

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir de
24/09/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Materiais - POSMAT

Paula Pereira Campos

DESENVOLVIMENTO DE FILMES NANOESTRUTURADOS LAYER-BY-
LAYER COM FOCO EM SISTEMAS DE MATERIAIS SENSÍVEIS A
ESTÍMULOS

SOROCABA

2018

Paula Pereira Campos

DESENVOLVIMENTO DE FILMES NANOESTRUTURADOS LAYER-BY-LAYER COM FOCO EM SISTEMAS DE MATERIAIS SENSÍVEIS A ESTÍMULOS

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração Biomateriais, sob a orientação da Profa. Dra. Marystela Ferreira.

Sorocaba

2018

Campos, Paula Pereira.

Desenvolvimento de filmes nanoestruturados
Layer-by-Layer com foco em sistemas de materiais
sensíveis a estímulos / Paula Pereira Campos,
2018

162 f. : il.

Orientador: Marystela Ferreira

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2018

1. Liberação modulada de fármacos. 2. Filmes
nanoestruturados. 3. Materiais inteligentes. 4.
Biomateriais I. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE PAULA PEREIRA CAMPOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS , DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 24 dias do mês de setembro do ano de 2018, às 13:30 horas, no(a) UFSCar - Campus de Sorocaba, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof^ª. Dr^ª. MARYSTELA FERREIRA - Orientador(a) do(a) Campus Sorocaba / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Profa. Dra. LAURA OLIVEIRA PÉRES PHILADELPHI do(a) Ciências Exatas e da Terra / Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO do(a) Engenharia Ambiental / Departamento de Engenharia Ambiental / Unesp - Sorocaba, Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI do(a) Departamento de Química / Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, Prof^ª Dr^ª CLARISSA DE ALMEIDA OLIVATI do(a) Departamento de Física / UNESP/ Câmpus de Presidente Prudente, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de PAULA PEREIRA CAMPOS, intitulada **Desenvolvimento de filmes nanoestruturados Layer-by-Layer com foco em sistemas de liberação controlada** . Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovada . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof^ª. Dr^ª. MARYSTELA FERREIRA *Marystela Ferreira*

Profa. Dra. LAURA OLIVEIRA PÉRES PHILADELPHI *Laura Philadelph*

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO *Leonardo Fernandes Fraceto*

Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI *Margarida Juri Saeki*

Prof^ª Dr^ª CLARISSA DE ALMEIDA OLIVATI *Clarissa Olivati*

Desenvolvimento de filmes nanoestruturados
layer-by-layer com foco em sistemas de
materiais sensíveis a estímulos.

Resultado homologado em reunião
de 16/10/18.


Prof. Adj. Luiz Carlos da Silva Filho
Coordenador do Programa

Maytêe Kemi
Ricardo Soares Santos
Claudia Olivati
Sandra OL
Mayara de Jesus

Aos meus pais Paulo e Sueli e meus
irmãos Rodrigo e Fernanda.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, em especial à minha orientadora Professora Marystela Ferreira pela orientação, confiança e apoio.

Aos meus pais Paulo e Sueli que sempre me incentivaram a estudar e procurar os caminhos corretos, com amor e dedicação. Aos meus irmãos Fernanda e Rodrigo, por serem exemplos, amigos e companheiros. Aos meus avós pelo amor e cuidado. Ao Bóris pelo amor de cachorro e companhia para todas as horas.

Ao professor Dermot Diamond e Larisa Florea por me receberem tão bem em seu grupo de pesquisa na Irlanda e me auxiliarem no caminho científico. E aos demais do grupo Danielle Bruen, Colm Delaney e Aishling Dunne pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados.

À amiga Natália Mendes pelo companheirismo, apoio e paciência ao longo dessa jornada e ao Felipe Stark pelos memes de apoio, conversas divertidas e amor.

Aos amigos de laboratório Daniela Branco, Cristiane Daikuzono, Jéssica Cristina, Michelle Pinto, André Lopes, Juliana Graça, Douglas Eleutério, Gustavo Rodrigues, Anna Flávia Ravanelli, João Victor, Daiane Piva, Eduardo Anunciação, Angela Maria e Natália Cozza pela amizade.

Aos amigos Gabriela Quitério, Nathália Mariano, Stella Hiroki, Daianne Maciely, Rafael Ferreira, Adina e Zoli Balog pela amizade em terras distantes.

Ao professor Leonardo Fernandes Fraceto pelo auxílio e colaboração na realização deste trabalho e ao Jhones Luiz de Oliveira pelas análises de NTA. A Anerise de Barros pelas análises de FTIR e a Celina Miyazaki pela colaboração com as análises por SPR.

A CAPES pelo apoio financeiro possibilitando a realização deste trabalho no Brasil e na Irlanda.

À UFSCAR Sorocaba por conceder o espaço para a elaboração do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho o meu obrigado!

Resumo

CAMPOS, Paula Pereira. Desenvolvimento de filmes nanoestruturados **Layer-by-Layer com foco em sistemas de materiais sensíveis a estímulos**. 2018. 162 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências, Sorocaba, 2018.

Neste trabalho foram desenvolvidos diferentes tipos de filmes Layer-by-Layer (LbL) sensíveis a variação de pH, temperatura, exposição a luz e presença de carboidratos, com o objetivo de criar sistemas com resposta a estímulos que podem ser aplicados na área médica e ambiental para a entrega modificada de fármacos e pesticidas. O trabalho foi dividido em três partes, sendo o primeiro focado na liberação da emodina. Foram fabricados filmes com a emodina imobilizada diretamente e outra em que o fármaco foi encapsulado nos lipossomos formados por dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e palmitoil fosfatidil glicerol (POPG) e então intercalado com polieletrólitos. Ambos os filmes foram expostos a condições fisiológicas e liberaram a emodina por um período prolongado em função da mudança de pH e temperatura. A segunda parte do trabalho é focado na construção de filmes com um polímero baseado em espiropirano (poli(SP-R)), um composto que quando recebe luz UV é convertido para a forma aniônica merocianina (poli(MC-R)) mudando sua cor e carga superficial. O filme foi composto pelo polycation poli(alilamina hidrocloreada) (PAH) formando o (PAH/poli(SP-R))_n que se desprende do substrato pelo processo *disassembly* após longo tempo de exposição à luz branca. Na terceira parte do trabalho foram desenvolvidos filmes com o polímero baseado em ácido fenil borônico (PBA), que tem a capacidade de se ligar covalentemente à açúcares. Foram fabricados intercalado com PVS resultando no filme (PEI/PVS)₂(PBAp/PVS)_n. Também foram preparados filmes com o corante fluorescente piranina como poliânion, substituindo o PVS, a fim de verificar o crescimento e decomposição do filme com moléculas relativamente pequenas, formando (PEI/PVS)₂(PBAp/PYR)_n e ambos os filmes foram capazes de responder em segundos a

presença de frutose. Os filmes desenvolvidos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas como UV-vis, Fluorescência, Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância Plasmônica de Superfície, além de elipsometria, Microscopia Eletrônica de Varredura e técnicas eletroanalíticas. As soluções usadas no preparo do filme foram estudadas por Potencial Zeta e Espalhamento de Luz Dinâmico. A partir do desenvolvimento de sistemas responsíveis à estímulos podem ser fabricados no futuro dispositivos para a área médica como curativos, para a área ambiental que façam um controle de liberação de pesticidas ou mesmo embalagens inteligentes para alimentos que podem liberar um aditivo ou agir na absorção da luz.

Palavras-chave: *Layer-by-Layer*; *Disassembly*; Liberação modificada; *Stimuli responsive*.

Abstract

CAMPOS, Paula Pereira. **Development of Layer-by-Layer nanostructured films with focus in systems of materials sensitive to stimuli**. 2018. 162 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências, Sorocaba, 2018.

In this work, we developed some types of Layer-by-Layer (LbL) films sensible to pH and temperature changes, light exposition and carbohydrates solutions, with the aim of to create stimuli responsive system that can be applied to medical and environmental area to drug and pesticide modulated delivery. The work was divided in three parts, the first one is based on delivery emodin. One film was fabricated with emodin immobilized directly and other the drug was encapsulated on liposomes formed by dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG) e palmitoyl phosphatidyl glycerol (POPG) and the carrier was intercalated with polyelectrolytes. Both systems were exposed to physiologic conditions and released the emodin for prolonged time in function of pH and temperature changes. On second part of this work it was focused on construction of film with spyropiran (SP) based polymer (poli(SP-R)). The UV irradiation over (poli(SP-R)) causes the conversion to anionic and purple merocyanine molecule (poli(MC-R)) changing the color and surface charge. The film were composed by poly(allylamine hydrochloride) (PAH) and poly(SP-R) forming the (PAH/pol(SP-R))_n LbL film which disassemble after long time exposed to white light. On third part of work, films were developed with phenyl borônico acid (PBA) based polymer that has the capacity to bind covalently on sugars. The films were intercalated with PVS creating the coating (PEI/PVS)₂(PBAP/PVS)_n. It were prepared also a film with the pyranine (PYR), the fluorescent dye like a polianion, replacing the PVS, in order to check the growing and deposition of film with relatively small molecules, forming the (PEI/PVS)₂(PBAP/PYR)_n. Both films were able to disassemble fastly on fructose solution. The films developed were characterized by UV-vis, Fluorescence, Fourier Transform Infrared (FTIR) and Plasmon

Ressonance Surface spectroscopy techniques, besides Ellipsometry, Scanning Electronic Microscopy (SEM) and electroanalytical techniques. The solutions used to fabricate the films were studied by Zeta Potential and Dynamic Light Scattering. Therefore, with development of responsive systems can be fabricated on future devices on medical field to apply on patches, on environment area to pesticide control release or even in smart packaging to food that can release additions or to age on light absorption.

Keywords - Layer-by-Layer; Disassembly; Modified release; Stimuli responsive.

Lista de Figuras

Figura 1 – Exemplos de transições associadas aos materiais estímulo responsáveis, (i) desagregação de polímeros anfifílicos, (ii) mudança de volume e (iii) mudança de conformação de estrutura, esticado ou enrolado.	31
Figura 2 – Diferença entre um sistema de liberação responsivo e não responsivo.	33
Figura 3 – Sistema de liberação controlada por retroalimentação.....	33
Figura 4 - Esquema de montagem de um filme pela técnica LbL.....	36
Figura 5 – Esquema do processo <i>disassembly</i> de um filme LbL em resposta ao recebimento estímulos térmicos, ópticos, mecânicos ou diferenças de pH ou força iônica.....	38
Figura 6 – Estrutura química da emodina.....	42
Figura 7 - Representação de uma bicamada lipídica partir de fosfolipídios e um lipossomo ..	44
Figura 8 - Representação de uma molécula de fosfolipídio e classificação dos lipossomos em relação ao seu tamanho: SUV, LUV e MLV.....	44
Figura 9 - Representação esquemática da preparação do lipossomo.....	49
Figura 10 - (A) Suporte adaptado do tubo Falcon com o substrato de quartzo. (B) Suporte envolvido pela membrana de diálise, presa por elástico e tampa.	52
Figura 11 - Foto de momento do vídeo gravado a partir da dispersão de luz causada por lipossomos (A) DPPG-POPG e (B) DPPG-POPG-EM, obtidos pela técnica de NTA.....	56
Figura 12 - Distribuição de tamanho dos lipossomos DPPG-POPG obtidos a partir das análises de NTA: (A) cada cor representa uma das 5 medidas e (B) média da distribuição do tamanho.	57
Figura 13 - Distribuição de tamanho dos lipossomos DPPG-POPG-EM obtidos a partir das análises de NTA: (A) cada cor representa uma das 5 medidas e (B) média da distribuição de tamanhos.....	57

Figura 14 - Espectro UV-vis de solução de emodina em (A) tampão/etanol e (B) água/etanol.	59
Figura 15 - Espectro UV-vis da solução de lipossomos DPPG-POPG-EM.....	60
Figura 16 - Cinética de adsorção da emodina em filme LbL alternada com PEI.....	61
Figura 17 – Espectros UV-vis de cada bicamada do filme $(PE/PVS)_2(PEI/EM)_7$ e absorbância em 310 nm em função do número de bicamadas.....	62
Figura 18 – Espectro infravermelho do filme <i>cast</i> de emodina e dos filmes LbL $(PEI/PVS)_2$ e $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$	63
Figura 19 – (A) Espectros UV-vis de cada bicamada do filme $(PEI/PVS)_2(PEI/DPPG-POPG-EM)_7$. (B) absorbância em 310 nm em função do número de bicamadas	66
Figura 20 - Espectro infravermelho dos filmes <i>cast</i> da emodina (preto), de lipossomos DPPG/POPG (vermelho) e dos filmes LbL de polieletrólitos $(PEI/PVS)_{10}$ (verde) e $(PEI/PVS)_2(PEI/DPPG-POPG-EM)_7$ (azul).	67
Figura 21 - Somatória da absorbância das soluções provenientes do filme $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$ ao longo do tempo. À esquerda o gráfico completo e a direita um aumento até 720 minutos.....	69
Figura 22 - Somatória da absorbância das soluções provenientes do filme $(PEI/PVS)_2(PEI/DPPG-POPG-EM)_7$ ao longo do tempo.....	70
Figura 23 – Mudanças da estrutura da emodina com a mudança de pH.	71
Figura 24 – Voltametria cíclica dos filmes (A) $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$ e (B) $(PEI/PVS)_2(PEI/DPPG-POPG-EM)_7$ em tampão fosfato de sódio com valores de pH de 5,5, 6,75 e 8 e velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (C) Estrutura química da emodina.	73
Figura 25 - Representação da formação da gota sobre as superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas.	74

Figura 26 – Perfil de gotas de água deionizada sobre o vidro hidrofílico e os filmes LbL (PEI/PVS) ₂ , (PEI/PVS) ₂ (PEI/EM) ₁₀ e (PEI/PVS) ₂ (PEI/DPPG-POPG-EM) ₁₀	75
Figura 27 – Curvas angulares de SPR do filme Au-MUA/(PEI/PVS) ₂ (PEI/EM) ₁ a cada etapa de fabricação. Pontos e linhas tracejadas indicam resultados experimentais e curvas simuladas, respectivamente.	76
Figura 28 – Determinação do índice de refração e da espessura de cada camada do filme Au-MUA(PEI/PVS) ₂ /(PEI/EM) ₁ através da intersecção das curvas $d - n$ para cada camada.	78
Figura 29 - Mudança reversível entre a forma fechada espiropirano (SP) e aberta merocianina (MC) induzido por luz.	82
Figura 30 – Esquema de micelas compostas por SP sintetizadas em poligliceróis que se formam sob luz visível e desmancham em resposta à luz UV.	83
Figura 31 – (A) Esquema de irradiação por luz branca do filme (PMC/PDADMAC) ₅ (PDADMAC/PSS) _n . (B) Enxague do filme com água. (C) O filme após ser removido.	84
Figura 32 – Esquema de fabricação do filme (PAH/poli(SP-R)) ₅ . A lâmina de vidro foi imersa em (1) solução de PAH, (2) água deionizada, (3) solução de poli(MC-R) e (4) água deionizada, formando uma bicamada sobre a lâmina.	88
Figura 33 – Esquema do teste de desprendimento do filme mergulhado em DMF:água sob luz branca. Os pontos em lilás e as manchas claras na lâmina representam pedaços do filme que se já se soltaram.	90
Figura 34 – Espectros UV-vis das soluções de monômero SP-R (A) e polímero poli(SP-R) (B) preparados em DMF:água (3:1) (v:v), 0,17 mg.mL ⁻¹ . As soluções foram expostas à luz ultravioleta (UV) e luz branca (LB) em ciclos intercalados de 1, 2 e 3 minutos.	93
Figura 35 – Estruturas químicas ilustrando a mudança reversível entre a forma fechada espiropirano (SP) e aberta merocianina (MC) induzido por luz na matriz polimérica.	93

Figura 36 - Solução do monômero (A) SP-R \leftrightarrow (B) MC-R em DMF que são convertidas com luz UV e visível.	94
Figura 37 – Solução de (A) poli(SP-R) \leftrightarrow (B) poli(MC-R) em DMF que são convertidas com luz UV e visível.	94
Figura 38 – Distribuição de tamanho do poli(SP-R) em solução de DMF, 0,1 mg.mL ⁻¹ , com pico máximo em 206 nm.	95
Figura 39 – Potencial zeta da solução de poli(MC-R) em DMF, 0,1 mg.mL ⁻¹ , apresentando dois picos, um positivo em 95,00 mV com uma contagem de 22929,7 e outro negativo em -9,87 mV com contagem de 127701,0, coerente com a natureza zwitteriônica da merocianina.	96
Figura 40 – Potencial zeta da solução de poli(MC-R) em DMF, 0,1 mg.mL ⁻¹ , dez minutos após ser exposta à luz UV, com um pico em 39,6 mV e contagem de 2304, indicando que a forma MC está retornando para SP, neutra.....	96
Figura 41 – (A) Espectros de cada bicamada do filme (PAH/poli(SP-R)) ₁₀ com a solução de poli(SP-R) preparado em DMF. (B) Absorbância do filme (PAH/poli(SP-R)) ₁₀ em $\lambda = 370$ nm vs o número de bicamadas.	97
Figura 42 - (A) Espectros de cada bicamada do filme (PAH/poli(SP-R)) ₁₀ com a solução de poli(SP-R) preparado em DMF:água na proporção 3:1 (v:v). (B) Foto do filme (PAH/poli(SP-R)) ₁₀ após ser exposto a luz UV por 3 minutos. (C) Absorbância do filme (PAH/poli(SP-R)) ₁₀ em $\lambda = 345$ nm vs o número de bicamadas. (D) Absorbância do filme (PAH/poli(SP-R)) ₁₀ em $\lambda = 590$ nm vs o número de bicamadas.....	98
Figura 43 – (A) Espectro UV-vis do filme (PAH/poli(SP-R)) ₅ submetido a ciclos de UV/LB durante 1, 2 e 3 minutos intercalados, mostrando as mudanças na banda visível, em $\lambda=590$ nm. (B) Variação da absorbância em $\lambda=590$ nm entre os filmes (PAH/poli(SP-R)) ₅ e (PAH/poli(MC-R)) ₅ a cada ciclo UV/LB.	100

Figura 44 – Absorbância em $\lambda = 345$ nm do filme (PAH/poli(MC-R)) ₅ em diferentes tempos, depois de exposto à luz branca (▲), controle (filme dentro da caixa protegido de luz) (■) e da linha de base (cubeta de quartzo com solução de DMF e água) (●). A linha vermelha representa o modelo de cinética de primeira ordem.	102
Figura 45 – Perfilometria do filme (PAH/poli(SP-R)) ₁ com uma bicamada sobre o silício, apresentando em média 27,5 nm de altura, como indicado pela linha vermelha.	103
Figura 46 - Perfilometria do filme (PAH/poli(SP-R)) ₅ com cinco bicamadas sobre o silício, apresentando em média 165 nm de altura, como indicado pela linha vermelha.	103
Figura 47 - Perfilometria do filme (PAH/poli(SP-R)) ₅ com cinco bicamadas sobre o silício, após ter sido exposto à luz branca por período prolongado, apresentando em média 11 nm de altura, como indicado pela linha vermelha.	104
Figura 48 – Esquema de fabricação do filme (PAH/poli(SP-R)) ₅ em degraus (A). Imagens de MEV de cada uma das 5 bicamadas do filme (PAH/poli(SP-R)) ₅ representado por Bi 1 (bicamada 1), Bi 1 (bicamada 2), Bi 3 (bicamada 3), Bi 4 (bicamada 4), Bi 5 (bicamada 5). A barra vermelha representa a escala de 2 μ m.	106
Figura 49 – Esquema de adsorção de polieletrólitos com baixa densidade de carga (acima) e alta densidade de carga (abaixo).	106
Figura 50 – Esquema de ligação covalente entre a molécula de PBA e um diol em meio ácido ou básico.	109
Figura 51 – Esquema de hibridização das formas sp^2 para sp^3 do ácido borônico.	110
Figura 52 – Esquema de ligação pelo boronato éster entre o dendrímero e o PVS no filme LbL, à esquerda. Decomposição do filme pela troca da ligação do dendrímero com o PVA pela ligação com a glicose, á direita.	112

Figura 53 - Esquema de montagem do filme LbL de PVA e PBA, e decomposição na presença de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) com a quebra da ligação carbono-boro, a partir da oxidação da glicose pela GOX.....	113
Figura 54 – Estrutura química do monômero e polímero baseado em ácido fenil borônico (PBA) nomeados de MEAFB e APEAFB à esquerda e à direita respectivamente.	115
Figura 55 – Representação esquemática do processo <i>disassembly</i> do filme (PBA _p /PVS) _n , o vermelho representa o polímero poli(PBA), o azul o PVS e o amarelo a frutose.....	117
Figura 56 – Potencial zeta da solução de poli(BA) analisado em intervalos de pH entre 5,2 e 12,1. A curva de calibração mostra a variação do potencial zeta em função do pH. A figura também apresenta as estruturas químicas do PBA em solução ácida e básica.....	120
Figura 57 – Estrutura química dos isômeros do polímero de BA na posição (A) <i>orto</i> , (B) <i>meta</i> e (C) <i>para</i>	121
Figura 58 – Espectros UV-vis de cada bicamada dos filmes (PEI/PVS) ₂ (PBA _o) ₅ , (PEI/PVS) ₂ (PBA _m) ₅ e (PEI/PVS) ₂ (PBA _p) ₅	122
Figura 59 - Relação entre a absorvância em $\lambda = 230$ nm e o número de bicamadas dos filmes (PEI/PVS) ₂ (PBA _o /PVS) ₅ , (PEI/PVS) ₂ (PBA _m /PVS) ₅ e (PEI/PVS) ₂ (PBA _p /PVS) ₅ . As linhas vermelhas representam regressão linear da deposição de cada filme.....	122
Figura 60 – (A) Espectros UV-vis de cada bicamada do filme LbL (PEI/PVS) ₂ (PBA _p /PVS) ₁₅ . (B) Relação entre a absorvância em $\lambda = 230$ nm e o número de bicamadas do filme.....	123
Figura 61 – Espectros de FTIR dos filmes feitos por <i>drop casting</i> dos materiais puros PEI, PVS e poli(PBA _p) e do filme LbL (PEI/PVS) ₂ (PBA _p /PVS) ₁₅ . As setas vermelhas indicam as diferenças entre os materiais puros e o filme LbL.....	126
Figura 62 – Espectros do filme (PEI/PVS) ₂ (PBA _p /PVS) ₅ em: (A) em tampão fosfato e em solução glicose 100 mmol.L ⁻¹ e (B) em tampão fosfato e em solução de frutose 100 mmol.L ⁻¹	129

Figura 63 – Absorbância do filme (PEI/PVS) ₂ (PBAp) ₅ inicial, 30 e 60 minutos após mergulhado em tampão fosfato e segundos na solução de frutose na concentração de 10 mmol L ⁻¹	130
Figura 64 - Absorbância do filme (A) (PEI/PVS) ₂ (PBAo) ₅ e (B) (PEI/PVS) ₂ (PBAm) ₅ inicial, 30 e 60 minutos após mergulhado em tampão fosfato e segundos em solução de frutose na concentração de 10 mmol.L ⁻¹	131
Figura 65 – (A) Espectro de absorbância da solução de piranina, no eixo y á esquerda, e de cada bicamada do filme LbL (PEI/PVS) ₂ (PBAp/Pyr) ₅ á direita. (B) Estrutura química da piranina. (C) Relação entre a absorbância do filme (PEI/PVS) ₂ (PBAp/Pyr) ₅ em $\lambda = 410$ nm e o número de bicamadas.	133
Figura 66 – Espectro de excitação do filme (PEI/PVS) ₂ (PBAp/PVS) ₅ para emissão em $\lambda = 500$ nm (linha preta) e espectros de emissão quando excitado em $\lambda = 376$ nm (linha vermelha) e $\lambda = 405$ nm (linha azul).	134
Figura 67 – Espectros FTIR dos filmes casting de PEI, PVS, piranina, PBAp e do filme LbL (PEI/PVS) ₂ (PBAp/PYR) ₂₀ . As setas vermelhas indicam as diferenças entre o filme LbL e os materiais puros.....	136
Figura 68 – Análise de perfilômetria do filme (PEI/PVS) ₂ (PBAp/PYR) ₅	139
Figura 69 – Espectros de absorbância do filme (PEI/PVS) ₂ (PBAp/PYR) ₅ inicial e após 15 minutos em tampão.....	140
Figura 70 – No eixo esquerdo, em preto está a absorbância do filme (PEI/PVS) ₂ (PBAp/PYR) ₅ em $\lambda = 410$ nm, inicial, minutos em tampão e segundos em solução de frutose, 30 mmol.L ⁻¹ . No eixo direito, em azul está a intensidade das soluções provenientes de cada etapa do processo de liberação.....	141

Lista de tabelas

Tabela 1 – Valores de moda, média e concentração dos lipossomos obtidos por NTA.....	58
Tabela 2 - Atribuições das bandas observadas no espectro FTIR dos filmes: <i>cast</i> de emodina e LbL do (PEI/PVS) ₂ e (PEI/PVS) ₂ (PEI/EM) ₇	64
Tabela 3 - Atribuições das bandas observadas no espectro FTIR dos filmes <i>cast</i> de emodina, lipossomos DPPG/POPG e LbL de polieletrólito (PEI/PVS) ₂ e (PEI/PVS) ₂ (PEI/DPPG-POPG-EM) ₇	67
Tabela 4 - Espessura e índice de refração de cada camada do filme AU-MUA(PEI/PVS) ₂ (PEI/EM) ₁	77
Tabela 5 - Atribuições das frequências de vibração dos materiais puros PBAP, PEI, PVS e do filme LbL (PEI/PVS) ₂ (PBAP/PVS) ₂₀	126
Tabela 6 – Atribuições das frequências de vibração dos filmes feitos pelo método <i>drop casting</i> de PBAP, PEI, PVS, Piranina e do filme LbL (PEI/PVS) ₂ (PBAP/PYR) ₂₀	136

Abreviaturas

DCU - Universidade da Cidade de Dublin, do inglês *Dublin City University*

DLS - Espalhamento de Luz Dinâmico, do inglês *Dynamic Light Scattering*

DMF - Dimetilformamida

DPPG - Dipalmitoil fosfatidil glicerol

EM - Emodina

FTIR - Espectroscopia por transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GO_x- Glicose Oxidase

LB – Luz branca

LbL – Camada por camada, do inglês *Layer-by-Layer*

LMV – Vesícula multilamelar grande, do inglês *large multilamellar vesicles*

LUV – Vesícula unilamelar grande, do inglês *large unilamellar vesicles*

MC – Merocianina

nm - nanômetros

NTA - Análise e Rastreamento de Nanopartículas, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*

PAH - Poli(alilamina hidrocloreada)

PBS - Tampão fosfato-salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PdI - Índice de Polidispersão, do inglês, *Polydispersion Index*

PEI - Poli (etileno imina)

pH - Potencial de Hidrogênio

Poli(MC-R) - Polímero de merocianina

Poli(SP-R) - Polímero de espiropirano

POPG - Palmitoil oleil fosfatidil glicerol

PVS - Poli(vinil sulfonato de sódio)

PYR - Piranina, do inglês *pyranine*

SCE - Eletrodo de calomelano saturado, do inglês *Saturated Calomel Electrode*

SUV - Vesícula unilamelar pequena, do inglês *small unilamellar vesicles*

SP - Espiropirano, do inglês *Spiropyran*

SPR – Ressonância Plasmônica de Superfície, do inglês *Surface Plasmon Resonance*

THF - Tetraidrofurano

T_v - Temperatura de transição vítrea

UV- Ultravioleta

UV-vis - Ultravioleta-visível

λ = Comprimento de onda

Sumário

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos	29
1.1. Sistemas de liberação modificados	29
1.2. Materiais inteligentes	31
1.3. Liberação modificada de fármacos em resposta à estímulos	32
1.4. Técnica Layer-by-Layer.....	34
1.5. Processo <i>Disassembly</i>	37
1.6. Objetivos gerais	41
2. Capítulo 2 – Desenvolvimento de filmes Layer-by-Layer de emodina.....	42
2.1. Introdução	42
2.1.1. Emodina.....	42
2.1.2. Lipossomos.....	43
2.2. Revisão de literatura	45
2.3. Objetivos.....	46
2.4. Materiais e métodos	47
2.4.1. Preparo de soluções	47
2.4.2. Preparação dos lipossomos.....	48
2.4.3. Limpeza dos substratos.....	49
2.4.4. Fabricação dos filmes	50
2.4.5. Liberação dos filmes.....	51
2.4.6. Instrumentação.....	52

2.5.	Resultados e Discussões	55
2.5.1.	Obtenção dos lipossomos	55
2.5.2.	Solução de emodina.....	58
2.5.3.	Fabricação do filme (PEI/PVS) ₂ (PEI/EM) _n	60
2.5.4.	Fabricação do filme (PEI/PVS) ₂ (PEI/DPPG-POPG-EM) _n	64
2.5.5.	Teste de liberação	68
2.5.6.	Estudos eletroquímicos.....	71
2.5.7.	Estudo de superfície.....	73
2.5.8.	Análises por SPR.....	75
2.6.	Conclusão.....	79
3.	Capítulo 3 – Filmes Layer-by-Layer de espiropirano.....	81
3.1.	Introdução	81
3.2.	Revisão de literatura	83
3.3.	Objetivos.....	85
3.4.	Metodologia.....	86
3.4.1.	Materiais	86
3.4.2.	Síntese do monômero	86
3.4.3.	Síntese do polímero	87
3.4.4.	Fabricação do filme	87
3.4.5.	Teste de estímulo à luz UV/branca.....	89
3.4.6.	Teste <i>disassembly</i>	89
3.4.7.	Instrumentação.....	90

3.5.	Resultados e discussões	92
3.5.1.	Caracterização do polímero poli(SP-R) em solução.....	92
3.5.2.	Caracterização do filme (PAH/poli(MC-R)) _n	96
3.6.	Conclusão.....	107
4.	Capítulo 4 – Filmes Layer-by-Layer de ácido fenil borônico.....	109
4.1.	Introdução	109
4.2.	Revisão de literatura	111
4.3.	Objetivos.....	114
4.4.	Materiais a métodos	114
4.4.1.	Polimerização do ácido fenil borônico (PBA) derivado.....	115
4.4.2.	Fabricação dos filmes	115
4.4.3.	Teste <i>disassembly</i>	116
4.4.4.	Instrumentação.....	117
4.5.	Resultados e discussões	119
4.5.1.	Caracterização do polímero BA em solução	119
4.5.2.	Filmes PVS e PBA	120
4.5.2.1.	Fabricação do (PEI/PVS) ₂ (PBA _x /PVS) ₅	120
4.5.2.1.	Análises por FTIR e perfilometria	123
4.5.2.2.	Teste <i>disassembly</i>	128
4.5.3.	Filmes de piranina e PBA.....	131
4.5.3.1.	Fabricação do filme (PEI/PVS) ₂ (PBA _p /PYR) ₅	131
4.5.3.2.	Análises por FTIR e perfilometria do filme (PEI/PVS) ₂ (PBA _p /PYR) ₅	134

4.5.3.3. Teste <i>disassembly</i>	139
4.6. Conclusão.....	142
5. Capítulo 5 – Conclusões gerais e perspectivas futuras	144

Apresentação

Este trabalho está estruturado em 5 capítulos, sendo o Capítulo 1 dedicado à uma revisão geral sobre os conceitos de sistemas de liberação modificada, filmes Layer-by-Layer e objetivos gerais. O Capítulo 2 descreve a fabricação de filmes de emodina e liberação do fármaco. O Capítulo 3 aborda a fabricação e caracterização de filmes LbL com o agente fotoresponsivo espiropirano e suas propriedades ópticas. No Capítulo 4 está descrito a fabricação de filmes LbL de ácido fenil borônico aplicados à resposta á açucres e no 5 estão as Conclusões gerais e perspectivas futuras. Os resultados mostrados no Capítulo 2 foram provenientes do trabalho realizado na UFSCar/CCTS, enquanto os Capítulos 3 e 4 são do período de doutorado sanduíche realizado na *Dublin City University* na Irlanda, no grupo *Insight Centre for Data Analytics*, com o professor Dr. Dermot Diamond financiado pela Capes/POSMAT.

Os trabalhos originados do período de doutorado são:

- Artigos

- **Campos, Paula P.;** Fraceto, Leonardo Fernandes; Ferreira, Marystela. Layer-by-layer films containing emodin or emodin encapsulated in liposomes for transdermal applications. COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES, v. 162, p. 69-75, 2018.
- **Campos, Paula P.;** Dunne, Aishling; Delaney, Colm; Moloney, Cara; Moulton, Simon E.; Benito-Lopez, Fernando; Ferreira, Marystela; Diamond, Dermot; Florea, Larisa. Photoswitchable layer-by-layer coatings based on

photochromic polynorbornenes bearing spiropyran side groups. LANGMUIR, v. 34, p. 4210-4216, 2018.

- **Campos, Paula P.**; Bruen, Danielle; Delaney, Colm; Ferreira, Marystela; Diamond, Dermot; Florea, Larisa Layer-by-Layer coatings based in phenyl boronic acid polymer applied to fructose response. 2018 (em preparação).

- Capítulo de livro

- Miyazaki, Celina Massumi; de Barros, Anerise; Mascagni, Daniela Branco Tavares; Graça, Juliana Santos; **Campos, Paula Pereira**; Ferreira, Marystela. Self-assembly Thin Films for Sensing. In: T.R.L.C. Paixão; S.M. Reddy. (Org.). Materials for Chemical Sensing. 1ed. Gewerbestrasse: Springer International Publishing, 2017, v. , p. 141-164

- Participação em congressos

- **Campos, Paula P.**; Florea, L.; Ferreira, Marystela; Diamond, D. Spiropyran-based polymers for photo-responsive Layer-by-Layer coatings capable of photo-induced disassembly. In: Advanced Materials for biomedical applications, 2017, Gante/Bélgica. Biomaterial Development and Characterization.
- **Campos, P. P.**; MORAES, MARLI L.; FRACETO, L. F.; FERREIRA, MARYSTELA. Estudo da interação do fármaco emodina em filmes Layer-by-Layer. In: IV Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2016, Sorocaba/São Paulo.

- **Campos, P. P.;** MORAES, MARLI L.; FRACETO, L. F.; FERREIRA, MARYSTELA. Immobilization of Emodin in Layer-by-Layer films for drug delivery systems. In: Brazil MRS Meeting, 2016, Campinas. Brazil MRS Meeting.
- **Campos, P. P.;** Moraes, M. L.; Ferreira, M. Incorporação do agente antibacteriano sulfadiazina de prata em lipossomos para liberação controlada. In: I Congresso Regional de Sociedade Brasileira de Biofísica, 2015, Natal-RN.
- **Campos, P. P.;** Moraes, M. L.; Ferreira, M. Solubilização da sulfadiazina de prata em dendrímeros para liberação controlada. In: III Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2015, Sorocaba/São Paulo.

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos

1.1. Sistemas de liberação modificados

Os tratamentos farmacológicos necessitam que as substâncias ativas atinjam o tecido alvo e mantenham uma concentração grande no local por tempo necessário para produzir o efeito desejado. Idealmente, apenas o tecido alvo deveria ser exposto à substância, minimizando os efeitos colaterais, porém, para a substância chegar ao tecido, nas formulações convencionais, grandes doses são necessárias em intervalos de tempo pequenos, uma vez que as substâncias são perdidas ao longo do caminho por serem degradadas por enzimas ou pelas condições físico-químicas do sistema e baixa permeabilidade dos tecidos. Por isso os sistemas de liberação modificados têm sido cada vez mais estudados.¹

O desenvolvimento de novas drogas requer alto investimento financeiro e longos períodos de pesquisa. A demanda pelo desenvolvimento de sistemas de liberação modificados é devido à eficácia de a droga ser frequentemente alterada pela biodistribuição inespecífica nas células e tecidos e porque algumas drogas são rapidamente metabolizadas e excretadas.² Assim esses sistemas podem melhorar as propriedades farmacológicas e terapêuticas das drogas já conhecidas, mudando as formas de administração, superando as barreiras comuns do corpo humano até chegar na célula de destino, solubilizando e carregando as drogas hidrofóbicas.³

A ideia da liberação modificada de fármacos surgiu em 1960, por Judah Folkman, que estudava o desvio de sangue arterial venoso com o uso de borracha de silicone em coelhos. Quando ele impregnava gases anestésicos no tubo e os usava nos animais, os mesmos dormiam. Assim ele sugeriu que se implantassem pequenos pedaços da borracha impregnada nos animais, poderia ocorrer liberação dos anestésicos lentamente.^{4,5}

Os primeiros sistemas desenvolvidos foram baseados em escala macroscópica. Ocusert® é um dispositivo que libera pilocarpina colocado no olho sob a pálpebra inferior, para tratamento de glaucoma.⁶ O dispositivo contém a pilocarpina entre duas membranas de acetato de vinil etileno e quando o fluido lacrimal penetra, o material dissolve e libera a pilocarpina impregnada. O Progestasert®, comercializado desde 1976, é um dispositivo empregado em sistemas de liberação que contém progesterona. É colocado no útero e libera hormônio continuamente e em baixa quantidade quando comparado a outros métodos contraceptivos. A partir disso vários tipos de produtos começaram a ser lançados no mercado baseados nesse conceito.⁵

Entre os anos de 1960 e 1970 micropartículas de polímeros biodegradáveis foram desenvolvidos para suturas e entre 1970 e 1980 começaram a ser usados na liberação modificada, de forma que o processo passou a ser em escala microscópica introduzindo o conceito de “liberação sustentada”. Também na década de 70 começaram os estudos na área de nanotecnologia, em várias partes do mundo concomitantemente, onde surgiu o conceito “direcionamento ao alvo”, o qual possibilita o direcionamento do fármaco diretamente para seu sítio específico através do uso de biomoléculas como anticorpos e peptídeos.⁵ A partir do advento da nanotecnologia vários materiais começaram a ser empregados na liberação modificada, como nanopartículas poliméricas biodegradáveis, lipídios (lipossomos e nanoemulsões), moléculas anfifílicas, dendrímeros, metais, nanopartículas e etc. Assim, a composição dos materiais passou a ser manipulada para responder a estímulos desejados como pH, temperatura e microambiente redox, com propriedades que podem ser exclusivas para certas doenças.⁷

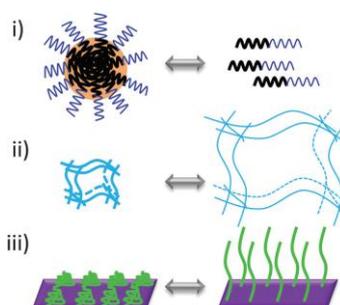
A maioria das drogas é administrada em quantidades intermediárias, numa concentração mínima que cause o efeito desejado (Concentração Mínima Eficaz – CME), mas não tão alta a ponto de causar efeitos tóxicos (Concentração Máxima Tóxica – CMT).

Portanto, repetidas doses são necessárias em curtos espaços de tempo para que a droga cause o efeito esperado. As formas de dosagem que prolongam a liberação podem manter a concentração da droga dentro de uma faixa terapêutica desejada por longos períodos e minimizar a subexposição e toxicidade.⁸

1.2. Materiais inteligentes

Na natureza é possível encontrar uma grande quantidade de materiais e sistemas que tem sua estrutura e propriedades ajustadas de forma reversível em resposta aos estímulos do ambiente, como por exemplo, a camuflagem de camaleões e o padrão de difração nas asas das borboletas. Seguindo estes modelos, vários materiais têm sido sintetizados com capacidade de “ligar” e “desligar” que podem ser aplicados frente à necessidade de uma resposta para uma mudança do meio em que se encontra. As vantagens desses materiais é que eles podem atuar em um tempo e espaço físico preciso, em um sistema fechado como o corpo humano, por exemplo, sem a necessidade de incisões.⁹ A Figura 1 ilustra um exemplo de três tipos de propriedades dos materiais alteradas como hidrofobicidade, tamanho e formato.

Figura 1 – Exemplos de transições associadas aos materiais estímulo responsíveis, (i) desagregação de polímeros anfifílicos, (ii) mudança de volume e (iii) mudança de conformação de estrutura, esticado ou enrolado.

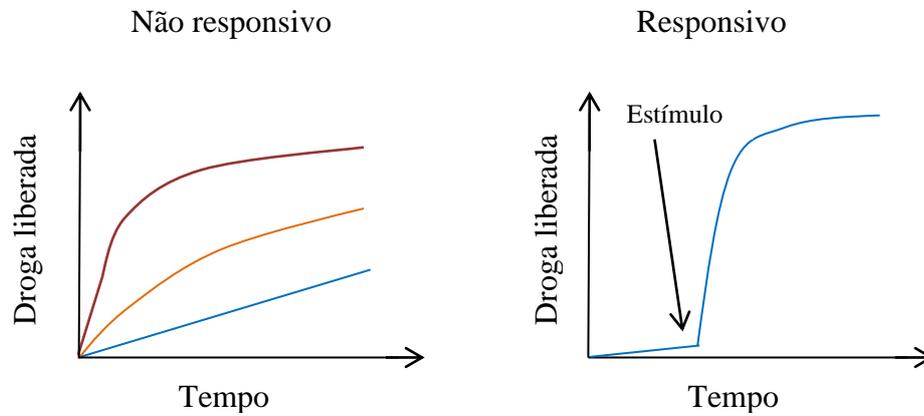


1.3. Liberação modificada de fármacos em resposta à estímulos

Com o desenvolvimento dos materiais inteligentes a aplicação voltada para criar sistemas com resposta à estímulos têm aumentado significativamente. Esses sistemas frequentemente exibem propriedades de sensores e são conhecidos como estímulo responsivo, ambientalmente sensível ou sistemas inteligentes ¹⁰ e podem ser aplicados na área médica e ambiental para entrega modificada e modulada de fármacos ou pesticidas.

O conceito “entrega de drogas em resposta à estímulos”, do inglês *drug delivery stimuli-responsive*, foi sugerido na década de 70 pelo uso de lipossomos termossensíveis. Nos últimos anos essa ideia tem recebido mais atenção por permitir um maior controle sobre a dosagem, tempo e espaço dos sistemas de entrega. ² A Figura 2 exemplifica a diferença entre um sistema de liberação responsivo e não responsivo. No primeiro, a droga é liberada de acordo com um padrão de comportamento do material ocorrendo por mecanismos como difusão, dissolução e osmose, por exemplo. No segundo a liberação é desencadeada e modulada por estímulos do meio como alterações químicas (pH, força iônica, oxidação/redução) ou físicas (campo magnético, elétrico, temperatura). O sistema responsivo tem a vantagem sobre o não responsivo de começar a liberar apenas quando o estímulo for dado, permitindo um controle maior sobre o tempo de início, se o estímulo for externo ou apenas se for necessário quando o estímulo for interno.

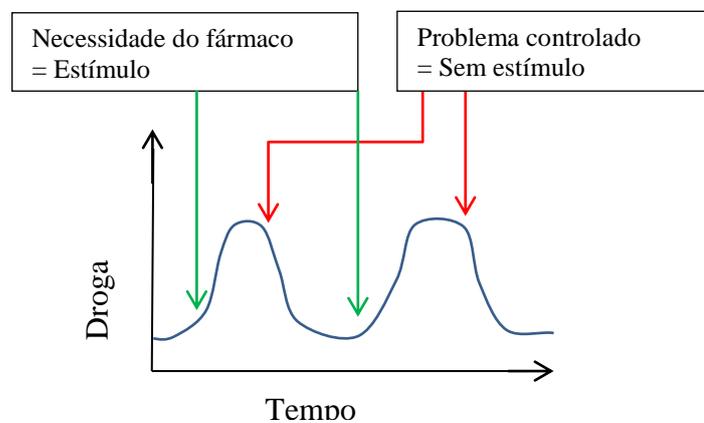
Figura 2 – Diferença entre um sistema de liberação responsivo e não responsivo.



Fonte: Adaptado de Shi et al. ¹¹

Outro conceito a ser explorado é a liberação de medicamento regulada por *feedback*, na qual idealmente a substância ativa chega no alvo e há uma retroalimentação, ou seja, a própria resposta do sistema gera o aumento do fármaco no tecido ou a diminuição, dependendo da necessidade, Figura 3. ¹

Figura 3 – Sistema de liberação controlada por retroalimentação



Fonte: Adaptado de Alvarez-Lorenzo. ¹

Ambos os sistemas regulados por estímulo ou por *feedback*, requerem componentes que hajam como “sensores” e “atuadores” com a habilidade de desencadear a liberação do fármaco pelo estímulo e ajustar minunciosamente a taxa de entrega no caso do *feedback*,¹ por isso materiais inteligentes são bastante empregados nesses sistemas.

Há duas classes de materiais responsivos: (a) aqueles que respondem aos estímulos internos como mudança de pH, força iônica ou presença de substâncias, ou (b) os que respondem aos estímulos externos como luz, campos elétrico ou magnético.¹ Fontes de calor externas podem ser usadas para aquecer uma parte do corpo após a aplicação de um carreador de fármaco termossensível, por exemplo.

1.4. Técnica Layer-by-Layer

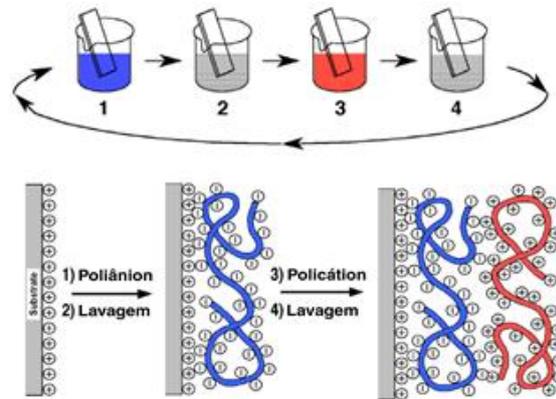
A versatilidade da técnica LbL permite a construção de filmes com uma vasta gama de materiais e aplicações, entre eles os materiais inteligentes, que permite que frente a um estímulo o filme tenha uma resposta que pode ser ajustável a assim ser aplicado a sistemas biológicos e ambientais.

A liberação modificada de fármacos baseada em filmes LbL apresenta diversas vantagens, como (1) permitir o emprego de moléculas solúveis e não solúveis em água, (2) ser projetados para serem estáveis dentro de uma ampla faixa de temperatura e pH, inclusive em condições fisiológicas, (3) as multicamadas podem preservar estruturas proteicas, (4) os filmes podem ser desenvolvidos sobre diferentes substratos incluindo adesivos para a pele, fibras, micro agulhas, superfície de implantes e *stents*, (5) a liberação pode ser modificada por estímulos externos, (6) pode-se utilizar vários fármacos em um mesmo filme e (7) fatores como espessura, rigidez, estabilidade, permeabilidade e composição podem modular a liberação.^{12,13}

As drogas podem ser incorporadas nos filmes LbL por três rotas, (i) usada como polycation ou polianion interagindo diretamente com o polieletrólito de carga oposta,¹⁴ (ii) ser incorporada após o filme estar pronto, mergulhando-o em uma solução concentrada da droga, viável para moléculas de baixo peso molecular que podem se difundir facilmente entre as camadas, (iii) encapsular a droga em um carreador que será o polycation ou polianion e irá interagir diretamente com o polieletrólito de carga oposta.^{12,14} As rotas podem ser usadas de forma combinada, como por exemplo, fabricando um filme com a droga como polieletrólito e após finalizar, imergir o filme novamente na solução da droga para ter uma concentração maior de fármaco na estrutura.

A ideia da fabricação de filmes pela técnica LbL surgiu em 1983, por Sagiv,¹⁵ mas apenas em 1997, Decher¹⁶ desenvolveu o procedimento que consiste na adsorção espontânea, química ou física, sobre uma superfície, de camadas com espessura entre 10 e 100 Å. A montagem do filme é feita com a adsorção de materiais de cargas opostas. Um exemplo típico de fabricação de um filme LbL é imergir um suporte sólido em uma solução com material de carga positiva, a qual irá adsorver sobre a superfície, solução de lavagem para remoção do excesso de material, seguido de solução de carga negativa, a qual irá adsorver sobre primeira camada e lavagem novamente. O processo pode ser realizado repetidas vezes, formando assim um filme com várias bicamadas,¹⁶ como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Esquema de montagem de um filme pela técnica LbL.



Fonte: Adaptado de Decher, Gero.¹⁶

A técnica LbL tem atraído a atenção dos pesquisadores pela sua simplicidade, facilidade e ser relativamente barata, visto que pode ser realizada à temperatura ambiente em soluções aquosas e o processo de construção pode ser manual ou automatizado.¹⁷ Permite o uso de uma vasta gama de materiais e as soluções não precisam ser muito concentradas e nem em grande volume e podem ser reutilizadas gerando economia de material.¹⁸

A técnica permite a construção dos filmes por diferentes mecanismos de deposição, tais como:

Interação eletrostática – esse é o meio mais comum de construção de um filme LbL, na qual a interação entre as camadas ocorre devido as cargas positivas e negativas dos materiais usados. A vantagem é que aproveita a densidade de carga natural das biomoléculas e pode ser ajustado com o pH.¹⁹

Ligação de hidrogênio – ocorre nos materiais entre as camadas e a ligação resultante é uma atração dipolo-dipolo. Possibilita o uso de materiais eletricamente neutros que não poderiam ser incorporados nos filmes por interação eletrostática.¹⁹

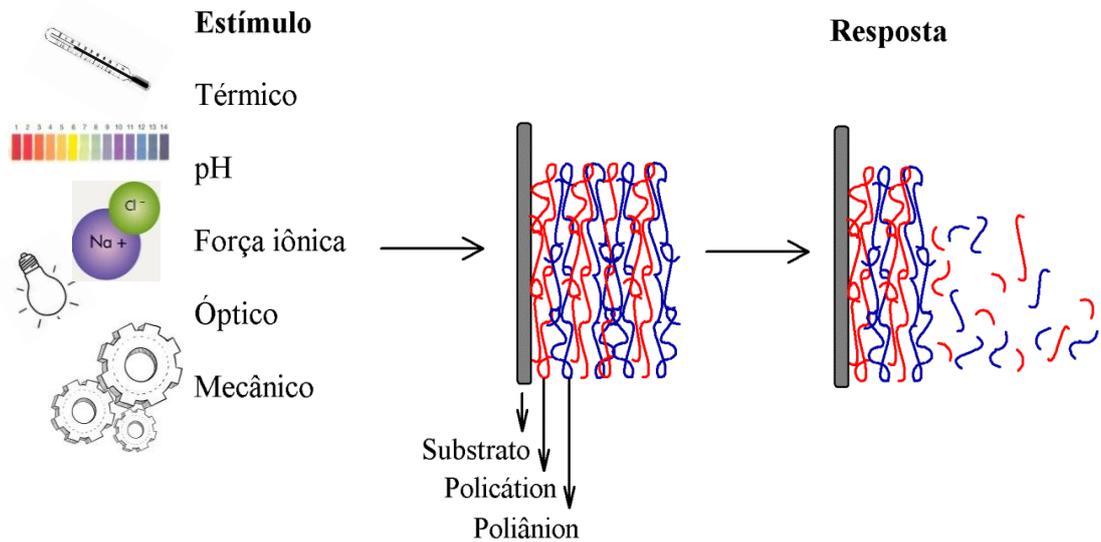
Ligação através de reconhecimento de biomoléculas – nesta técnica um anticorpo pode ser adsorvido na superfície e o antígeno ser adicionado e se ligar ao anticorpo. O método é mais utilizado para sistemas de sensoriamento e pode ser usado também com DNA e enzimas.¹⁹

Os mecanismos de deposição podem coexistir em um mesmo filme, quando as moléculas têm um grupo carregado e induz a interação eletrostática e outra porção com oxigênio, nitrogênio ou flúor que possam interagir formando uma ligação de hidrogênio.

1.5. Processo *Disassembly*

O termo *disassembly*, do inglês que traduzido significa desmontagem, têm sido muito utilizado para nomear o processo físico no qual as camadas dos filmes LbL se desprendem uma das outras frente à um estímulo físico ou químico e ocasiona no desmanche parcial ou total do filme. Vários estudos têm surgido a partir da capacidade dos filmes LbL serem desmontados a partir de mudança de pH,²⁰ temperatura,²¹ irradiação de luz,^{22,23} estímulos mecânicos,²⁴ entre outros. A Figura 5 representa o filme LbL sendo desmontado a partir do recebimento de estímulos.

Figura 5 – Esquema do processo *disassembly* de um filme LbL em resposta ao recebimento estímulos térmicos, ópticos, mecânicos ou diferenças de pH ou força iônica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os filmes LbL aplicados na liberação modificada apresentam diversos mecanismos de liberação de moléculas, sendo elas:

Temperatura – a mudança de temperatura pode ser usada para controlar o carregamento e liberação de moléculas. Para a construção de um sistema que estimule ou iniba a liberação pela temperatura duas rotas podem ser usadas: (1) a incorporação de um material termoresponsível ou (2) uma estrutura que se expande ou encolhe com a ação do calor. O poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) é um exemplo de polímero aplicado pela sua característica de se tornar hidrofílico abaixo de 32°C e hidrofóbico acima. Vários estudos focam na síntese de polímeros semelhantes que tenham a temperatura de transição próxima a 37°C.¹⁹ Outro exemplo são os lipossomos que podem ser preparados com lipídios com temperatura de transição vítrea a 37°C, sendo rígido na temperatura ambiente e em fase fluída na temperatura fisiológica de forma a segurar e liberar um ativo.

pH – a liberação por mudança de pH pode ser ocorrer por dois mecanismos: (1) perda das forças eletrostáticas e (2) indução da porosidade em um filme de várias camadas.¹⁹ Os polímeros e biomoléculas apresentam variação da carga elétrica de acordo com o pH em relação ao seu pKa podendo ocorrer a protonação/deprotonação. Assim, as soluções de fabricação dos filmes podem ser preparadas visando manter os materiais mais carregados eletricamente. Quando o filme é exposto a um ambiente com pH diferente a carga é reduzida, as interações se desfazem causando o desmanche das camadas. A exposição de filmes a meios ácidos pode também criar microporos ou nanoporos na estrutura, o que altera a permeabilidade do filme e das biomoléculas presentes.^{12,19,25}

Reconhecimento bioquímico – pode ser feito com DNA, antígeno-anticorpo e enzimas. Neste caso, as enzimas podem ser um componente estrutural no filme ou ser um mecanismo externo que desencadeia a degradação após a exposição. A liberação do filme pode ser a partir de um produto gerado pela catálise enzimática, ou a enzima pode degradar uma camada expondo outra abaixo.¹²

Força iônica – a presença de sais em um filme LbL agem diretamente nas interações eletrostáticas dos polieletrólitos resultando na competitividade da interação entre polieletrólito/polieletrólito e polieletrólito/contra-íon. Como resultado a estrutura fica mais solta e incha o que é também devido ao armazenamento de água. O processo é semelhante à alteração do pH, porém, nesse caso também ocorre em filmes com polieletrólitos fortes. Pode ocorrer o desmanche do filme e as camadas se desprenderem ou as camadas continuarem aderidas porem mais soltas, isso aumenta a permeabilidade do filme permitindo que moléculas fiquem em seu interior ou sejam liberadas.^{12,25}

Luz – A luz é uma fonte interessante de liberação, constituindo um sistema inteligente, por sua precisão espacial e temporal, e habilidade para ser aplicada de forma não invasiva.

Podem ser utilizadas luz visível, infra-vermelho e ultravioleta. A liberação do filme pela luz pode ser devido ao:

- Fotoaquecimento gerado no sistema, pela mudança na estrutura de uma molécula fotoresponsiva.

- Fotoisomerização que é relacionada com as mudanças conformacionais em torno das ligações e é normalmente acompanhada de alterações hidrofílicas/hidrofóbicas.

- Fotodegradação que fragmenta o polímero em pedaços pequenos e causa o desmanche do filme

- *Fotocrosslinking* e *decrosslinking* implicam na formação e ruptura das ligações das cadeias poliméricas.

- Foto-oxidação induzida é a geração de um agente oxidante forte, após a iluminação de uma molécula sensibilizadora.

- Fotoexcitação explora a habilidade das nanopartículas metálicas absorverem luz eficientemente devido às oscilações nas bandas de condução eletrônica em certas frequências de luz. ^{12,19}

Presença de açúcares – filmes LbL construídos com materiais sensíveis à presença de açúcar são capazes de se desprender do filme para se ligar à açúcares ou diol presente em uma solução. Esses sistemas têm sido bastante estudados pela possibilidade de aplicação em liberação modificada de fármacos ou agente químicos, microdispositivos sensíveis a estímulos e fabricação de sensores e atuadores. ²⁶

Vibração – a vibração aplicada a um filme LbL em um sistema aquoso leva a uma tensão nas bicamadas e faz com que elas se desmontem pelo processo mecânico. ²⁴

1.6. Objetivos gerais

Desenvolver sistemas de liberação construídos pela técnica LbL com capacidade de liberar moléculas de sua estrutura ou desmontar em resposta à estímulos físicos ou químicos. Para tal pretende-se empregar diferentes materiais e estudar as particularidades de cada sistema, sendo eles:

1) Fabricar filmes LbL de polieletrólitos e lipossomos para liberação do fármaco emodina sensíveis à variação de pH e temperatura.

2) Desenvolver um filme LbL que responda à estímulos luminosos, utilizando um polímero foto-responsível que tenha a capacidade de desmontar e sirva de suporte para a inclusão de moléculas em sua estrutura para liberação com a luz.

3) Empregar polímeros responsíveis à carboidratos em filmes LbL que possam desmontar na presença de frutose e glicose, e sirva com suporte para emprego de biomoléculas que possam agir em altas concentrações dos monossacarídeos.

4) Caracterizar cada filme com as espectroscopias UV-vis, Fluorescência, FTIR e SPR, além de elipsometria, Microscopia Eletrônica de Varredura e técnicas eletroanalíticas a fim de monitorar a deposição e presença dos materiais nos filmes bem como as interações entre eles, processo de liberação ou *disassembly*, espessura, morfologia e propriedades eletroquímicas.

Capítulo 5 – Conclusões gerais e perspectivas futuras

A fabricação dos filmes Layer-by-Layer com materiais inteligentes mostrou-se eficiente nas três propostas deste trabalho, mostrando a versatilidade da técnica na criação de sistemas com resposta aos diferentes estímulos como o térmico, óptico, variação de pH e presença de monossacarídeos.

Os filmes visando a liberação de emodina foram efetivos no processo, sendo que o filme de polieletrólito apresentou um decréscimo mais acentuado enquanto o de lipossomo o teve um perfil mais lento em função do tempo, como resultado da presença das vesículas no filme que respondem mais lentamente à temperatura do que o com polieletrólitos que apresenta uma resposta mais rápida à variação de pH. As análises eletroquímicas da emodina no filme confirmaram os resultados obtidos por UV-vis do estado de protonação da molécula e seu possível comportamento frente a aplicação transdérmicas.

O filme de poli(SP-R) apresentou as propriedades fotocromáticas características do polímero e quando exposto aos ciclos UV/branca apresentam a conversão entre poli(SP-R) $\leftarrow \rightarrow$ poli(MC-R). Assim quando exposto à luz branca por tempo prolongado o filme se desmontou, demonstrando o potencial de aplicação dos filmes.

Com os estudos dos filmes de ácido fenil borônico verificou-se a influência da posição do boro na estrutura dos polímeros e seus efeitos na construção dos filmes e *disassembly*. Tanto os filmes de PBA com polieletrólitos quanto o preparado com corante fluorescente apresentaram resposta à frutose ocasionando no *disassembly* do filme em segundos, revelando a capacidade de criação do sistema com diferentes tipos de moléculas.

Nos diferentes sistemas pode-se notar semelhanças como a necessidade de encontrar o melhor pH para o processo de montagem e *disassembly* dos filmes e a presença de aglomerados na superfície dos revestimentos indicando que o crescimento nem sempre é

homogêneo. Apesar disso, todos os sistemas se mostraram eficientes no propósito e que o melhor irá depender da aplicação em relação ao tipo de estímulo e velocidade de entrega das moléculas.

As perspectivas futuras são relacionadas ao desenvolvimento de novos materiais e sistemas e aperfeiçoamento dos existentes que poderão criar filmes que apresentem maior controle sobre a resposta, de forma a liberar o fármaco e cessar de acordo com a necessidade do meio num sistema de retroalimentação e controle.

Referências

- (1) Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *Chem Commun* **2014**, 50 (58), 7743–7765. <https://doi.org/10.1039/C4CC01429D>.
- (2) Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Nat. Mater.* **2013**, 12 (11), 991–1003. <https://doi.org/10.1038/nmat3776>.
- (3) Santos, L. F.; Correia, I. J.; Silva, A. S.; Mano, J. F. Biomaterials for Drug Delivery Patches. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, 118, 49–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.020>.
- (4) Folkman, J.; Long, D. The Use of Silicone Rubber as a Carrier for Prolonged Drug Therapy. *J. Surg. Res.* **1964**, 4 (3), 139–142.
- (5) Hoffman, A. S. The Origins and Evolution of “Controlled” Drug Delivery Systems. *J. Controlled Release* **2008**, 132 (3), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.08.012>.
- (6) Pollack, I.; Quigley, H.; Harbin, T. The Ocusert Pilocarpine System: Advantages and Disadvantages. *South. Med. J.* **1976**, 69 (10), 1296–1298.

- (7) Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. A Review of Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. *J. Controlled Release* **2008**, *126* (3), 187–204. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.12.017>.
- (8) Siepmann, J.; Lecomte, F.; Bodmeier, R. Diffusion-Controlled Drug Delivery Systems: Calculation of the Required Composition to Achieve Desired Release Profiles. *J. Controlled Release* **1999**, *60* (2–3), 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00093-0).
- (9) Klajn, R. Spiropyran-Based Dynamic Materials. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (1), 148–184. <https://doi.org/10.1039/C3CS60181A>.
- (10) Singh, B.; Khurana, R. K.; Garg, B.; Saini, S.; Kaur, R. Stimuli-Responsive Systems with Diverse Drug Delivery and Biomedical Applications: Recent Updates and Mechanistic Pathways. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2017**, *34* (3), 209–255. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2017017284>.
- (11) Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanomedicine: Progress, Challenges and Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17* (1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>.
- (12) Costa, R. R.; Alatorre-Meda, M.; Mano, J. F. Drug Nano-Reservoirs Synthesized Using Layer-by-Layer Technologies. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33* (6), 1310–1326. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.005>.
- (13) Anandhakumar, S.; Gokul, P.; Raichur, A. M. Stimuli-Responsive Weak Polyelectrolyte Multilayer Films: A Thin Film Platform for Self Triggered Multi-Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *58*, 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.039>.

- (14) Campos, P. P.; Fraceto, L. F.; Ferreira, M. Layer-by-Layer Films Containing Emodin or Emodin Encapsulated in Liposomes for Transdermal Applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *162*, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.030>.
- (15) Netzer, L.; Sagiv, J. A New Approach to Construction of Artificial Monolayer Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (3), 674–676. <https://doi.org/10.1021/ja00341a087>.
- (16) Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277* (5330), 1232–1237. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1232>.
- (17) Hsu, B. B.; Hagerman, S. R.; Hammond, P. T. Rapid and Efficient Sprayed Multilayer Films for Controlled Drug Delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* **2016**, *133* (25). <https://doi.org/10.1002/app.43563>.
- (18) Wang, B.; Jin, T.; Xu, Q.; Liu, H.; Ye, Z.; Chen, H. Direct Loading and Tunable Release of Antibiotics from Polyelectrolyte Multilayers To Reduce Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (5), 1305–1313. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00118>.
- (19) Keeney, M.; Jiang, X. Y.; Yamane, M.; Lee, M.; Goodman, S.; Yang, F. Nanocoating for Biomolecule Delivery Using Layer-by-Layer Self-Assembly. *J Mater Chem B* **2015**, *3* (45), 8757–8770. <https://doi.org/10.1039/C5TB00450K>.
- (20) Sun, J.-K.; Ren, K.-F.; Ji, J. PH-Triggered DNA Delivery Based on Multilayer Film of DNA Polyplexes and Charge-Reversible Poly(Ethylenimine). *Thin Solid Films* **2012**, *520* (16), 5426–5430. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2012.04.019>.
- (21) Xavier, A. C. F.; de Moraes, M. L.; Ferreira, M. Immobilization of Aloin Encapsulated into Liposomes in Layer-by-Layer Films for Transdermal Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (3), 1193–1196. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.021>.

- (22) Campos, P. P.; Dunne, A.; Delaney, C.; Moloney, C.; Moulton, S. E.; Benito-Lopez, F.; Ferreira, M.; Diamond, D.; Florea, L. Photoswitchable Layer-by-Layer Coatings Based on Photochromic Polynorbornenes Bearing Spiropyran Side Groups. *Langmuir* **2018**, *34* (14), 4210–4216. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00137>.
- (23) Pennakalathil, J.; Hong, J.-D. Self-Standing Polyelectrolyte Multilayer Films Based on Light-Triggered Disassembly of a Sacrificial Layer. *ACS Nano* **2011**, *5* (11), 9232–9237. <https://doi.org/10.1021/nn203490q>.
- (24) Zhang, Z.; Tang, Z.; Liu, W.; Zhang, H.; Lu, Y.; Wang, Y.; Pang, W.; Zhang, H.; Duan, X. Acoustically Triggered Disassembly of Multilayered Polyelectrolyte Thin Films through Gigahertz Resonators for Controlled Drug Release Applications. *Micromachines* **2016**, *7* (11), 194. <https://doi.org/10.3390/mi7110194>.
- (25) Wood, K. C.; Boedicker, J. Q.; Lynn, D. M.; Hammond, P. T. Tunable Drug Release from Hydrolytically Degradable Layer-by-Layer Thin Films. *Langmuir* **2005**, *21* (4), 1603–1609. <https://doi.org/10.1021/la0476480>.
- (26) Levy, T.; Déjugnat, C.; Sukhorukov, G. B. Polymer Microcapsules with Carbohydrate-Sensitive Properties. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18* (10), 1586–1594. <https://doi.org/10.1002/adfm.200701291>.
- (27) Huang, Q.; Lu, G.; Shen, H.-M.; Chung, M. C. M.; Ong, C. N. Anti-Cancer Properties of Anthraquinones from Rhubarb. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27* (5), 609–630. <https://doi.org/10.1002/med.20094>.
- (28) Wang, H.-H.; Chung, J.-G. Emodin-Induced Inhibition of Growth and DNA Damage in the Helicobacter Pylori. *Curr. Microbiol.* **1997**, *35* (5), 262–266. <https://doi.org/10.1007/s002849900250>.

- (29) Chang, C.-H.; Lin, C.-C.; Yang, J.-J.; Namba, T.; Hattori, M. Anti-Inflammatory Effects of Emodin from *Ventilago Leiocarpa*. *Am. J. Chin. Med.* **1996**, *24* (02), 139–142. <https://doi.org/10.1142/S0192415X96000189>.
- (30) Huang, H.-C.; Chang, J.-H.; Tung, S.-F.; Wu, R.-T.; Foegh, M. L.; Chu, S.-H. Immunosuppressive Effect of Emodin, a Free Radical Generator. *Eur. J. Pharmacol.* **1992**, *211* (3), 359–364. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90393-I](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90393-I).
- (31) Sato, M.; Maulik, G.; Bagchi, D.; Das, D. K. Myocardial Protection by Protykin, a Novel Extract of *Trans Resveratrol* and Emodin. *Free Radic. Res.* **2000**, *32* (2), 135–144. <https://doi.org/10.1080/10715760000300141>.
- (32) Jing, X.; Ueki, N.; Cheng, J.; Imanishi, H.; Hada, T. Induction of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines by Emodin. *Jpn. J. Cancer Res.* **2002**, *93* (8), 874–882. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2002.tb01332.x>.
- (33) Róz, A. L. D.; Leite, F. de L.; Ferreira, M.; Oliveira Jr., O. N. *Nanoestruturas - Princípios e Aplicações*, 1st ed.; Elsevier: Rio de Janeiro, 2015; Vol. 1.
- (34) Sharma, A. Liposomes in Drug Delivery: Progress and Limitations. *Int. J. Pharm.* **1997**, *154* (2), 123–140. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00135-X).
- (35) Batista, C. M.; Carvalho, C. M. B. de; Magalhães, N. S. S. Lipossomas e Suas Aplicações Terapêuticas: Estado Da Arte. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2007**, *43* (2), 167–179. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>.
- (36) Salunkhe, S.; Pagar, U.; Bhatia, N.; Thorat, J. Liposomes: Benchmark in the Era of Drug Carriers for Semisolid Based Topical Delivery System. *Amerian J. Pharm. Res.* **2013**, *3* (3), 493–510.
- (37) Chinnagounder Periyasamy, P.; Leijten, J. C. H.; Dijkstra, P. J.; Karperien, M.; Post, J. N. Nanomaterials for the Local and Targeted Delivery of Osteoarthritis Drugs. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/673968>.

- (38) Wang, L.; Wang, X.; Li, X. Isotonic Sodium Bicarbonate-Triggered Emodin Release from Borate Stabilized Emodin Nanoparticles-Loaded Polymeric Microgel Films. *Int. J. Pharm.* **2014**, *469* (1), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.04.046>.
- (39) Shi, Y.; Li, H.; Li, J.; Zhi, D.; Zhang, X.; Liu, H.; Wang, H.; Li, H. Development, Optimization and Evaluation of Emodin Loaded Nanoemulsion Prepared by Ultrasonic Emulsification. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2015**, *27*, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.04.003>.
- (40) Ban, E.; Park, M.; Jeong, S.; Kwon, T.; Kim, E.-H.; Jung, K.; Kim, A. Poloxamer-Based Thermoreversible Gel for Topical Delivery of Emodin: Influence of P407 and P188 on Solubility of Emodin and Its Application in Cellular Activity Screening. *Molecules* **2017**, *22* (2), 246. <https://doi.org/10.3390/molecules22020246>.
- (41) Wang, S.; Chen, T.; Chen, R.; Hu, Y.; Chen, M.; Wang, Y. Emodin Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Preparation, Characterization and Antitumor Activity Studies. *Int. J. Pharm.* **2012**, *430* (1–2), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.027>.
- (42) Chen, X.; Yang, Z.; Sun, R.; Mo, Z.; Jin, G.; Wei, F.; Hu, J.; Guan, W.; Zhong, N. Preparation of Lung-Targeting, Emodin-Loaded Polylactic Acid Microspheres and Their Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (4), 6241–6251. <https://doi.org/10.3390/ijms15046241>.
- (43) Jangra, S.; Chhokar, V.; Tomer, V. K.; Sharma, A. K.; Duhan, S. Influence of Functionalization Type on Controlled Release of Emodin from Mesoporous Silica. *J. Porous Mater.* **2016**, *23* (4), 1047–1057. <https://doi.org/10.1007/s10934-016-0162-7>.
- (44) Xu, Y.; Wang, C.; Zhou, G.; Wu, Y.; Chen, J. Improving the Controlled Release of Water-Insoluble Emodin from Amino-Functionalized Mesoporous Silica. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258* (17), 6366–6372. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.041>.

- (45) Tao, J. J.; Xu, Y. Q.; Zhou, G. W.; Wu, C. C.; Song, H. B.; Wang, C. F. Ordered Mesoporous SBA-15 for Controlled Release of Water-Insoluble Drug. *Adv. Mater. Res.* **2011**, 236–238, 1873–1876. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.236-238.1873>.
- (46) Jate, P.; Prasit, P.; Pitt, S. Electrospun Cellulose Acetate Fiber Mats Containing Emodin with Potential for Use as Wound Dressing. *Chiang Mai J. Sci.* **2016**, 43 (1), 1249–1259.
- (47) Dai, X.-Y.; Nie, W.; Wang, Y.-C.; Shen, Y.; Li, Y.; Gan, S.-J. Electrospun Emodin Polyvinylpyrrolidone Blended Nanofibrous Membrane: A Novel Medicated Biomaterial for Drug Delivery and Accelerated Wound Healing. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, 23 (11), 2709–2716. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4728-x>.
- (48) Lima, E. M.; Oliveira, A. G. Tissue Tolerance of Diclofenac Sodium Encapsulated in Liposomes After Intramuscular Administration. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, 28 (6), 673–680. <https://doi.org/10.1081/DDC-120003858>.
- (49) Petri, L.; Ferreira, M.; Moraes, M. L. Toward Preserving the Structure of the Antigenic Peptide P17-1 from the HIV-1 P17 Protein in Nanostructured Films. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, 11 (8), 6705–6709. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.4216>.
- (50) Moraes, M. L.; Baptista, M. S.; Itri, R.; Zucolotto, V.; Oliveira, O. N. Immobilization of Liposomes in Nanostructured Layer-by-Layer Films Containing Dendrimers. *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, 28 (4), 467–471. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.04.017>.
- (51) Graça, J. S.; de Oliveira, R. F.; de Moraes, M. L.; Ferreira, M. Amperometric Glucose Biosensor Based on Layer-by-Layer Films of Microperoxidase-11 and Liposome-Encapsulated Glucose Oxidase. *Bioelectrochemistry* **2014**, 96, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.01.001>.

- (52) Oliveira, J. L. Preparo e Caracterização de Nanopartículas Lipídicas Sólidas Como Sistema Carreador Conjunto Para Os Herbicidas Atrazina e Simazina. Dissertação, Universidade Estadual Paulista: Sorocaba, 2015.
- (53) Liang, H.; Miranto, H.; Granqvist, N.; Sadowski, J. W.; Viitala, T.; Wang, B.; Yliperttula, M. Surface Plasmon Resonance Instrument as a Refractometer for Liquids and Ultrathin Films. *Sens. Actuators B Chem.* **2010**, *149* (1), 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.05.048>.
- (54) Granqvist, N.; Liang, H.; Laurila, T.; Sadowski, J.; Yliperttula, M.; Viitala, T. Characterizing Ultrathin and Thick Organic Layers by Surface Plasmon Resonance Three-Wavelength and Waveguide Mode Analysis. *Langmuir* **2013**, *29* (27), 8561–8571. <https://doi.org/10.1021/la401084w>.
- (55) Tah, B.; Pal, P.; Mishra, S.; Talapatra, G. B. Interaction of Insulin with Anionic Phospholipid (DPPG) Vesicles. *Phys Chem Chem Phys* **2014**, *16* (39), 21657–21663. <https://doi.org/10.1039/C4CP03028A>.
- (56) da Cunha, A. R.; Duarte, E. L.; Lamy, M. T.; Coutinho, K. Protonation/Deprotonation Process of Emodin in Aqueous Solution and PKa Determination: UV/Visible Spectrophotometric Titration and Quantum/Molecular Mechanics Calculations. *Chem. Phys.* **2014**, *440*, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2014.06.009>.
- (57) Campos, P. P.; Moraes, M. L.; Volpati, D.; Miranda, P. B.; Oliveira, O. N.; Ferreira, M. Amperometric Detection of Lactose Using β -Galactosidase Immobilized in Layer-by-Layer Films. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (14), 11657–11664. <https://doi.org/10.1021/am5024463>.
- (58) Ebenezar, I. J. D.; Ramalingam, S.; Raja, C. R.; Prabakar, P. C. J. Vibrational Spectroscopic [IR and Raman] Analysis and Computational Investigation [NMR, UV-

- Visible, MEP and Kubo Gap] on L-Valinium Picrate. *J. Nanotechnol. Adv. Mater.* **2014**, *2* (1), 11–25. <https://doi.org/10.12785/jnam/020102>.
- (59) Balachandran, V.; Karpagam, V.; Revathi, B.; Kavimani, M.; Ilango, G. Conformational Stability, Spectroscopic and Computational Studies, HOMO–LUMO, NBO, ESP Analysis, Thermodynamic Parameters of Natural Bioactive Compound with Anticancer Potential of 2-(Hydroxymethyl)Anthraquinone. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *150*, 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.06.007>.
- (60) Ouyang, W.; Appelhans, D.; Voit, B.; Muller, M. Preparation and Enantiospecific Binding of Chiral Polyelectrolyte Multilayers: An In-Situ ATR-FTIR Study. *Macromol. Symp.* **2007**, *254* (1), 180–187. <https://doi.org/10.1002/masy.200750828>.
- (61) Vinhola, L.; Facci, T.; Dias, L. G.; Azevedo, D. C. de; Borissevitch, G.; Huguenin, F. Self-Assembled Films from Chitosan and Poly(Vinyl Sulfonic Acid) on Nafion® for Direct Methanol Fuel Cell. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23* (3), 531–537. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000300021>.
- (62) Singh, D.; Rawat, M. S. M.; Semalty, A.; Semalty, M. Emodin–Phospholipid Complex: A Potential of Herbal Drug in the Novel Drug Delivery System. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2012**, *108* (1), 289–298. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1759-3>.
- (63) Bieker, P.; Schönhoff, M. Linear and Exponential Growth Regimes of Multilayers of Weak Polyelectrolytes in Dependence on PH. *Macromolecules* **2010**, *43* (11), 5052–5059. <https://doi.org/10.1021/ma1007489>.
- (64) Kwon, K.; Kim, M.; Abe, M.; Ishinomori, T.; Ogino, K. Thermotropic Behavior of a Phospholipid Bilayer Interacting with Metal Ions. *Langmuir* **1994**, No. 10, 1415–1420.
- (65) Pal, T.; Jana, N. R. Emodin (1,3,8-Trihydroxy-6-Methylantraquinone): A Spectrophotometric Reagent for the Determination of Beryllium(II), Magnesium(II) and Calcium(II). *The Analyst* **1993**, *118* (10), 1337. <https://doi.org/10.1039/an9931801337>.

- (66) Wang, L.; Zhang, Z.; Ye, B. Study on the Electrochemical Behaviour of the Anticancer Herbal Drug Emodin. *Electrochimica Acta* **2006**, *51* (26), 5961–5965. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.03.082>.
- (67) Nguyen, S. C.; Vilster Hansen, B. K.; Hoffmann, S. V.; Spanget-Larsen, J. Electronic States of Emodin and Its Conjugate Base. Synchrotron Linear Dichroism Spectroscopy and Quantum Chemical Calculations. *Chem. Phys.* **2008**, *352* (1–3), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2008.06.007>.
- (68) Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P. Natural Skin Surface PH Is on Average below 5, Which Is Beneficial for Its Resident Flora. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2006**, *28* (5), 359–370. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x>.
- (69) *Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action*, 3.ed.; Smith, H. J., Williams, H., Eds.; Harwood Acad. Publ: Amsterdam, 1998.
- (70) Santos, A. M. Estudo de Filmes Finos de Carbono Amorfo Fluorado, Etilenodiamino e Hexametildisiloxano Depositados a Plasma Em Aço Inoxidável. Dissertação, Universidade Federal do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2012.
- (71) Menzies, K. L.; Jones, L. The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials: *Optom. Vis. Sci.* **2010**, *1*. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e>.
- (72) Santos, J.; Santos, M.; Thesing, A.; Tavares, F.; Griep, J.; Rodrigues, M. Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. *Quím. Nova* **2016**. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160126>.
- (73) Xiao, S.; Xu, P.; Peng, Q.; Chen, J.; Huang, J.; Wang, F.; Noor, N. Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolyte Multilayer onto PET Fabric for Highly Tunable Dyeing with Water Soluble Dyestuffs. *Polymers* **2017**, *9* (12), 735. <https://doi.org/10.3390/polym9120735>.

- (74) Liu, G.; Zhao, J.; Sun, Q.; Zhang, G. Role of Chain Interpenetration in Layer-by-Layer Deposition of Polyelectrolytes. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (11), 3333–3338. <https://doi.org/10.1021/jp710600f>.
- (75) Graça, J. S.; Miyazaki, C. M.; Shimizu, F. M.; Volpati, D.; Mejía-Salazar, J. R.; Oliveira Jr, O. N.; Ferreira, M. On the Importance of Controlling Film Architecture in Detecting Prostate Specific Antigen. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *434*, 1175–1182. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.10.122>.
- (76) Poly(vinylsulfonic acid, sodium salt) solution 278424 <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/278424> (accessed Aug 14, 2018).
- (77) Zhu, M.-Q.; Zhang, G.-F.; Li, C.; Aldred, M. P.; Chang, E.; Drezek, R. A.; Li, A. D. Q. Reversible Two-Photon Photoswitching and Two-Photon Imaging of Immunofunctionalized Nanoparticles Targeted to Cancer Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (2), 365–372. <https://doi.org/10.1021/ja106895k>.
- (78) Li, Z.; Wan, S.; Shi, W.; Wei, M.; Yin, M.; Yang, W.; Evans, D. G.; Duan, X. A Light-Triggered Switch Based on Spiropyran/Layered Double Hydroxide Ultrathin Films. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (13), 7428–7435. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00753>.
- (79) Florea, L.; Hennart, A.; Diamond, D.; Benito-Lopez, F. Synthesis and Characterisation of Spiropyran-Polymer Brushes in Micro-Capillaries: Towards an Integrated Optical Sensor for Continuous Flow Analysis. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *175*, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.12.055>.
- (80) Iqbal, D.; Samiullah, M. Photo-Responsive Shape-Memory and Shape-Changing Liquid-Crystal Polymer Networks. *Materials* **2013**, *6* (1), 116–142. <https://doi.org/10.3390/ma6010116>.
- (81) Ma, J.; Xuan, L. Towards Nanoscale Molecular Switch-Based Liquid Crystal Displays. *Displays* **2013**, *34* (4), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.displa.2013.05.005>.

- (82) Satoh, T.; Sumaru, K.; Takagi, T.; Kanamori, T. Fast-Reversible Light-Driven Hydrogels Consisting of Spirobenzopyran-Functionalized Poly(N-Isopropylacrylamide). *Soft Matter* **2011**, *7* (18), 8030. <https://doi.org/10.1039/c1sm05797a>.
- (83) Florea, L.; McKeon, A.; Diamond, D.; Benito-Lopez, F. Spiropyran Polymeric Microcapillary Coatings for Photodetection of Solvent Polarity. *Langmuir* **2013**, *29* (8), 2790–2797. <https://doi.org/10.1021/la304985p>.
- (84) Sakata, T.; Yan, Y.; Marriott, G. Optical Switching of Dipolar Interactions on Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (13), 4759–4764. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405265102>.
- (85) Vandeweyer, P. H.; Smets, G. Photochromic Polypeptides. *J. Polym. Sci. [A1]* **1970**, *8* (9), 2361–2374. <https://doi.org/10.1002/pol.1970.150080905>.
- (86) Beyer, C.; Wagenknecht, H.-A. Synthesis of DNA with Spirobenzopyran as an Internal Covalent Modification. *Synlett* **2010**, *2010* (09), 1371–1376. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1219924>.
- (87) Son, S.; Shin, E.; Kim, B.-S. Light-Responsive Micelles of Spiropyran Initiated Hyperbranched Polyglycerol for Smart Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (2), 628–634. <https://doi.org/10.1021/bm401670t>.
- (88) Keum, S.-R.; Ahn, S.-M.; Roh, S.-J.; Ma, S.-Y. The Synthesis and Spectroscopic Properties of Novel, Photochromic Indolinobenzospiropyran-Based Homopolymers Prepared via Ring-Opening Metathesis Polymerization. *Dyes Pigments* **2010**, *86* (1), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2009.12.002>.
- (89) Silva, H. de S. Estudo Da Adsorção de Polieletrólitos e Do Ordenamento Molecular de Filmes Poliméricos Automontados Através Da Óptica Não-Linear, Universidade de São Paulo: São Carlos, 2010.

- (90) Martinez, A.; Zhou, K.; Bennion, I.; Yamashita, S. Passive Mode-Locked Lasing by Injecting a Carbon Nanotube-Solution in the Core of an Optical Fiber. *Opt. Express* **2010**, *18* (11), 11008. <https://doi.org/10.1364/OE.18.011008>.
- (91) Moniruzzaman, M.; Sabey, C. J.; Fernando, G. F. Photoresponsive Polymers: An Investigation of Their Photoinduced Temperature Changes during Photoviscosity Measurements. *Polymer* **2007**, *48* (1), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.08.066>.
- (92) Abdollahi, A.; Alinejad, Z.; Mahdavian, A. R. Facile and Fast Photosensing of Polarity by Stimuli-Responsive Materials Based on Spiropyran for Reusable Sensors: A Physico-Chemical Study on the Interactions. *J Mater Chem C* **2017**, *5* (26), 6588–6600. <https://doi.org/10.1039/C7TC02232H>.
- (93) Abdollahi, A.; Rad, J. K.; Mahdavian, A. R. Stimuli-Responsive Cellulose Modified by Epoxy-Functionalized Polymer Nanoparticles with Photochromic and Solvatochromic Properties. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *150*, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.009>.
- (94) Thompson, D.; Coleman, S.; Diamond, D.; Byrne, R. Electronic Structure Calculations and Physicochemical Experiments Quantify the Competitive Liquid Ion Association and Probe Stabilisation Effects for Nitrobenzospiropyran in Phosphonium-Based Ionic Liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (13), 6156. <https://doi.org/10.1039/c0cp02717k>.
- (95) De Barros, A.; Constantino, C. J. L.; Bortoleto, J. R. R.; Da Cruz, N. C.; Ferreira, M. Incorporation of Gold Nanoparticles into Langmuir-Blodgett Films of Polyaniline and Montmorillonite for Enhanced Detection of Metallic Ions. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *236*, 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.06.022>.

- (96) Makiura, R.; Motoyama, S.; Umemura, Y.; Yamanaka, H.; Sakata, O.; Kitagawa, H. Surface Nano-Architecture of a Metal–Organic Framework. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (7), 565–571. <https://doi.org/10.1038/nmat2769>.
- (97) Goulet, P. J. G.; dos Santos, D. S.; Alvarez-Puebla, R. A.; Oliveira, O. N.; Aroca, R. F. Surface-Enhanced Raman Scattering on Dendrimer/Metallic Nanoparticle Layer-by-Layer Film Substrates. *Langmuir* **2005**, *21* (12), 5576–5581. <https://doi.org/10.1021/la050202e>.
- (98) dos Santos, Jr., D. S.; Aroca, R. F. Selective Surface-Enhanced Fluorescence and Dye Aggregation with Layer-by-Layer Film Substrates. *The Analyst* **2007**, *132* (5), 450. <https://doi.org/10.1039/b618513d>.
- (99) Lin, Y.; Ma, L.; Li, Y.; Liu, Y.; Zhu, D.; Zhan, X. Small-Molecule Solar Cells with Fill Factors up to 0.75 via a Layer-by-Layer Solution Process. *Adv. Energy Mater.* **2014**, *4* (1), 1300626. <https://doi.org/10.1002/aenm.201300626>.
- (100) Han, T.-H.; Lee, E.-S.; Ko, T.-H.; Seo, M.-K.; Kim, H.-Y.; Kim, H. J.; Kim, B.-S. Hierarchically Assembled Nanofibers Created by a Layer-by-Layer Self-Assembly. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16* (4), 4080–4085. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10846>.
- (101) Selin, V.; Ankner, J. F.; Sukhishvili, S. A. Nonlinear Layer-by-Layer Films: Effects of Chain Diffusivity on Film Structure and Swelling. *Macromolecules* **2017**, *50* (16), 6192–6201. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b01218>.
- (102) Zhang, L.; Guo, H.; Sun, J. Salt Effects on the Structural Tailoring of Layer-by-Layer Assembled Polyelectrolyte Complexes and Salt-Containing Polyelectrolyte Films. *Thin Solid Films* **2018**, *653*, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2018.03.048>.
- (103) Rojas, O. J.; Ernstsson, M.; Neuman, R. D.; Claesson, P. M. Effect of Polyelectrolyte Charge Density on the Adsorption and Desorption Behavior on Mica. *Langmuir* **2002**, *18* (5), 1604–1612. <https://doi.org/10.1021/la0155698>.

- (104) Llamas, S.; Guzmán, E.; Ortega, F.; Baghdadli, N.; Cazeneuve, C.; Rubio, R. G.; Luengo, G. S. Adsorption of Polyelectrolytes and Polyelectrolytes-Surfactant Mixtures at Surfaces: A Physico-Chemical Approach to a Cosmetic Challenge. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 461–487. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.05.007>.
- (105) Lobo, R. F. M.; Pereira-da-Silva, M. A.; Raposo, M.; Faria, R. M.; Oliveira, O. N. The Morphology of Layer-by-Layer Films of Polymer/Polyelectrolyte Studied by Atomic Force Microscopy. *Nanotechnology* **2003**, *14* (1), 101–108. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/14/1/322>.
- (106) Egawa, Y.; Gotoh, R.; Seki, T.; Anzai, J. Sugar Response of Boronic Acid-Substituted Azobenzene Dye-Modified Polymer. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29* (1), 115–118. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.05.014>.
- (107) Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. Synthesis and Applications of Boronic Acid-Containing Polymers: From Materials to Medicine. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (3), 1375–1397. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00300>.
- (108) Fu, H.; Fang, H.; Sun, J.; Wang, H.; Liu, A.; Sun, J.; Wu, Z. Boronic Acid-Based Enzyme Inhibitors: A Review of Recent Progress. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21* (28), 3271–3280. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140601200803>.
- (109) Kumar, R.; Yadav, R.; Kolhe, M. A.; Bhosale, R. S.; Narayan, R. 8-Hydroxypyrene-1,3,6-Trisulfonic Acid Trisodium Salt (HPTS) Based High Fluorescent, PH Stimuli Waterborne Polyurethane Coatings. *Polymer* **2018**, *136*, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.12.056>.
- (110) Cordes, D. B.; Miller, A.; Gamsey, S.; Sharrett, Z.; Thoniyot, P.; Wessling, R.; Singaram, B. Optical Glucose Detection across the Visible Spectrum Using Anionic Fluorescent Dyes and a Viologen Quencher in a Two-Component Saccharide Sensing System. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (9), 1708. <https://doi.org/10.1039/b418953a>.

- (111) Sharrett, Z.; Gamsey, S.; Hirayama, L.; Vilozny, B.; Suri, J. T.; Wessling, R. A.; Singaram, B. Exploring the Use of APTS as a Fluorescent Reporter Dye for Continuous Glucose Sensing. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (7), 1461. <https://doi.org/10.1039/b821934f>.
- (112) Camara, J. N.; Suri, J. T.; Cappuccio, F. E.; Wessling, R. A.; Singaram, B. Boronic Acid Substituted Viologen Based Optical Sugar Sensors: Modulated Quenching with Viologen as a Method for Monosaccharide Detection. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (7), 1139–1141. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)02366-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)02366-8).
- (113) Watahiki, R.; Sato, K.; Suwa, K.; Niina, S.; Egawa, Y.; Seki, T.; Anzai, J. Multilayer Films Composed of Phenylboronic Acid-Modified Dendrimers Sensitive to Glucose under Physiological Conditions. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (35), 5809. <https://doi.org/10.1039/C4TB00676C>.
- (114) Suwa, K.; Nagasaka, M.; Niina, S.; Egawa, Y.; Seki, T.; Anzai, J. Sugar Response of Layer-by-Layer Films Composed of Poly(Vinyl Alcohol) and Poly(Amidoamine) Dendrimer Bearing 4-Carboxyphenylboronic Acid. *Colloid Polym. Sci.* **2015**, *293* (4), 1043–1048. <https://doi.org/10.1007/s00396-014-3490-7>.
- (115) Sato, K.; Takahashi, M.; Ito, M.; Abe, E.; Anzai, J.-I. Glucose-Induced Decomposition of Layer-by-Layer Films Composed of Phenylboronic Acid-Bearing Poly(Allylamine) and Poly(Vinyl Alcohol) under Physiological Conditions. *J Mater Chem B* **2015**, *3* (39), 7796–7802. <https://doi.org/10.1039/C5TB01006C>.
- (116) Campos, P. P.; Danielle, B.; Colm, D.; Marystela, F.; Dermot, D.; Larisa, F. Layer-by-Layer Coatings Based in Phenyl Boronic Acid Polymer Applied to Fructose Response. *Em Andamento*.
- (117) Valenga, F. Desenvolvimento, Caracterização e Funcionalização de Nanofilmes a Partir de Galactomana e Alginato. Tese, Universidade Federal do Paraná: Curitiba, 2011.

- (118) Faniran, J. A.; Shurvell, H. F. Infrared Spectra of Phenylboronic Acid (Normal and Deuterated) and Diphenyl Phenylboronate. *Canadian Journal of Chemistry* **1968**, *46*, 2089–2095.
- (119) Karabacak, M.; Kose, E.; Atac, A.; Asiri, A. M.; Kurt, M. Monomeric and Dimeric Structures Analysis and Spectroscopic Characterization of 3,5-Difluorophenylboronic Acid with Experimental (FT-IR, FT-Raman, ¹H and ¹³C NMR, UV) Techniques and Quantum Chemical Calculations. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1058*, 79–96. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.10.064>.
- (120) Lin, Y.; Yan, Q.; Kong, C.; Chen, L. Polyethyleneimine Incorporated Metal-Organic Frameworks Adsorbent for Highly Selective CO₂ Capture. *Sci. Rep.* **2013**, *3* (1). <https://doi.org/10.1038/srep01859>.
- (121) Wen, S.; Zheng, F.; Shen, M.; Shi, X. Surface Modification and PEGylation of Branched Polyethyleneimine for Improved Biocompatibility. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *128* (6), 3807–3813. <https://doi.org/10.1002/app.38444>.
- (122) Lakard, S.; Herlem, G.; Lakard, B.; Fahys, B. Theoretical Study of the Vibrational Spectra of Polyethylenimine and Polypropylenimine. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2004**, *685* (1–3), 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2004.06.042>.
- (123) Wang, F.; Liu, P.; Nie, T.; Wei, H.; Cui, Z. Characterization of a Polyamine Microsphere and Its Adsorption for Protein. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *14* (1), 17–29. <https://doi.org/10.3390/ijms14010017>.
- (124) Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5^o.; Guanabara Koogan, 1994.
- (125) Roy, A. C.; Nisha, V. S.; Dhand, C.; Ali, M. A.; Malhotra, B. D. Molecularly Imprinted Polyaniline-Polyvinyl Sulphonic Acid Composite Based Sensor for Para-

- Nitrophenol Detection. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *777*, 63–71.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.014>.
- (126) B. K. Sharma. *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, 24th ed.; Goel Publishing House Meerut: Índia, 2005.
- (127) Panzarasa, G.; Osypova, A.; Toncelli, C.; Buhmann, M. T.; Rottmar, M.; Ren, Q.; Maniura-Weber, K.; Rossi, R. M.; Boesel, L. F. The Pyranine-Benzalkonium Ion Pair: A Promising Fluorescent System for the Ratiometric Detection of Wound PH. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *249* (Supplement C), 156–160.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.045>.
- (128) Aoki, P. H. B.; Volpati, D.; Riul, A.; Caetano, W.; Constantino, C. J. L. Layer-by-Layer Technique as a New Approach to Produce Nanostructured Films Containing Phospholipids as Transducers in Sensing Applications. *Langmuir* **2009**, *25* (4), 2331–2338.
<https://doi.org/10.1021/la802696j>.