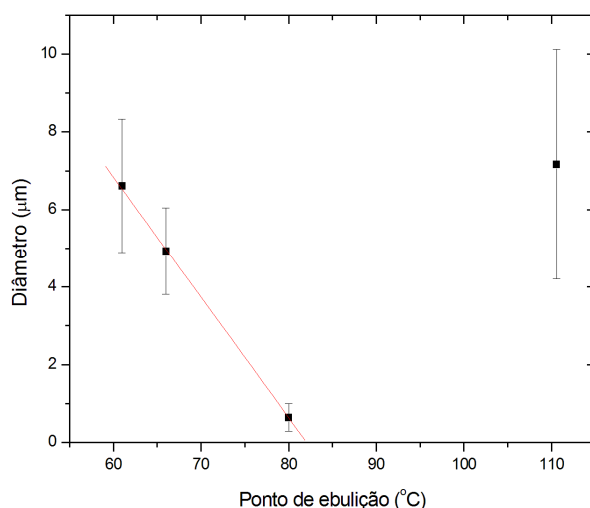


Figura 4.9: Gráfico do tamanho médio das partículas em função do ponto de ebulição do solvente.

A tensão superficial do solvente deve ter um papel importante no tamanho das partículas, uma vez que o campo elétrico deve sobrepor-se à tensão superficial da solução para que haja o colapso das gotas em gotículas menores. Portanto é de se esperar que para menores tensões superficiais, as partículas sejam menores e isso é razoavelmente observado no gráfico da figura 4.10, apesar da presença de discrepâncias. Porém, mais uma vez, pode-se considerar que a escolha das regiões das amostras ao preparar as imagens, não tenha favorecido uma distribuição de tamanhos que obedecesse a esse padrão.

Podemos observar na figura 4.11 que o tamanho médio das partículas apresenta um padrão crescente conforme o aumento da viscosidade. Isto é compatível com o esperado, uma vez que para uma maior viscosidade da solução, maior a dificuldade do campo elétrico em romper os capilares de solução em gotas e estas em gotículas menores.

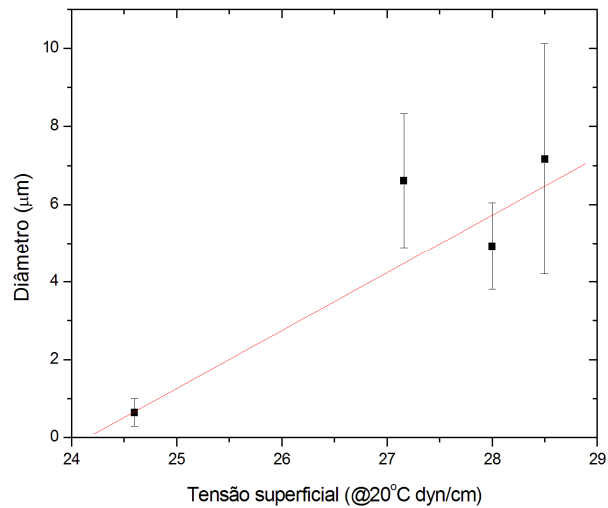


Figura 4.10: Gráfico do tamanho médio das partículas em função da tensão superficial do solvente.

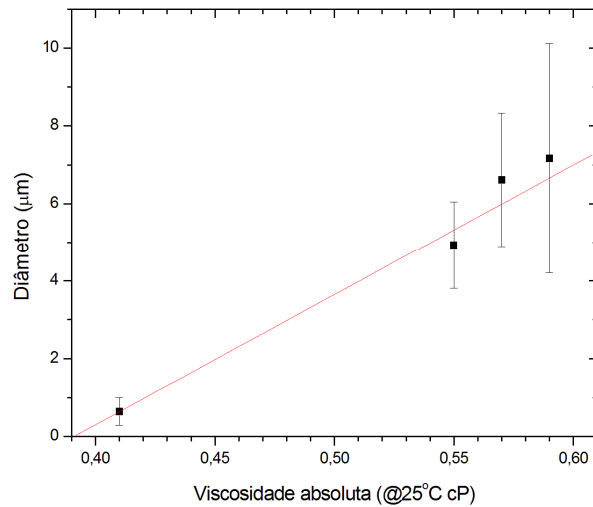
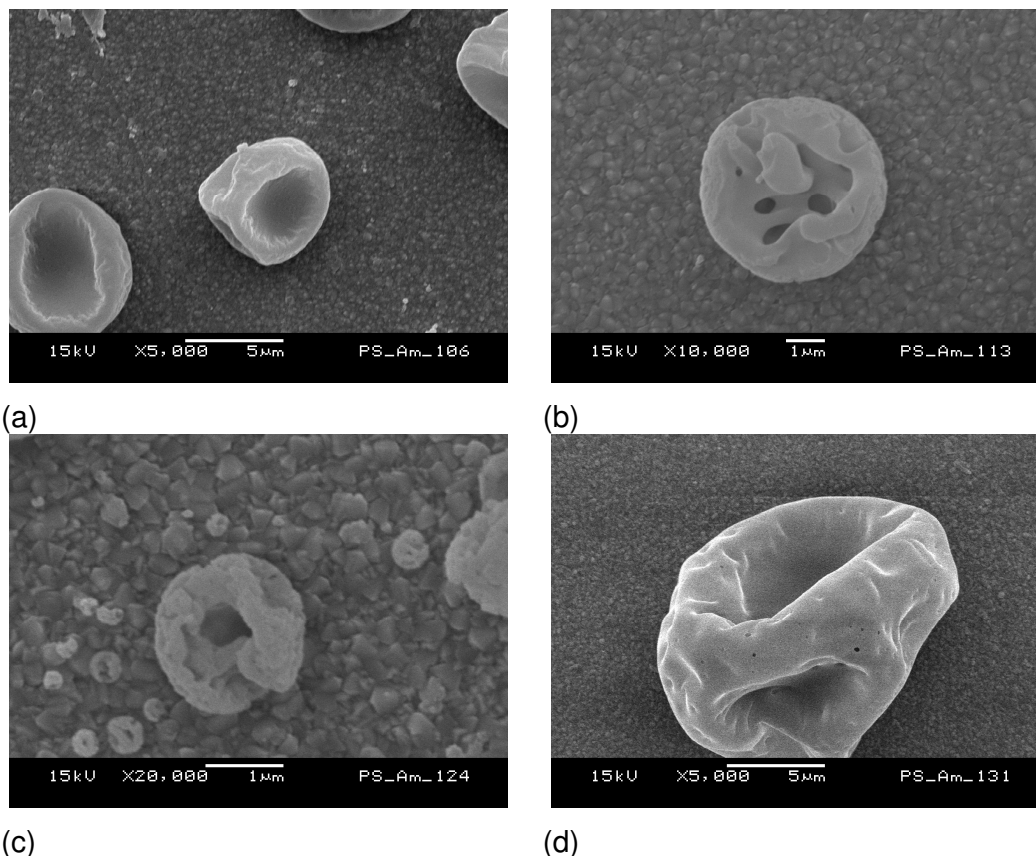


Figura 4.11: Gráfico do tamanho médio das partículas em função da viscosidade absoluta do solvente.

Além das diferenças na distribuição de tamanhos, observa-se na figura 4.12, que mostra imagens mais detalhadas das amostras acima analisadas, que o solvente exerce um papel importante nas características superficiais das partículas.



(c) (d)  
Figura 4.12: Detalhe das micro-partículas de PS provenientes de soluções de diferentes solventes: (a)clorofórmio, (b)tetrahidrofurano, (c)metil-etil-cetona e (d)tolueno.

Nas partículas provenientes das soluções com clorofórmio e tolueno, percebe-se uma superfície mais regular e semelhante a uma casca polimérica amassada. Essa rugosidade ocorre porque as partículas inflam pela pressão do solvente enquanto este evapora em seu interior, quando todo o gás se difunde para fora, a pressão interna diminui e as partículas esvaziam, porém como não possuem flexibilidade para retornarem ao seu tamanho inicial, ocorre uma implosão por diferença de pressão.

Nas partículas provenientes das soluções com tetrahidrofurano e metil-etil-cetona, possivelmente, a casca que formou-se inicialmente sofreu forte ação do solvente durante sua evaporação, formando uma partícula irregular e

com poros e buracos maiores. Outra possível explicação essa irregularidade talvez seja que o polímero não se concentre nas extremidades da gotícula para que haja a formação da casca e o solvente evapora de fora para dentro. Nenhuma das três características físicas consideradas dos solventes utilizados parece explicar esse fenômeno, o que leva a crer que outro parâmetro deva ser envolvido.

Pode-se observar que as barras de erro, que representam o desvio padrão do tamanho médio das partículas, são maiores que as obtidas por C. H. Park *et al.* Isto provavelmente se dê ao fato de que em seu trabalho foi utilizada a chamada tensão crítica, em que o cone de Taylor está estável e o filamento de solução ejetado não sofre desvio. Observações durante as deposições indicaram que a pluma e os filamentos não estavam estáveis durante as deposições, gerando uma larga distribuição de tamanho de partículas.

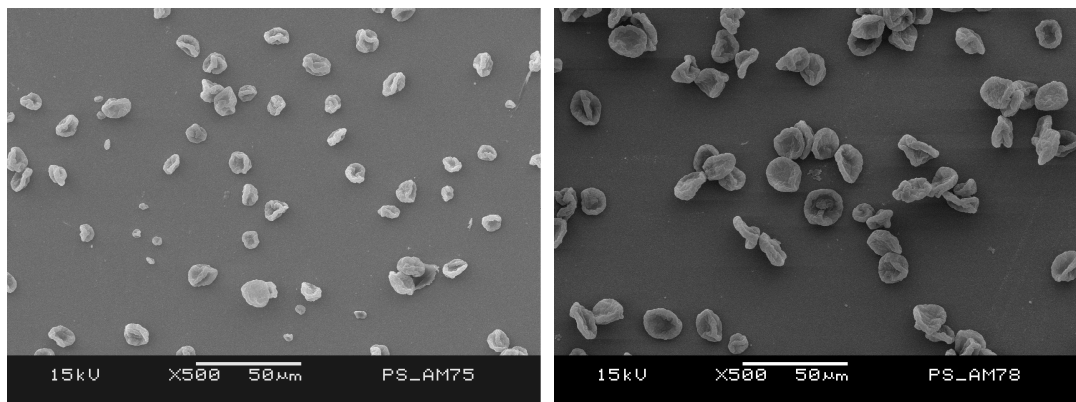
#### **4.1.5. PS carboxilado**

Na figura 4.13 pode-se observar as estruturas de PS carboxilado depositadas (parâmetros dispostos na tabela 4.6). As amostras foram inicialmente preparadas para que se fizesse uma análise de tamanho em relação à taxa de vazão, porém os resultados obtidos dificultaram essa análise. As partículas apresentam uma superfície totalmente rugosa e em forma de pratos ou copos, diferentemente das partículas depositadas a uma massa molecular semelhante e o mesmo solvente com o PS comum. Observou-se que trabalhar com este copolímero representaria mais um trabalho tão longo quanto o presente, para a caracterização dos parâmetros ideais para que se conseguissem partículas mais aproximadas a esferas, porém a característica ácida desse copolímero é de extrema importância para o seu uso em sistemas de diagnósticos.

Solvente	Concentração (wt%)	Massa molecular (g/mol)	Campo elétrico (kV/cm)	Taxa de vazão (µl/min)
Clorofórmio	2,5	44257	0,5	14,4
		33856		

Tabela 4.6: Parâmetros de deposição utilizados para preparação das amostras para análise da morfologia quanto à acidez do PS.

O que levou à interrupção de uma caracterização minuciosa do método para a utilização de PS carboxilado foram os resultados surpreendentes obtidos nos testes de bio-ativação, elucidados na seção 4.2.

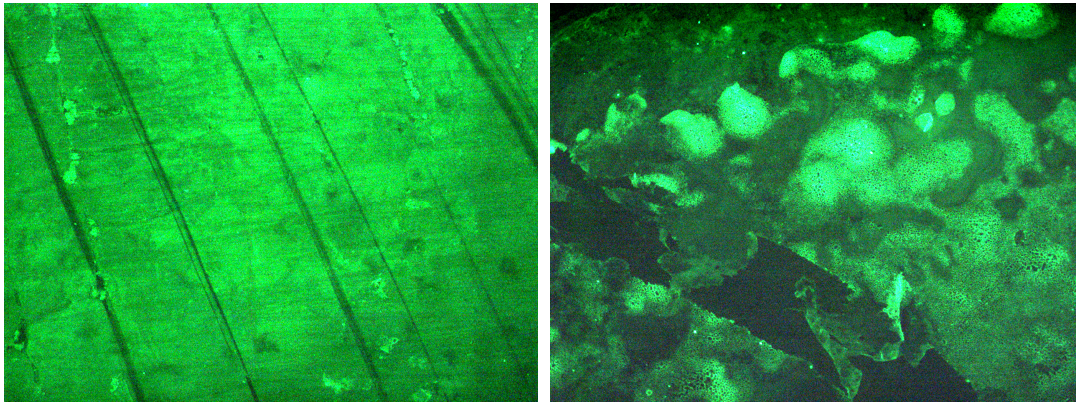


(a) (b)  
Figura 4.13: Micro-partículas de PS carboxilado com diferentes massas moleculares:  
(a)55257g/mol e (b)33856g/mol.

## ***4.2. Ativação Biológica das Micro-partículas***

Os testes de bio-ativação do filme de PS depositado com ajuda de uma micropipeta proporcionaram as imagens da figura 4.14. Nela se observa a ativação de dois filmes de PS, sendo um carboxilado e um não carboxilado. Pode-se verificar que o tempo de exposição para o filme de PS não carboxilado tem que ser cinco vezes maior para que ele apresente um brilho tão intenso quanto para o filme de PS carboxilado. Isso mostra a ineficiência do PS não carboxilado para a utilização em diagnósticos.

As amostras preparadas para análise da bio-ativação das partículas (tabela 4.7) tiveram o intuito de mostrar que as preparadas com PS carboxilado podiam ser ativadas, devido à presença da carboxila em suas cadeias poliméricas e que as partículas de PS comum não se ativariam. Porém este resultado esperado não foi encontrado, como pode ser observado na figura 4.15.



(a) (b)  
 Figura 4.14: Ativação de filmes de PS (a) não carboxilado e (b) carboxilado com diferentes tempos de exposição (a) 500ms e (b) 100ms

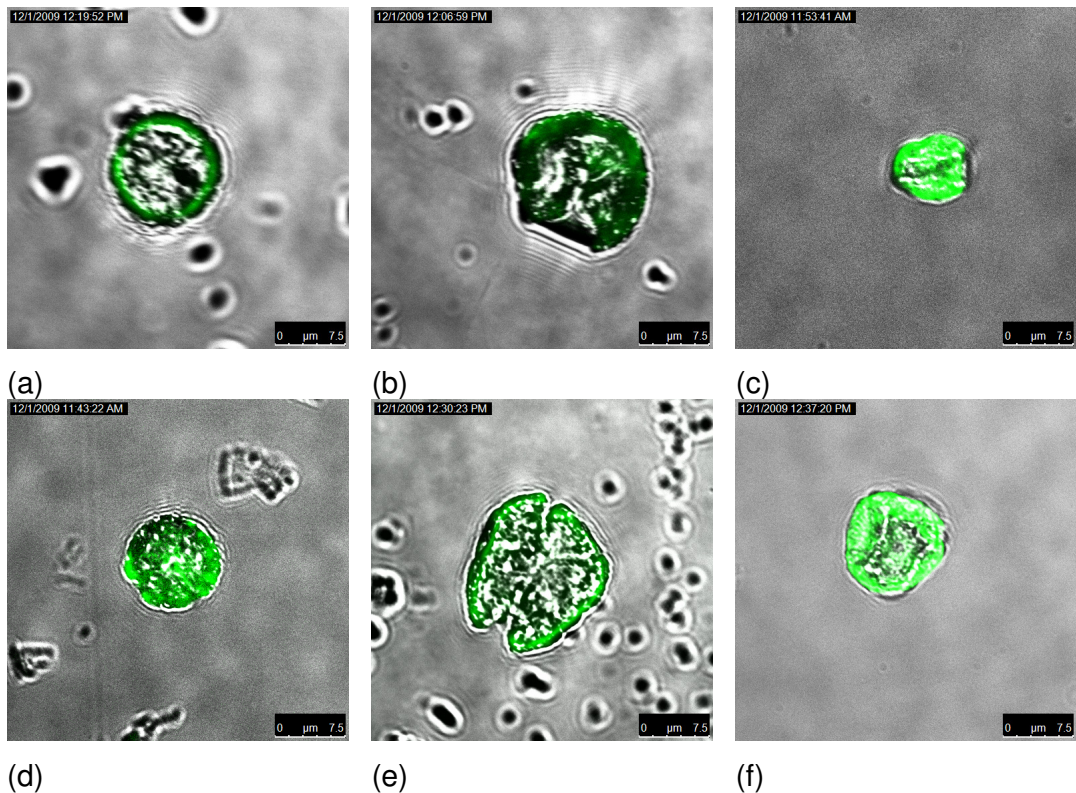
Solvente	Concentração (wt%)	Massa molecular (g/mol)	PS	Substrato	Taxa de vazão (µl/min)
Clorofórmio	1,0	180000	não carboxilado	Água bidestilada com ácido acético	14,4
		52700			
		40073	carboxilado	Água bidestilada com NaCl	
		180000	não carboxilado		
		52700			
		40073	carboxilado		

Tabela 4.7: Parâmetros de deposição utilizados para preparação das amostras para análise da bio-ativação das partículas.

Pode-se ver que todas as amostras foram ativadas, mesmo que com diferenças na intensidade da fluorescência, o que indica que de alguma forma o PS, antes não carboxilado, aparentemente se torna carboxilado durante a deposição, possibilitando a ativação biológica da partícula.

Isto pode ser explicado com a alta tensão aplicada na ponta da seringa, que é alta o suficiente para ionizar as moléculas de PS. Quando as partículas chegam à água contendo íons provindos do ácido acético ou do cloreto de sódio, possivelmente ocorre a formação de carboxilas ao longo das cadeiras poliméricas em sua parte externa. Isto possibilitou que descartássemos a necessidade de utilizar o PS carboxilado para que as partículas pudessem ser utilizadas em sistemas de diagnóstico e nos possibilitou interromper os estudos com esse copolímero, de difícil sintetização e que se mostrou resistente em formar partículas esféricas quando depositadas por eletrospray.





(a) (b) (c)  
 (d) (e) (f)  
 Figura 4.15: Micro-partículas de PS depositadas sobre água bidestilada com ácido acético, (a), (b), (c), e água bidestilada com NaCl (d), (e), (f), sendo (a) e (d) PS não carboxilado mM=180000g/mol, (b) e (e) PS não carboxilado mM= 52700g/mol e (c) e (f) PS carboxilado mM=40073

Esse resultado inesperado motivou a análise das partículas pela técnica de XPS que será relatada a seguir.

### **4.3. Análise Química por XPS**

Dando continuidade à análise de ativação das partículas considerou-se importante uma análise mais detalhada sobre a característica química do PS antes e depois de depositadas as partículas. Três amostras foram preparadas, sendo que duas foram feitas através do processo de eletrospray com os parâmetros da tabela 4.8. Para garantir que o próprio poliestireno que nos chegou já não possuía um caráter ácido, foi feito um filme sem que fosse pelo método de eletrospinning e para garantir que a carboxila se formava quando a

deposição ocorria na água ionizada, foi preparada uma amostra por eletrospray sobre silício. Esses resultados são mostrados nas figuras 4.16, 4.17 e 4.18.

Solvente	Concentração (wt%)	Massa Molecular (g/mol)	Substrato	Taxa de vazão (µl/min)
Clorofórmio	1,0	52700	Água bidestilada com ácido acético	14,4
			silício	

Tabela 4.8: Parâmetros de deposição utilizados para preparação das amostras para análise química por XPS das micro-partículas.

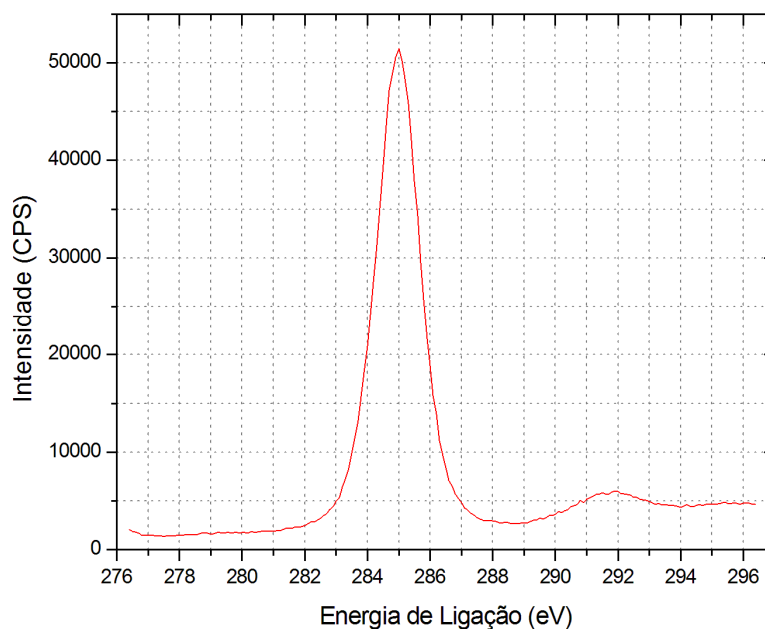


Figura 4.16: Espectro de XPS, na região do carbono 1s, de um filme de PS depositado com ajuda de uma micropipeta.

Os gráficos das figuras 4.16 e 4.17 apresentam os mesmos picos. O primeiro pico, de maior intensidade representa as ligações C-C e C-H e o pico menor representa o anel benzênico.



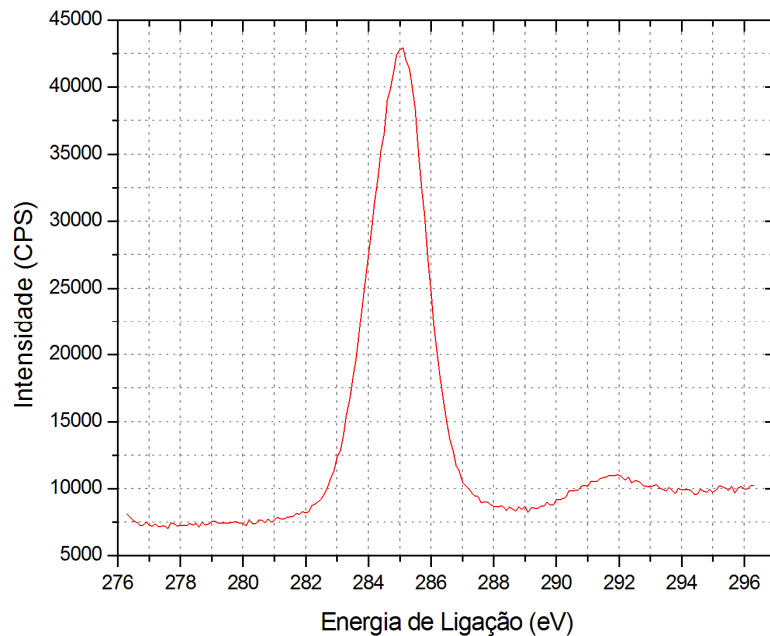


Figura 4.17: Espectro de XPS, na região do carbono 1s, de partículas de PS depositadas pela técnica de eletrospray sobre silício

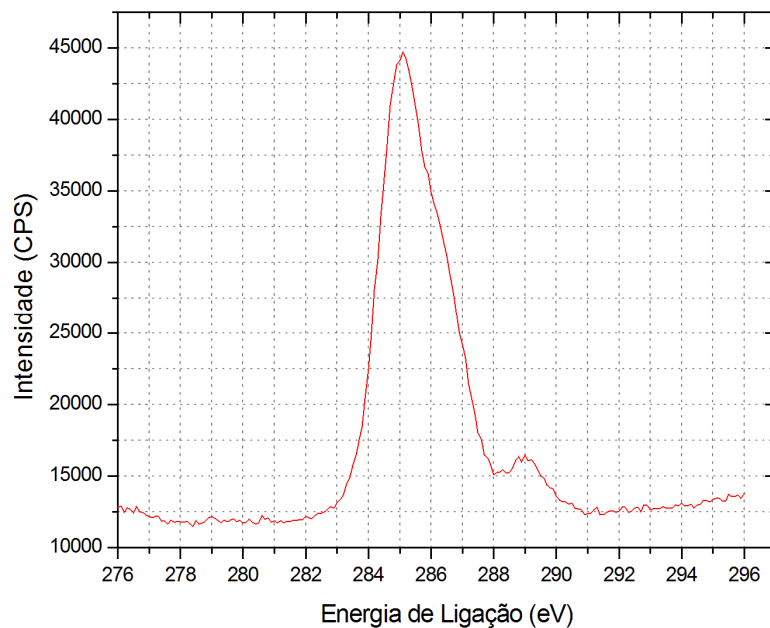


Figura 4.18: Espectro de XPS, na região do carbono 1s, de partículas depositadas pela técnica de eletrospray sobre solução de água bidestilada com ácido acético.

O gráfico da figura 4.18 mostra que as partículas depositadas sobre ácido acético possuem uma característica química diferente das demais, apresentando três picos de energia. Observa-se no gráfico comparativo da figura 4.19 que o pico que representa o anel benzênico desaparece, e outros dois picos surgem [25].

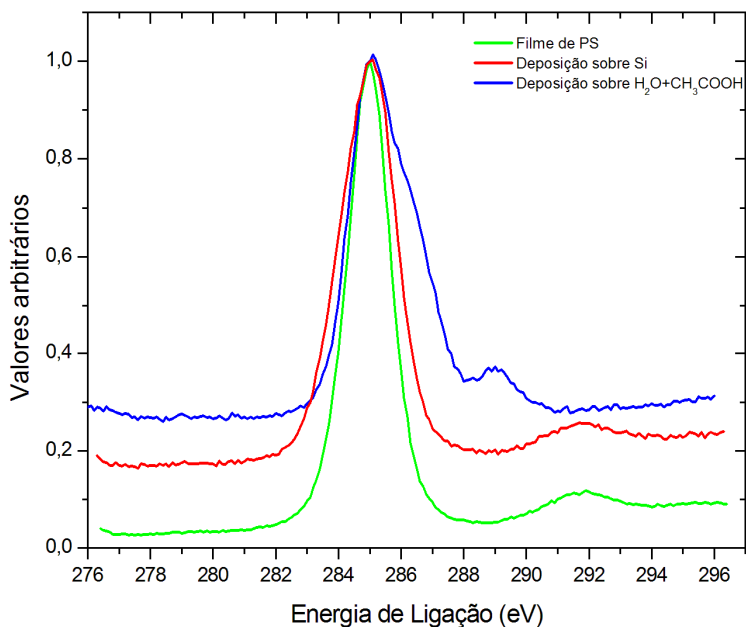


Figura 4.19: Combinação dos três espectros mostrados nas figuras 4.15, 4.16 e 4.17.

O gráfico da figura 4.20 mostra a deconvolução dos picos apresentados no gráfico da figura 4.18. O pico A representa as ligações C-C e C-H, presente nos outros espectros, o pico B representa a ligação C-O, sendo esse oxigênio pertencente à hidroxila (OH) e o pico C representa a ligação C=O.

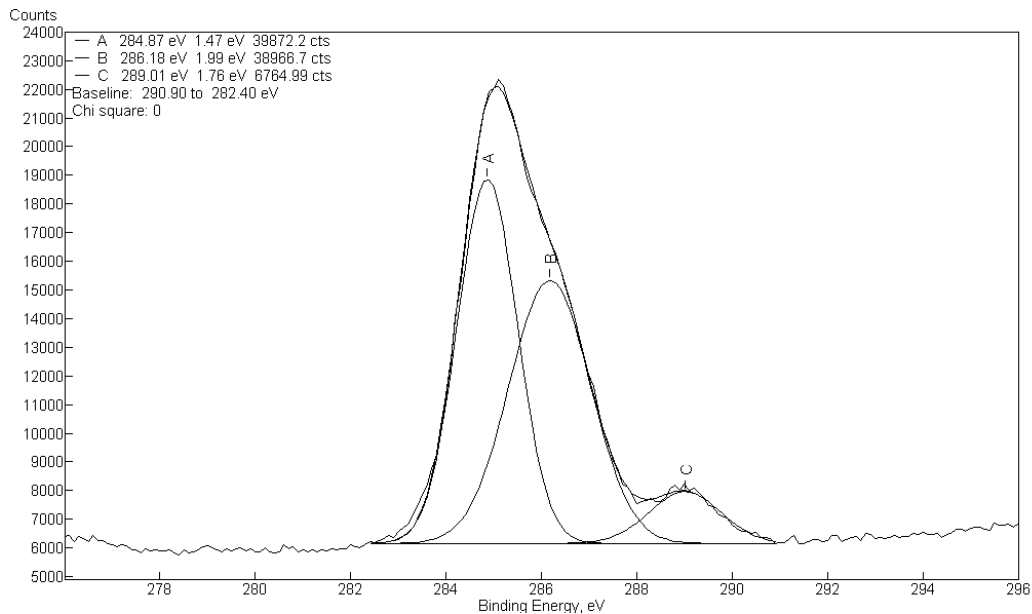


Figura 4.20: Separação dos picos do espectro de energia das partículas de PS não carboxilado depositadas sobre água com ácido acético.

As análises de XPS foram realizadas no Laboratório de Superfícies e Interfaces da UFPR.

#### ***4.4. Micro-esferas aptas para utilização em sistemas de diagnóstico***

As amostras apresentadas nas seções anteriores foram preparadas com o intuito de realizar as análises especificadas. Alguns testes realizados mostraram que é possível que se depositem partículas esféricas aptas para a utilização em sistemas de diagnóstico.

A figura 4.21 mostram micro-partículas de PS depositadas sobre uma solução de água e NaCl, e pode-se observar que elas têm um padrão esférico. A figura 4.22 mostra uma micro-partícula de PS depositada sobre solução de água e NaCl e caracterizada quanto à sua ativação biológica e pode-se observar que ela também apresenta um padrão esférico e é apta para a utilização em diagnóstico, uma vez que houve sucesso em sua bio-ativação.

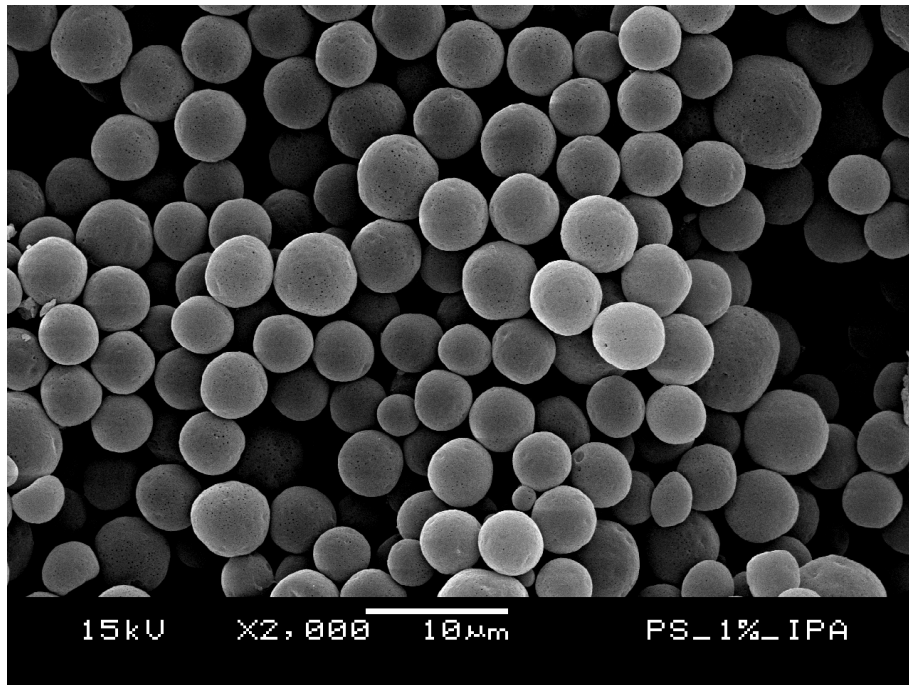


Figura 4.21: Micro-esferas de PS depositadas sobre solução de água e NaCl.

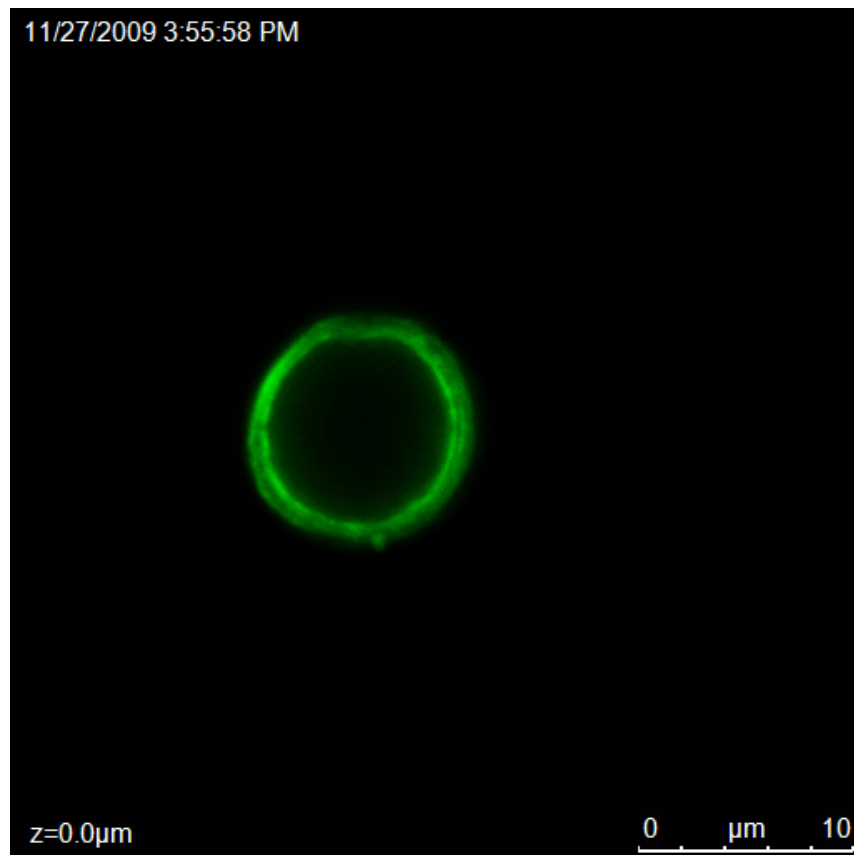


Figura 4.22: Micro-esfera de PS depositada sobre solução de água e NaCl após bio-ativação.

## Capítulo 5. Conclusões

Com a realização deste trabalho foi possível dominar de forma razoável a técnica de eletrospray para a obtenção de micro-partículas de poliestireno da maneira mais conveniente para a utilização em sistemas de diagnóstico.

Observou-se que, em geral, os dados obtidos condizem com a bibliografia consultada e que os resultados são condizentes com os fenômenos físicos esperados. Nem todos os parâmetros estão bem controlados ou condizem inteiramente com o esperado, mas não de maneira a refutar a teoria, mas no sentido de que é necessário um estudo mais aprofundado dos mesmos.

Objetivamente, pode-se concluir que:

- Como esperado, o tamanho médio das partículas obedece a um padrão crescente com relação à concentração da solução utilizada, taxa de vazão, viscosidade absoluta e tensão superficial do solvente.

- Conforme reportado em estudos anteriores, o tamanho médio das partículas obedece a um padrão decrescente com relação ao ponto de ebulição do solvente, para um certo intervalo, porém esse parâmetro deve ser mais cuidadosamente estudado. Isso indica que quanto mais tempo leva pra evaporar o solvente, mais facilmente as gotas de solução são quebradas em gotículas menores, o que é razoavelmente condizente com o que se espera fisicamente do fenômeno.

- Não há a necessidade de se trabalhar com o copolímero PS carboxilado, uma vez que é possível que as partículas depositadas venham a obter a carboxila quando, ainda carregadas, se depositam sobre um meio aquoso iônico, o que é conveniente, uma vez que tanto a síntetização do copolímero quanto a sua deposição por eletrospray são de difícil realização.

- As partículas depositadas por eletrospray são totalmente aptas para a utilização em ensaios imunológicos, uma vez que se tornam sensíveis aos materiais biológicos depois de estarem carboxiladas.

- É possível obter partículas quase totalmente esféricas aptas para a utilização em sistemas de diagnóstico.

Portanto, o trabalho cumpriu com os objetivos propostos e abriu alguns caminhos para estudos posteriores.

# Referências Bibliográficas

- [1] Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotakic, S. Ramakrishna, A Review on polymer nanofibers by eletrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, No. 63, pp. 2223-2253, April, 2003
- [2] D. Fantini, M. Zanetti, L. Costa, Polystyrene Microspheres and Nanospheres Produced by Eletrospray, *Macromolecular Rapid Communications*, No. 27, pp. 2038-2042, September, 2006
- [3] A. E. M. Crotti, R. Vessecchi, J. L. C. Lopes, N. P. Lopes, Espectrometria de massas com ionização por "eletrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular, *Química Nova*, Vol. 29, No. 2, 2006.
- [4] E. M. Stori, C. K. Saul, Deposição de Nanofios Poliméricos sobre Silício e Vidro, Livro de Resumos XIV Evento de Iniciação Científica UFPR, 2006, p. 220
- [5] O. V. Salata, Tools of Nanotechnology eletrospray, *Current Nanoscience*, No. 1, pp. 24-33, 2005
- [6] G. Eda, S. Shivkumar, Bead structure variations during eletrospinning of polystyrene, *Journal of Material Science*, No. 41, pp. 5704-5708, June , 2006
- [7] Z. M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotakic, S. Ramakrishna, A Review on polymer nanofibers by eletrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, No. 63, pp. 2223-2253, April, 2003
- [8] J. Zeleny, The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces, *The Physical Review*, Vol. III, No. 2, pp. 69-91, February, 1914

- [9] C. H. Park, J. Lee, Electrospayed Polymer Particles: Effect of the Solvent Properties, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 114, pp. 430-437, March, 2009
- [10] J. Zheng, A. He, J. Li, J. Xu, C. C. Han, Studies on the controlled morphology and wettability of polystyrene surfaces by electrospinning or electrospaying, *Polymer*, No. 47 pp. 7095-7102, August, 2006
- [11] T. Jarusuwannappom, W. Hongrojjanawiwat, S. Jitjaicham, L. Wannatong, M. Nithitanakul, C. Pattamaprom, P. Koombhongse, R. Rangkupan, P. Supaphol, Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers, *European Polymer Journal*, No. 41 pp. 409-421, December 2004
- [12] R. R. Martel, M. P. Rounseville, I. W. Botros, B. E. Seligmann, *Array Formats*, In: *Microarray Technology and Its Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, 3-22
- [13] QIAGEN, LiquidChip® Application Handbook, Luminex Corp., February, 2006.
- [14] K. L. Hanson, L. Filipponi, D. V. Nicolau, *Biomolecules and Cells on Surfaces: Fundamental Concepts*, In: *Microarray Technology and Its Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, 23-44
- [15] A. Carriillo, K. V. Gujraty, R. S. Kane, *Surfaces and Substrates*, In: *Microarray Technology and Its Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, 45-61.
- [16] R. F. Boyer, H. Keskkula, A. Platt "Styrene Polymers" in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* 1st ed., Vol. 13, pp. 128–447, John Wiley & Sons, 2000

- [17] F. Poletto, *Estudo físico-químico de micropartículas compostas por P(HB-HV) e por blendas de P(HB-HV) e PCL contendo fármacos-modelo lipofílicos ionizáveis*, Porto Alegre (FRGS), 2006.
- [18] P. W. Hawkes, J. C.H. Spence, *Scanning Electron Microscopy*, In: Science of Microscopy, New York: Springer Science+Business Media, LLC 2007, 133–272
- [19] G. H. Michler, *Scanning Electron Microscopy*, In: Electron Microscopy of Polymers, Verlag, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008, 88–120
- [20] S. W. Paddock, *An Introduction to Confocal Imaging*, In: Confocal Microscopy: Methods and Protocols, Humana Press Inc., New Jersey, 1999, 1-34
- [21] Edilene C.S. Marchi, *Revisão de Microscopia*, Universidade Federal de Lavras, 2005
- [22] D. Pleul, F. Simon, *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, In: Polymer Surfaces and Interfaces, Verlag, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008, 71–89.
- [23] D. Schild, *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, In: Hydrogen Technology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008, 575-598
- [24] J. F. Watts, J. Wolstenholme, *Electron Spectroscopy: Some Basic concepts*, In: An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES, J. Wiley, Chichester, UK, 2003
- [25] G. Beamson, D. Briggs, High Resolution XPS of Organic Polymers The SCIENTA ESCA300 Database, J. Wiley, Chichester, UK, 1992.