

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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. 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<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> 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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. 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<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> 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 hidrocloreto) (PAH) formando o (PAH/poli(SP-R))<sub>n</sub> 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)<sub>2</sub>(PBAp/PVS)<sub>n</sub>. 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)<sub>2</sub>(PBAp/PYR)<sub>n</sub> 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/poli(SP-R))<sub>n</sub> 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)<sub>2</sub>(PBAP/PVS)<sub>n</sub>. 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)<sub>2</sub>(PBAP/PYR)<sub>n</sub>. 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) <sub>2</sub> (PEI/EM) <sub>7</sub> 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) <sub>2</sub> e (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/EM) <sub>7</sub> .....	63
Figura 19 – (A) Espectros UV-vis de cada bicamada do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/DPPG-POPG-EM) <sub>7</sub> . (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) <sub>10</sub> (verde) e (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/DPPG-POPG-EM) <sub>7</sub> (azul). .....	67
Figura 21 - Somatória da absorbância das soluções provenientes do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/EM) <sub>7</sub> 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) <sub>2</sub> (PEI/DPPG-POPG-EM) <sub>7</sub> 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) <sub>2</sub> (PEI/EM) <sub>7</sub> e (B) (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/DPPG-POPG-EM) <sub>7</sub> em tampão fosfato de sódio com valores de pH de 5,5, 6,75 e 8 e velocidade de varredura de 100 mV.s <sup>-1</sup> . (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) <sub>2</sub> , (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/EM) <sub>10</sub> e (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/DPPG-POPG-EM) <sub>10</sub> . .....	75
Figura 27 – Curvas angulares de SPR do filme Au-MUA/(PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/EM) <sub>1</sub> 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) <sub>2</sub> /(PEI/EM) <sub>1</sub> 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) <sub>5</sub> (PDADMAC/PSS) <sub>n</sub> . (B) Enxague do filme com água. (C) O filme após ser removido. ....	84
Figura 32 – Esquema de fabricação do filme (PAH/poli(SP-R)) <sub>5</sub> . 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 <sup>-1</sup> . 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 <sup>-1</sup> , com pico máximo em 206 nm. ....	95
Figura 39 – Potencial zeta da solução de poli(MC-R) em DMF, 0,1 mg.mL <sup>-1</sup> , 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 <sup>-1</sup> , 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)) <sub>10</sub> com a solução de poli(SP-R) preparado em DMF. (B) Absorbância do filme (PAH/poli(SP-R)) <sub>10</sub> em $\lambda = 370$ nm vs o número de bicamadas. ....	97
Figura 42 - (A) Espectros de cada bicamada do filme (PAH/poli(SP-R)) <sub>10</sub> 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)) <sub>10</sub> após ser exposto a luz UV por 3 minutos. (C) Absorbância do filme (PAH/poli(SP-R)) <sub>10</sub> em $\lambda = 345$ nm vs o número de bicamadas. (D) Absorbância do filme (PAH/poli(SP-R)) <sub>10</sub> em $\lambda = 590$ nm vs o número de bicamadas.....	98
Figura 43 – (A) Espectro UV-vis do filme (PAH/poli(SP-R)) <sub>5</sub> 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)) <sub>5</sub> e (PAH/poli(MC-R)) <sub>5</sub> a cada ciclo UV/LB. ....	100

Figura 44 – Absorbância em $\lambda = 345$ nm do filme (PAH/poli(MC-R)) <sub>5</sub> 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)) <sub>1</sub> 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)) <sub>5</sub> 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)) <sub>5</sub> 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)) <sub>5</sub> em degraus (A). Imagens de MEV de cada uma das 5 bicamadas do filme (PAH/poli(SP-R)) <sub>5</sub> 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 $\mu$ 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 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 <sub>p</sub> /PVS) <sub>n</sub> , 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) <sub>2</sub> (PBA <sub>o</sub> ) <sub>5</sub> , (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBA <sub>m</sub> ) <sub>5</sub> e (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBA <sub>p</sub> ) <sub>5</sub> .....	122
Figura 59 - Relação entre a absorvância em $\lambda = 230$ nm e o número de bicamadas dos filmes (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBA <sub>o</sub> /PVS) <sub>5</sub> , (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBA <sub>m</sub> /PVS) <sub>5</sub> e (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBA <sub>p</sub> /PVS) <sub>5</sub> . 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) <sub>2</sub> (PBA <sub>p</sub> /PVS) <sub>15</sub> . (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 <sub>p</sub> ) e do filme LbL (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBA <sub>p</sub> /PVS) <sub>15</sub> . As setas vermelhas indicam as diferenças entre os materiais puros e o filme LbL.....	126
Figura 62 – Espectros do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBA <sub>p</sub> /PVS) <sub>5</sub> em: (A) em tampão fosfato e em solução glicose 100 mmol.L <sup>-1</sup> e (B) em tampão fosfato e em solução de frutose 100 mmol.L <sup>-1</sup> . ....	129

Figura 63 – Absorbância do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBAp) <sub>5</sub> inicial, 30 e 60 minutos após mergulhado em tampão fosfato e segundos na solução de frutose na concentração de 10 mmol L <sup>-1</sup> . .....	130
Figura 64 - Absorbância do filme (A) (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBAo) <sub>5</sub> e (B) (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBAm) <sub>5</sub> inicial, 30 e 60 minutos após mergulhado em tampão fosfato e segundos em solução de frutose na concentração de 10 mmol.L <sup>-1</sup> . .....	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) <sub>2</sub> (PBAp/Pyr) <sub>5</sub> á direita. (B) Estrutura química da piranina. (C) Relação entre a absorbância do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBAp/Pyr) <sub>5</sub> em $\lambda = 410$ nm e o número de bicamadas. ....	133
Figura 66 – Espectro de excitação do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBAp/PVS) <sub>5</sub> 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) <sub>2</sub> (PBAp/PYR) <sub>20</sub> . As setas vermelhas indicam as diferenças entre o filme LbL e os materiais puros.....	136
Figura 68 – Análise de perfilômetria do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBAp/PYR) <sub>5</sub> .....	139
Figura 69 – Espectros de absorbância do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBAp/PYR) <sub>5</sub> inicial e após 15 minutos em tampão.....	140
Figura 70 – No eixo esquerdo, em preto está a absorbância do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBAp/PYR) <sub>5</sub> em $\lambda = 410$ nm, inicial, minutos em tampão e segundos em solução de frutose, 30 mmol.L <sup>-1</sup> . 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) <sub>2</sub> e (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/EM) <sub>7</sub> .....	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) <sub>2</sub> e (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/DPPG-POPG-EM) <sub>7</sub> .....	67
Tabela 4 - Espessura e índice de refração de cada camada do filme AU-MUA(PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/EM) <sub>1</sub> . ....	77
Tabela 5 - Atribuições das frequências de vibração dos materiais puros PBAP, PEI, PVS e do filme LbL (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBAP/PVS) <sub>20</sub> .....	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) <sub>2</sub> (PBAP/PYR) <sub>20</sub> .....	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<sub>x</sub>- 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<sub>v</sub> - Temperatura de transição vítrea

UV- Ultravioleta

UV-vis - Ultravioleta-visível

$\lambda$  = Comprimento de onda

## Sumário

<b>Capítulo 1 – Introdução e Objetivos .....</b>	<b>29</b>
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
<b>2. Capítulo 2 – Desenvolvimento de filmes Layer-by-Layer de emodina.....</b>	<b>42</b>
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) <sub>2</sub> (PEI/EM) <sub>n</sub> .....	60
2.5.4.	Fabricação do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/DPPG-POPG-EM) <sub>n</sub> .....	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
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3 – Filmes Layer-by-Layer de espiropirano.....</b>	<b>81</b>
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)) <sub>n</sub> .....	96
3.6.	Conclusão.....	107
<b>4.</b>	<b>Capítulo 4 – Filmes Layer-by-Layer de ácido fenil borônico.....</b>	<b>109</b>
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) <sub>2</sub> (PBA <sub>x</sub> /PVS) <sub>5</sub> .....	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) <sub>2</sub> (PBA <sub>p</sub> /PYR) <sub>5</sub> .....	131
4.5.3.2.	Análises por FTIR e perfilometria do filme (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PBA <sub>p</sub> /PYR) <sub>5</sub> ....	134

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

## 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.<sup>1</sup>

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.<sup>2</sup> 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.<sup>3</sup>

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.<sup>4,5</sup>

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.<sup>6</sup> 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.<sup>5</sup>

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.<sup>5</sup> 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.<sup>7</sup>

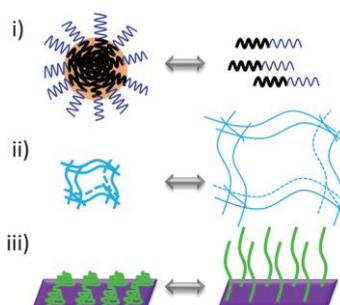
A maioria das drogas é administrada em quantidades intermediárias, numa concentração mínima que cause o efeito desejado (Concentração Mínima Eficaz – CME), mas não tão alta a ponto de causar efeitos tóxicos (Concentração Máxima Tóxica – CMT).

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.<sup>8</sup>

## 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.<sup>9</sup> 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.

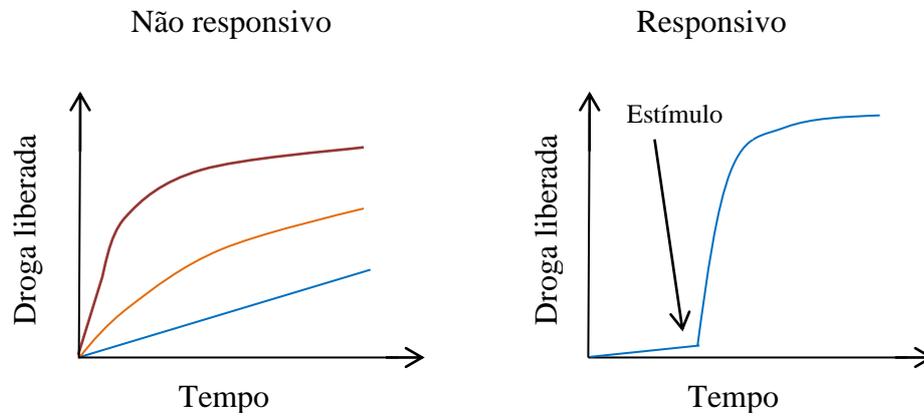


### 1.3. Liberação modificada de fármacos em resposta à estímulos

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 <sup>10</sup> 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. <sup>2</sup> 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.

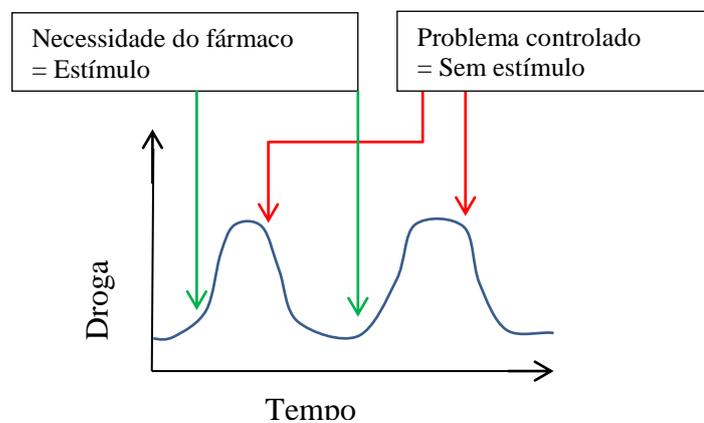
Figura 2 – Diferença entre um sistema de liberação responsivo e não responsivo.



Fonte: Adaptado de Shi et al. <sup>11</sup>

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. <sup>1</sup>

Figura 3 – Sistema de liberação controlada por retroalimentação



Fonte: Adaptado de Alvarez-Lorenzo. <sup>1</sup>

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*,<sup>1</sup> 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.<sup>1</sup> 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

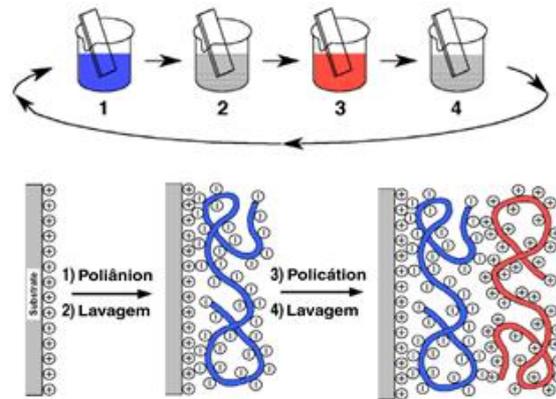
A versatilidade da técnica LbL permite a construção de filmes com uma vasta gama de materiais e aplicações, entre eles os materiais inteligentes, que permite que frente a um estímulo o filme tenha uma resposta que pode ser ajustável a assim ser aplicado a sistemas biológicos e ambientais.

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.<sup>12,13</sup>

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,<sup>14</sup> (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.<sup>12,14</sup> 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,<sup>15</sup> mas apenas em 1997, Decher<sup>16</sup> 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,<sup>16</sup> como ilustrado na Figura 4.

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



Fonte: Adaptado de Decher, Gero.<sup>16</sup>

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.<sup>17</sup> 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.<sup>18</sup>

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.<sup>19</sup>

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.<sup>19</sup>

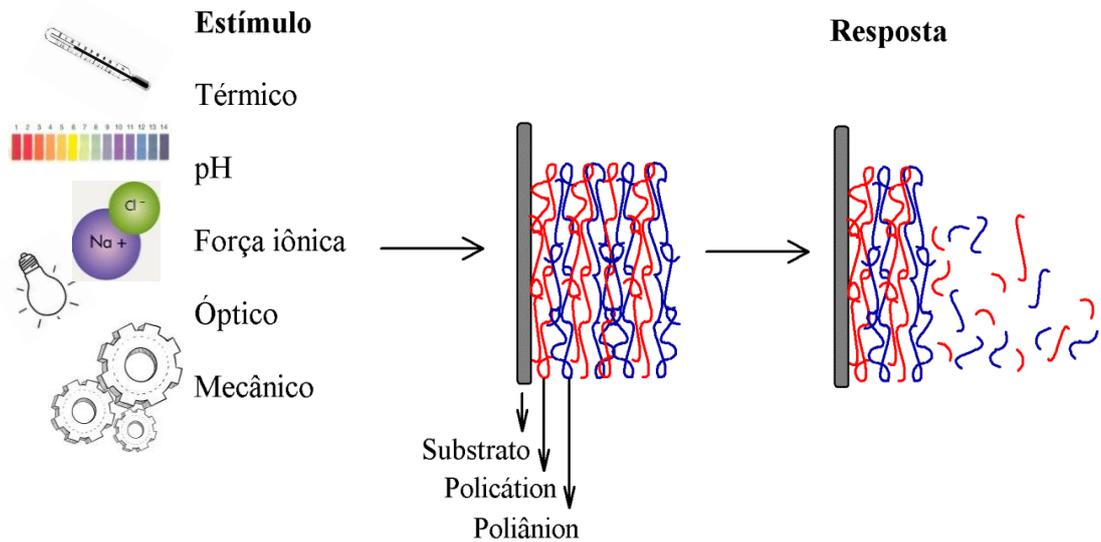
Ligação através de reconhecimento de biomoléculas – nesta técnica um anticorpo pode ser adsorvido na superfície e o antígeno ser adicionado e se ligar ao anticorpo. O método é mais utilizado para sistemas de sensoriamento e pode ser usado também com DNA e enzimas.<sup>19</sup>

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,<sup>20</sup> temperatura,<sup>21</sup> irradiação de luz,<sup>22,23</sup> estímulos mecânicos,<sup>24</sup> 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.<sup>19</sup> 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.<sup>19</sup> 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.<sup>12,19,25</sup>

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.<sup>12</sup>

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.<sup>12,25</sup>

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. <sup>12,19</sup>

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. <sup>26</sup>

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. <sup>24</sup>

## 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.

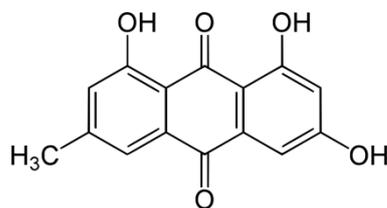
## Capítulo 2 – Desenvolvimento de filmes Layer-by-Layer de emodina

### 3.1. Introdução

#### 3.1.1. Emodina

A emodina é um composto alaranjado proveniente da planta *Rheum palmatum*, mais conhecida como ruibarbo ou frangula. É bastante tradicional em terapias chinesas, mas tem despertado grande interesse em pesquisas acadêmicas na área da saúde pelas suas funcionalidades.<sup>27</sup> Apresenta efeito antibacteriano<sup>28</sup> para alguns tipos de bactérias, anti-inflamatório,<sup>29</sup> imunossupressor,<sup>30</sup> vasorelaxante,<sup>31</sup> antiulcerogênico, antineoplásico com vários estudos mostrando a inibição do crescimento de vários tipos de células tumorais<sup>32</sup> e ação em infecções subcutâneas causadas por parasitas.<sup>28</sup> O composto possui vários sinônimos, tais como: 1,3,8-Trihidroxi-6-metil-9,10-antracenediona, emodol e frangula-emodina. Sua estrutura química pode ser observada na Figura 6.

Figura 6 – Estrutura química da emodina.



Fonte: Adaptado de Campos et al.<sup>14</sup>

### 3.1.2. Lipossomos

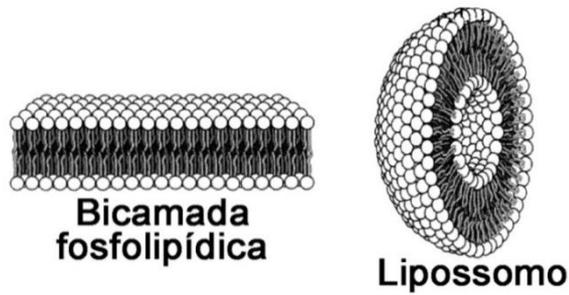
Os lipossomos são vesículas compostas de fosfolipídios muito utilizadas como carreadores de fármacos devido às suas características e semelhança com as membranas celulares. A formação do lipossomo se dá pelo fechamento de uma ou mais bicamadas lipídicas em meio aquoso. A bicamada é composta de lipídios arranjados de forma que a cabeça hidrofílica interage com a água, e as caudas hidrofóbicas interagem entre si. Porém, essa forma é instável, pois as extremidades hidrofóbicas da bicamada ficam em contato com a água e a tendência é que os grupos apolares se organizem em compartimentos ordenados, diminuindo a entropia e levando assim ao fechamento da bicamada, formando o lipossomo.<sup>33</sup> De tal modo fármacos e biomoléculas podem ser encapsuladas nos lipossomos, tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, de forma que as primeiras ficam no compartimento aquoso interno ou ligadas na região externa, e as segundas ficam na região hidrofóbica das caudas. A representação de uma bicamada lipídica e um lipossomo pode ser vista na Figura 7.

Os lipossomos podem ser classificados conforme a quantidade de bicamadas que circundam o compartimento aquoso interno, podendo ter uma única bicamada ou múltiplas, e conforme seu tamanho: vesícula unilamelar grande (LUV, do inglês *large unilamellar vesicles*), vesícula unilamelar pequena (SUV, *small unilamellar vesicles*) ou vesícula multilamelar grande (LMV, *large multilamellar vesicles*) (formados por bicamadas concêntricas de lipídios), representadas na Figura 8. O método de preparação é que determina o tamanho da vesícula.<sup>34,35</sup>

Os lipossomos têm propriedades físico-químicas bastantes características em função da sua temperatura de transição vítrea ( $T_v$ ), na qual abaixo da  $T_v$  as cadeias ficam mais rígidas, em arranjos bem ordenados, conhecida como fase-gel, enquanto que acima da  $T_v$ , as cadeias ficam mais fluídas, em uma fase cristal-líquido. A  $T_v$  varia para cada fosfolipídio, de

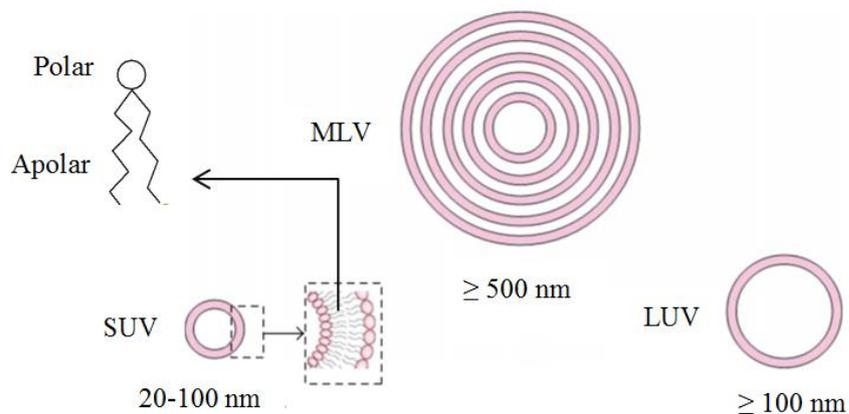
forma que a  $T_v$  do lipossomo pode ser alterada combinando fosfolipídios de diferentes  $T_v$  em função da temperatura desejada.<sup>34,35</sup>

Figura 7 - Representação de uma bicamada lipídica partir de fosfolipídios e um lipossomo



Fonte: Adaptado de Salunkhe et al.<sup>36</sup>

Figura 8 - Representação de uma molécula de fosfolipídio e classificação dos lipossomos em relação ao seu tamanho: SUV, LUV e MLV.



Fonte: Adaptado de Periyasamy et al.<sup>37</sup>

### 3.2. Revisão de literatura

Devido às propriedades farmacológicas da emodina e sua baixa solubilidade em água <sup>38</sup> vários sistemas têm sido desenvolvidos para facilitar sua aplicação, como nanoemulsões de capriol, cremofor e transcitol, <sup>39</sup> poloxamers, <sup>40,41</sup> microesferas de poliácido lático, <sup>42</sup> sílica mesoporosa <sup>43-45</sup> e lipossomos revestidos com seda de fibroína. <sup>14</sup> Para aplicações transdérmicas, a partir da imobilização da emodina em suporte sólido, os filmes LbL são uma alternativa prática visto que oferecem a vantagem da facilidade de aplicação e remoção, enquanto os cremes e pomadas precisam ser espalhados e são difíceis de remover, principalmente se a pele estiver lesionada.

Jate et al <sup>46</sup> produziram fibras de acetato de celulose ultrafinas pela técnica de eletrofiação ou em inglês *Electrospinning*, e encapsulou emodina com o objetivo de testar a liberação por imersão em tampão PBS e 10% de metanol. Todas as fibras apresentaram um *burst release* (alta taxa de liberação em pouco tempo) nos primeiros 6 minutos, seguida de uma liberação sustentada por até 120 minutos e finalizou em 360 min. A citotoxicidade foi avaliada em cultura de células e mostrou que o material não é tóxico e é capaz de promover a produção de colágeno.

Dai et al <sup>47</sup> também produziram membranas de nanofibras de polivinilpirrolidona por eletrofiação. Depois de 120 minutos quase 100% da emodina incorporada na membrana foi liberada, enquanto a droga pura foi liberada apenas 4,2% em todo esse tempo. Testes em animais foram realizados e foi demonstrado que a membrana com emodina acelerou o processo de cicatrização de feridas. <sup>47</sup>

Wang et al produziu filmes LbL com microgel catiônico de polialilamina hidrocloreada e dextran (PAHD) intercalado com carboximetilcelulose de sódio (CMC) formando o filme LbL (PAHD/CMC), que foi imerso em uma solução de emodin boronato para adsorção das

moléculas na estrutura do filme. A liberação da emodina foi testada em quatro condições: água, tampão fosfato salino em condições fisiológicas, 5 mmol L<sup>-1</sup> de glicose e em bicarbonato de sódio isotônico, sendo que quase nada foi liberado nos dois primeiros casos, um pouco no terceiro e 100% no quarto, o que levou em torno de 120 segundos para a liberação completa da emodina.

O presente trabalho oferece duas rotas de liberação da emodina por filmes LbL a fim de prolongar seu tempo de liberação, uma na qual a emodina é diretamente intercalada com polieletrólito e devido à diferença de pH e força iônica da solução de preparação do filme e das condições de liberação (em meio fisiológico) as interações são afetadas e a emodina se desprende do filme. E a segunda é com o uso de lipossomos, que apresenta a resposta em função da variação de temperatura e assim em temperatura fisiológica (37°C) liberam a emodina. Desta forma, foram preparados dois tipos de filmes LbL, um composto de emodina e polieletrólito PEI formando (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>n</sub> e outro em que a emodina foi encapsulada em lipossomos formados pelos fosfolípídeos dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e palmitoil fosfatidil glicerol (POPG) e em seguida os lipossomos foram intercalados com o PEI, formando o filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI-DPPG-POPG-EM)<sub>n</sub>. Esta capítulo foi realizada no laboratório Finep 1, da Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, sob supervisão da Profa. Dr. Marystela Ferreira, credenciada à POSMAT.

### 3.3. Objetivos

Desenvolver sistemas de liberação modificados de emodina utilizando a técnica de automontagem de filmes nanoestruturados LbL. Os objetivos específicos são imobilizar a emodina diretamente no filme ou encapsulada em um carreador, avaliar o perfil de liberação

dos dois sistemas e caracterizar os filmes por UV-vis, fluorescência, ângulo de contato, voltametria cíclica e determinar a espessuras das camadas por SPR.

### 3.4. Materiais e métodos

A emodina ( $C_{15}H_{10}O_5$ ) proveniente da casca de Frangula (planta), com massa molar 270,24  $g \cdot mol^{-1}$ , ponto de fusão de 253°C e pureza  $\geq 90\%$ , a polietilenoimina (PEI) (50% em  $H_2O$ ) (grau analítico) e o poli(vinil sulfônico) (PVS) (25% em  $H_2O$ ) (grau técnico) foram obtidos comercialmente pela Sigma Aldrich e usados como recebido. Os lipídeos dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e palmitoil fosfatidil glicerol (POPG) foram adquiridos pela Avanti Polar Lipids - Polar Lipids, Inc.

#### 3.4.1. Preparo de soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura do sistema Sartorius modelo Arium confort, com resistividade de 18,2  $M\Omega \cdot cm$  a 25°C. O tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) foi feito da seguinte forma: uma solução contendo cloreto de sódio (NaCl) a 150  $mmol L^{-1}$  e fosfato de sódio bibásico anidro ( $Na_2HPO_4$ ) a 6  $mmol \cdot L^{-1}$  foram preparados juntos no mesmo recipiente, sem completar o menisco. Foi ajustado o pH em 7,4 com uma solução de fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) a 150  $mmol \cdot L^{-1}$ . Após alcançar o valor desejado de pH o volume foi completado com água.

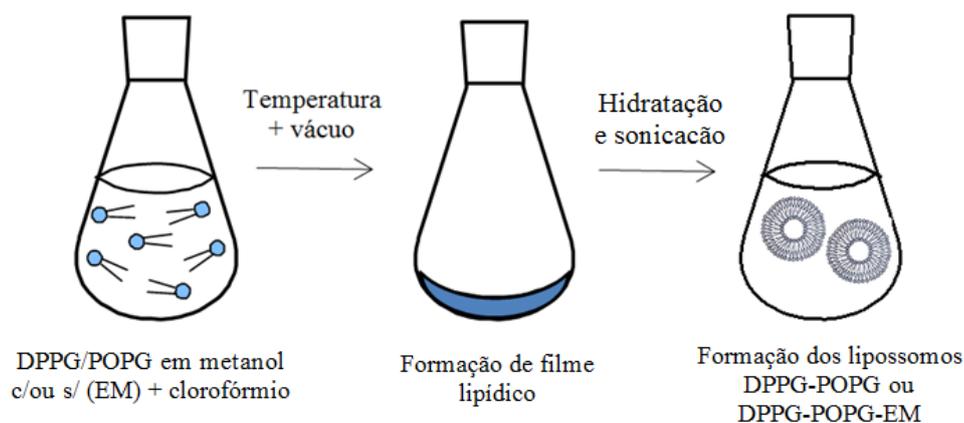
O tampão fosfato foi feito de forma similar ao PBS, uma solução de fosfato de sódio monobásico a 10  $mmol L^{-1}$  e outra de fosfato de sódio bibásico anidro de 10  $mmol \cdot L^{-1}$  foram preparadas separadamente, uma solução ajustou a outra com valores de pH entre 5,5 e 8 e após o volume foi completado com água.

A emodina foi solubilizada em etanol  $8,8 \text{ mmol L}^{-1}$ , e posteriormente diluída em tampão fosfato, na razão 1/10 (V:V) de etanol/tampão. Para os filmes de emodina os polieletrólitos foram preparados em tampão fosfato no pH 8 e para os filmes de lipossomos foram preparados em água. A concentração foi a mesma para ambos os filmes (PEI  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  e PVS a  $4 \mu\text{L mL}^{-1}$ ).

#### 3.4.2. Preparação dos lipossomos

O processo de preparação dos lipossomos foi baseada no trabalho de Lima, et al.<sup>48</sup> Os lipídios (DPPG) e (POPG) foram dissolvidos na concentração de  $0,95 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ , respectivamente, na mistura metanol/clorofórmio (1:8) para formação de lipossomos (DPPG/POPG). Para a formação de lipossomos contendo emodina incorporada, o fármaco foi solubilizado previamente em metanol, na concentração de  $24 \text{ mmol L}^{-1}$  e então os lipossomos foram solubilizados em metanol-emodina/clorofórmio (1:8). As soluções foram adicionadas em tubos de destilação acoplados a um rotaevaporador IKA modelo RV10 *basic*, mantidos a  $38^\circ\text{C}$ , 35 rpm e pressão de 400 mmHg, até a secagem dos solventes e formação do filme no fundo do tubo. Os filmes foram hidratados com água ultrapura e colocados em banho de ultrassom Unique Maxiclean 750, por 2 horas, para obtenção de lipossomos, o processo está esquematizado na Figura 9. Para fins comparativos, o mesmo procedimento foi realizado apenas com os fosfolipídios, sem a presença da emodina.

Figura 9 - Representação esquemática da preparação do lipossomo.



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.4.3. Limpeza dos substratos

As lâminas de quartzo e vidro foram limpas seguindo as etapas do processo de hidrofilização:

- 1) 10 minutos em solução básica contendo  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$  na proporção 1:1:5 à temperatura entre 75 e 85 °C.
- 2) Lavagem em água ultrapura.
- 3) 10 minutos em solução ácida de  $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$  (1:1:6) à temperatura entre 75 e 85 °C.
- 4) Lavagem e armazenamento em água ultrapura.

As lâminas de silício foram limpas usando hastes flexíveis com clorofórmio e etanol e colocadas em banho de ultrassom por 30 minutos em álcool isopropílico.

#### 3.4.4. Fabricação dos filmes

Todos os processos de deposição foram monitorados por espectroscopia UV-vis. Para todos os filmes, antes de iniciar a montagem com o material de interesse foram depositadas 2 bicamadas apenas de polieletrólitos na sequência: (i) 3 minutos em PEI, (ii) 30 segundos em água ultrapura ou tampão, (iii) 3 minutos em PVS e (iiii) 30 segundo em água ultrapura ou tampão, formando  $(\text{PEI/PVS})_2$  para minimizar a interferência do substrato na deposição do filme.<sup>49</sup>

Os tempos de imersão para o PEI, PVS e lipossomos foram baseados em trabalhos anteriores do grupo<sup>21,50,51</sup>. O tempo ideal da emodina foi determinado por um teste de cinética na qual o tempo de imersão do substrato na solução foi aumentado gradativamente e analisado por espectroscopia UV-vis, até a absorbância estabilizar, significando que a partir daquele tempo não houve mais deposição de material.

Os filmes de emodina foram produzidos nas seguintes etapas: (i) 3 minutos em PEI (ii) 30 segundos em tampão fosfato (iii) 7 minutos em emodina e (iiii) 30 segundos em tampão fosfato, formando  $(\text{PEI/PVS})_2/(\text{PEI/EM})_n$ .

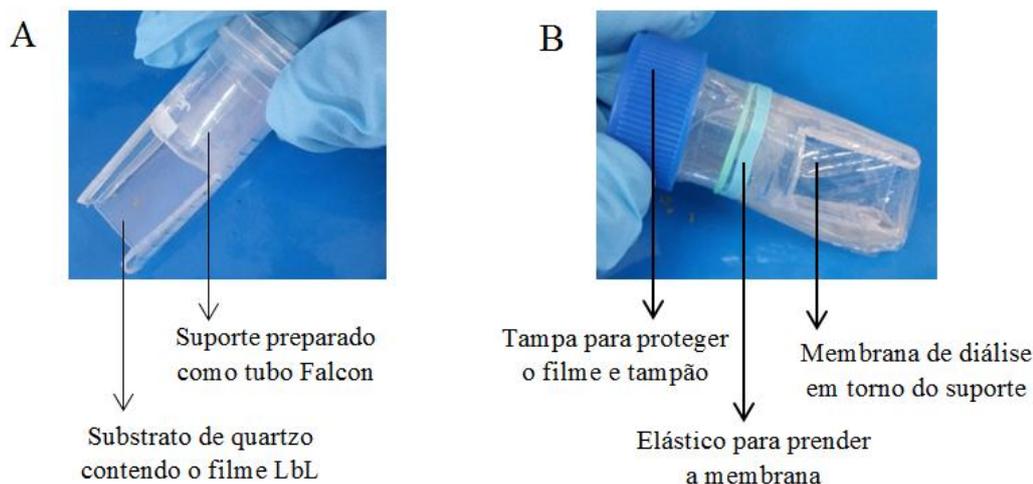
A produção dos filmes de emodina encapsulada em lipossomos foi nas seguintes etapas: (i) 3 minutos em PEI, (ii) 30 segundos em água ultrapura, (iii) 10 minutos na solução de lipossomos (DPPG-POPG-EM) e (iiii) 30 segundo em água ultrapura, formando  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$ . O processo foi repetido (n) vezes até obter o número de bicamadas desejadas.

### 3.4.5. Liberação dos filmes

Membranas de diálise foram empregadas para realizar os testes de liberação *in vitro* dos filmes LbL como o modelo de dois compartimentos. Este modelo é baseado em separar dois compartimentos com a membrana, deixando de um lado o fármaco e do outro uma solução receptora, que será analisada para quantificar a quantidade de fármaco que atravessou. Para tal foi necessário fazer uma adaptação, pois a membrana é bastante maleável e não teria estrutura para suportar o substrato de quartzo dentro dela. Assim, foi preparado um suporte, usando tubo Falcon de 10 mL que foi cortado com aproximadamente 4 cm de altura, e foram feitos cortes como “janelas” de 2 cm de altura e 1,5 cm de comprimento. O substrato contendo o filme foi colocado dentro deste suporte e o sistema foi envolvido pela membrana de diálise, como está indicado nas Figuras 10A e 10B, respectivamente. A membrana possui *cut-off* de 12000 a 16000 Daltons.

Os filmes  $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$  e  $(PEI/PVS)_2(PEI/DPPG-POPG-EM)_7$  foram colocados dentro do suporte contendo a membrana de diálise e o conjunto foi inserido em um béquer. Foram adicionados 3 mL de tampão PBS dentro do suporte, e 3 mL ao lado externo. A cada tempo pré-determinado o béquer contendo 3 mL de tampão externo foi trocado, a solução já usada foi analisada por UV-vis e uma nova solução receptora foi colocada, para garantir que toda emodina que saia do filme fosse solubilizada.

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.



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 3.4.6. Instrumentação

As medidas de absorvância realizadas para monitorar a deposição dos filmes e os testes de liberação foram feitas no equipamento Thermo Scientific Genesys 6 <sup>TM</sup>. A linha de base para filmes foi feita com lâmina de quartzo, enquanto para soluções utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm contendo o solvente correspondente ao usado na medida.

As análises de espectroscopia no infravermelho foram feitas no modo transmissão no equipamento Agilent Technologies, modelo Cary 630 FTIR, com linha de base feita com lâminas de silício, adquiridas pela Sigma Aldrich. As soluções de emodina e DPPG-POPG foram preparadas pelo método *drop casting* e os filmes (PEI/PVS)<sub>10</sub>, (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>7</sub> e (PEI/PVS)<sub>10</sub>(PEI-DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> por LbL, ambos sobre o silício.

Os lipossomos de DPPG-POPG e DPPG-POPG-Emodina foram analisadas pela técnica de Análise e Rastreamento de Nanopartículas (NTA, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*). Os dados foram obtidos em uma célula NanoSight LM 10, com laser verde em comprimento de onda de 532 nm e câmera sCMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) com software NanoSight (versão 2.3). As soluções foram diluídas 50 vezes e foram feitas 5 medidas diferentes para cada amostra. Para cada medida, um novo volume foi injetado dentro da célula volumétrica, para remoção da solução anterior e inserção de nova solução e com isso foram obtidos dados do tamanho das nanopartículas e imagens da dispersão de luz pelos lipossomos.<sup>52</sup> A NTA é uma técnica que permite monitorar o movimento individualizado de cada nanopartícula. A equação de Stokes-Einsten determina a dimensão da nanopartícula:

$$Dt = \frac{TKb}{3\pi\eta d} \quad (1)$$

Onde Kb é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta,  $\eta$  é a viscosidade, d é o diâmetro da nanopartícula e Dt é a constante de difusão em função do tempo.

Voltametrias cíclicas foram feitas no Autolab PGSTAT 30, com uma célula eletroquímica de um compartimento contendo tampão fosfato de sódio no pH 5,5, 6,7 e 8,0, com um eletrodo auxiliar de folha de platina (1,0 cm<sup>2</sup>). A varredura de potencial foi feita entre -0,9 a 0,5 V *versus* o eletrodo de calomelano saturado (SCE, do inglês *Saturated Calomel Electrode*). O eletrodo de trabalho foi uma lâmina de vidro recoberto com Óxido de Índio dopado com Estanho (ITO, do inglês *Indium Tin Oxide*) da marca Delta Inc. modificado com os filmes LbL (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>7</sub> e (PEI/PVS)<sub>10</sub>(PEI-DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub>.

Para as análises de superfície dos filmes (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>7</sub> e (PEI/PVS)<sub>10</sub>(PEI-DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> foi utilizado um medidor de ângulo de contato da Hamé-hart modelo 250

Standard, e as imagens foram analisadas no software DROPimage Advanced. Foi utilizada água em todas as análises para checar a hidrofiliçidade dos filmes.

Nas análises de determinação de espessura ( $d$ ) do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>1</sub> pela técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) do inglês *Surface Plasmon Resonance*, os materiais foram depositados sobre um eletrodo de ouro adquirido da Bionavis® previamente hidrofiliçizado com a solução básica como descrito na Seção 2.4.3. (Limpeza dos substratos) e funcionalizado com ácido 11-mercaptundecanóico (11-MUA) preparado à 10 mmol.L<sup>-1</sup> em etanol por uma noite. O filme foi preparado seguindo o mesmo procedimento descrito no tópico 2.4.4. (Fabricação dos filmes), apenas no lado do eletrodo que contém o ouro, e inserido no equipamento SPR Navi 200 (Bionavis, Finlândia) após o preparo de cada camada. Foram realizadas análises em dois canais independentes, com lasers de 670 e 785 nm em ar.

As curvas obtidas pelo equipamento foram simulados pelo software WinSpall versão 3.02. As curvas angulares do substrato de ouro puro com 11-MUA foram ajustadas de acordo com os parâmetros fornecidos pela BioNavis para o prisma ( $d = 0$ ;  $n = 1.5202$ , fixos), a camada de adesão de Cr ( $d = 2$ ;  $n = 2.5$ , variáveis), a camada de Au ( $d = 50$ ;  $n = 0.2$ , variáveis) e o meio de ar ( $d = 0$ ;  $n = 1.000273$ , fixos). Os valores de espessura e índice de refração ( $n$ ) obtidos com o ajuste foram: i) Cr: 1,23 nm e 3,4032, (ii) Au: 53,98 nm e 0,1896 e (iii) 11-MUA: 3,44 nm e 1,4436. O sistema experimental do SPR que usa dois comprimentos de onda permite encontrar simultaneamente os valores de  $n$  e  $d$  de cada camada do filme, conforme descrito previamente.<sup>53,54</sup> Os parâmetros obtidos a partir da modelagem do substrato de ouro com 11-MUA, foram usados para simular as camadas subseqüentes. Para tal, foram atribuídos valores de  $n$  entre 1,2 a 1,7 com um intervalo de 0,1 para cada camada fornecendo uma curva contínua  $d - n$ . O procedimento foi repetido para os dois comprimentos de onda e as curvas  $d - n$  foram comparadas. O ponto de intersecção representa um valor

único de  $d$  e  $n$  para os dois comprimentos de onda, fornecendo o valor de  $d$ . Nos gráficos onde não houve intersecção, foi realizado um deslocamento de uma das curvas  $d - n$  através da Equação 2 devido à dispersão  $dn/dL$  (na qual  $L$  representa o comprimento de onda), como proposto Liang, H. *et al.* e Granqvist, N. *et al.* <sup>53,54</sup>.

$$n(\text{deslocado}) = n(\text{original}) + (dn/dL) \cdot L \quad (2)$$

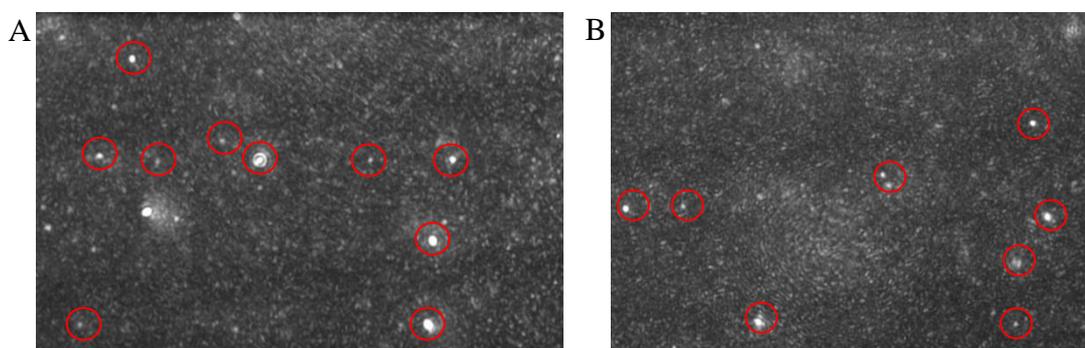
### 3.5. Resultados e Discussões

#### 3.5.1. Obtenção dos lipossomos

Os fosfolipídios DPPG e POPG foram misturados a fim de obter um lipossomo com temperatura de transição vítrea ( $T_v$ ) próxima ao fisiológica, 37°C. O DPPG possui  $T_v$  em 41 °C e o POPG -2 °C. <sup>21</sup> Assim, com a proporção de lipídios (DPPG/POPG) (9,5/0,5) trabalhos anteriores do grupo observaram que a temperatura obtida pela mistura resulta em uma  $T_v$  próxima à 37°C. <sup>51</sup> Os lipossomos preparados a partir dessa composição DPPG/POPG puros e com emodina (DPPG/POPG-EM) foram analisados por NTA para verificar a formação, tamanho e dispersão.

As Figuras 11A e 11B são imagens obtidas a partir dos vídeos gravados na análise. Os círculos vermelhos estão destacando exemplos de dispersões de luz que o programa monitora o trajeto e reconhece como lipossomo, apresentando tamanhos variados.

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.

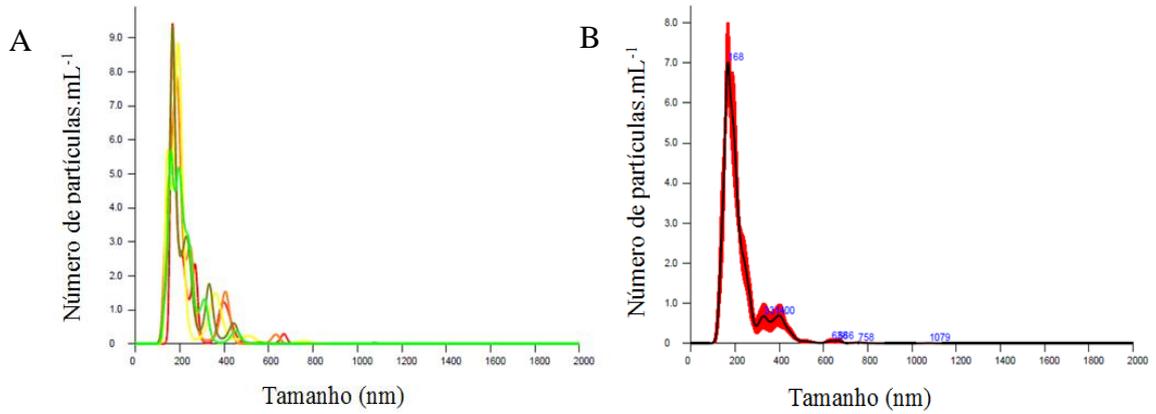


Fonte: Elaborado pelo autor

Os gráficos das Figuras 12A e 12B representam a distribuição de tamanhos dos lipossomos DPPG-POPG, sendo que na Figura 12A, cada cor é referente a uma das 5 análises e a Figura 12B representa a média das 5. Observa-se que a maior quantidade de lipossomos tem o tamanho da ordem de 167 nm, mas existem outras populações que tem tamanhos até 1079 nm, de forma que a média de tamanho dessa partícula é 222,8 nm e a concentração é  $6,59 \times 10^{10}$  partículas mL<sup>-1</sup>.

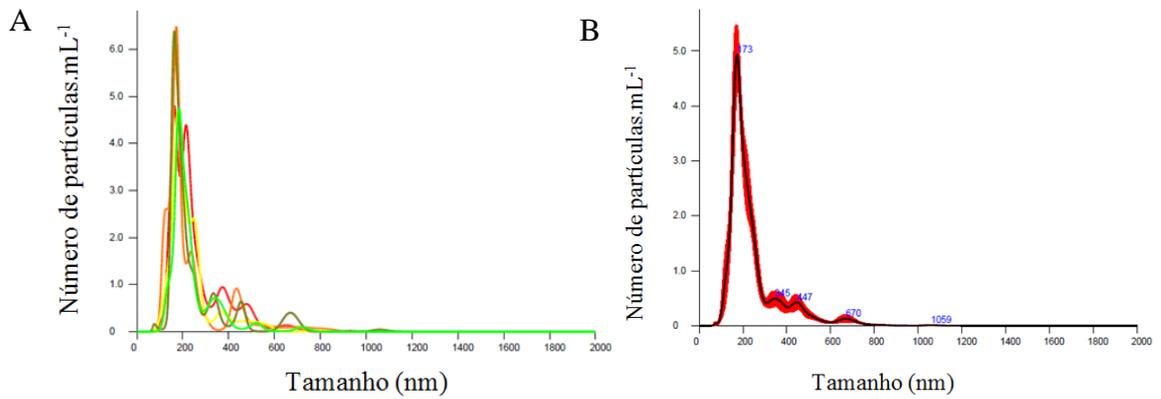
Nas Figuras 13A e 13B podemos ver a distribuição de tamanho dos lipossomos contendo emodin DPPG-POPG-EM. Neste caso o maior número de partículas mede 172,6 nm, com tamanhos até 1059 nm, média de 243,3 nm e a concentração é em torno de  $5,42 \times 10^{10}$  partículas.mL<sup>-1</sup>. Trabalhos na literatura mostram que o tamanho de lipossomos formados apenas por DPPG estão entre 150 e 300 nm,<sup>55</sup> assim os obtidos neste trabalho com e sem a emodina estão dentro do valor esperado. O aumento do tamanho do lipossomo com emodina pode estar relacionado à presença do fármaco em sua estrutura. A partir dessas análises os lipossomos foram então empregados na construção dos filmes LbL. A Tabela 1 resume os valores obtidos por NTA.

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.



Fonte: Elaborado pelo autor

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.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 1 – Valores de moda, média e concentração dos lipossomos obtidos por NTA.

	Moda (nm)	Média (nm)	Concentração (partículas.mL <sup>-1</sup> )
DPPG-POPG	167,5 +/-6,2	222,8 +/-3,8	6,59 x 10 <sup>10</sup> +/- 3,36 x 10 <sup>9</sup>
DPPG-POPG-EM	172,6 +/-4,3	243,3 +/-4,7	5,42 x 10 <sup>10</sup> +/- 3,57 x 10 <sup>9</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.5.2. Solução de emodina

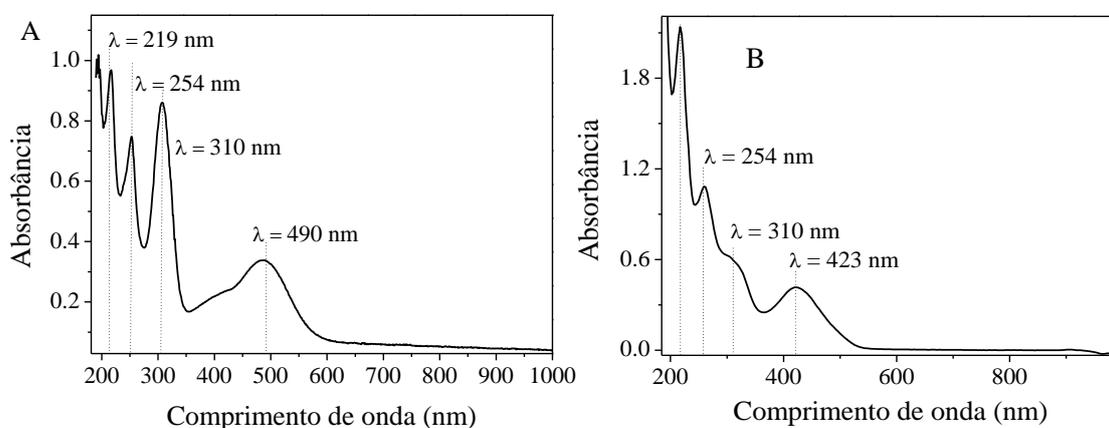
Antes da fabricação dos filmes LbL a emodina foi preparada em diferentes solventes e analisada por UV-vis para obter seu espectro puro. É conhecido que a emodina é mais solúvel em solventes orgânicos como etanol, metanol, clorofórmio, acetona, etc., e pouco solúvel em água.<sup>56</sup> Dessa forma ela foi solubilizada em misturas de etanol/tampão fosfato em pH 8 e etanol/água. Os espectros UV-vis das duas soluções estão apresentados nas Figuras 14A e 14B com as quatro principais bandas de absorção em 219 nm, 254 nm, 310 nm e 423/490 nm relacionadas às transições do tipo  $\pi - \pi^*$ , na concentração de 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de emodina. A banda na região de 423/490 nm é associada à transição dos grupos fenólicos e aos grupos carbonila, responsáveis pela absorção no espectro visível.

A emodina fica facilmente deprotonada em solução polar água-etanol e em solução alcalina, protonada em solução ácida e encontra-se nas duas formas em pH neutro. Segundo Cunha,<sup>56</sup> a absorvância da emodina na região do visível varia conforme o seu estado de protonação, ou seja, desloca de valores menores para maiores do estado protonado para deprotonado. Por isso a banda do espectro visível varia entre 423 a 490 nm como pode ser

visto nas Figuras 14A e 14B. Assim, é possível supor que a emodina preparada em etanol/tampão em pH 8, com banda em 490 nm esta deprotonada e com carga negativa, o que pode ser importante para a fabricação dos filmes LbL e interação com o polieletrólito de carga oposta.

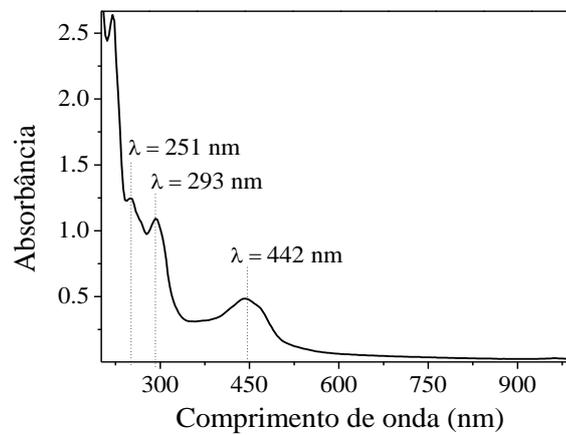
No espectro UV-vis da emodina incorporada em lipossomos, DPPG-POPG-EM, como pode ser visto na Figura 15, a banda na região visível encontra-se em 443 nm, indicando um estado intermediário de protonação. Todavia, como o lipossomo é uma estrutura grande, de aproximadamente 200-300 nm e acredita-se que a emodina possa estar encapsulada em seu interior, o seu estado de protonação não é relevante para a fabricação do filme, pois o lipossomo é que irá interagir com o polieletrólito de carga oposta.

Figura 14 - Espectro UV-vis de solução de emodina em (A) tampão/etanol e (B) água/etanol.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Espectro UV-vis da solução de lipossomos DPPG-POPG-EM

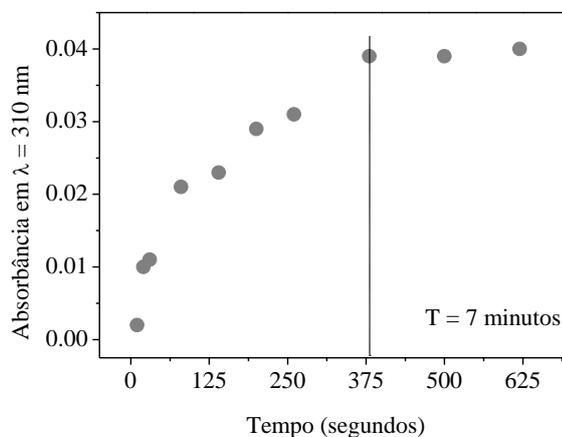


Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.5.3. Fabricação do filme $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_n$

Estudos de cinética de adsorção em função do tempo são feitos para determinar quanto tempo é necessário que o substrato fique mergulhado na solução do material de interesse e haja a adsorção com maior eficiência. Alguns materiais necessitam de tempos mais longos, enquanto outros, mais curtos. Assim, manteve-se o tempo de adsorção para o PEI que já é estabelecido na literatura <sup>57</sup> e variou-se apenas o tempo da emodina. A variação do tempo a cada ciclo é somada, de forma a obter o gráfico da absorbância em função do tempo, como ilustrado na Figura 16. Há um aumento da absorbância em 310 nm até 380 segundos (6,33 minutos) seguidos da estabilização, o que significa que após 7 minutos não há mais deposição de material sobre o substrato. Desta forma, este foi o tempo adotado para a construção dos filmes de emodina e polieletrólito.

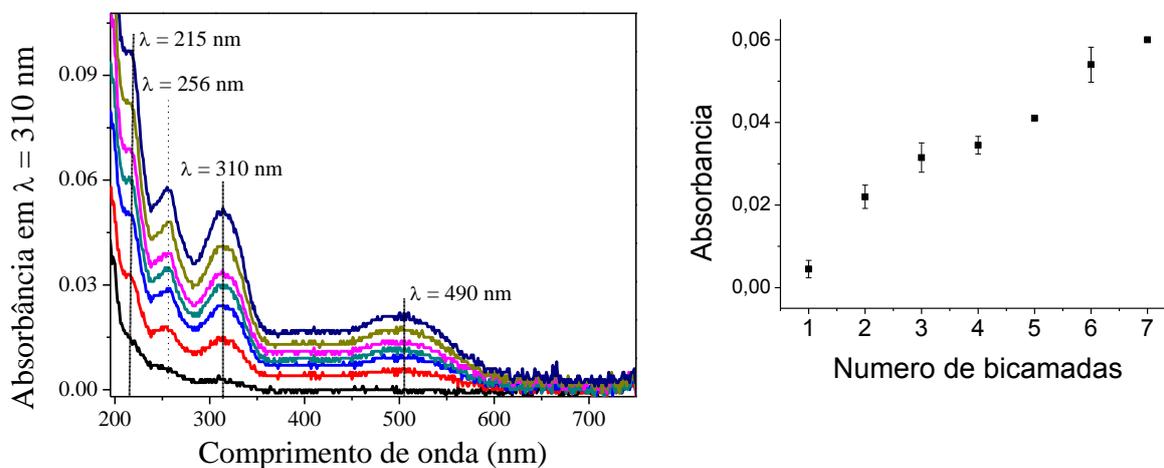
Figura 16 - Cinética de adsorção da emodina em filme LbL alternada com PEI



Fonte: Elaborado pelo autor

O processo de adsorção da emodina em filmes LbL foi monitorado por espectroscopia UV-vis. Como ilustra a Figura 17, para o filme  $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$  a cada bicamada depositada há um aumento na absorbância indicando o aumento da quantidade de emodina presente no filme. O filme apresenta as mesmas bandas de absorção da emodina em solução, indicando o sucesso na deposição. Apesar da deposição de material não seguir um regime linear, pode-se notar que nos 7 ciclos de deposição houve um aumento da absorbância indicando aumento da quantidade de material no filme. O crescimento do filme estabilizou na 7ª bicamada, após isso a absorbância não aumentou mais.

Figura 17 – Espectros UV-vis de cada bicamada do filme  $(PE/PVS)_2(PEI/EM)_7$  e absorvância em 310 nm em função do número de bicamadas.



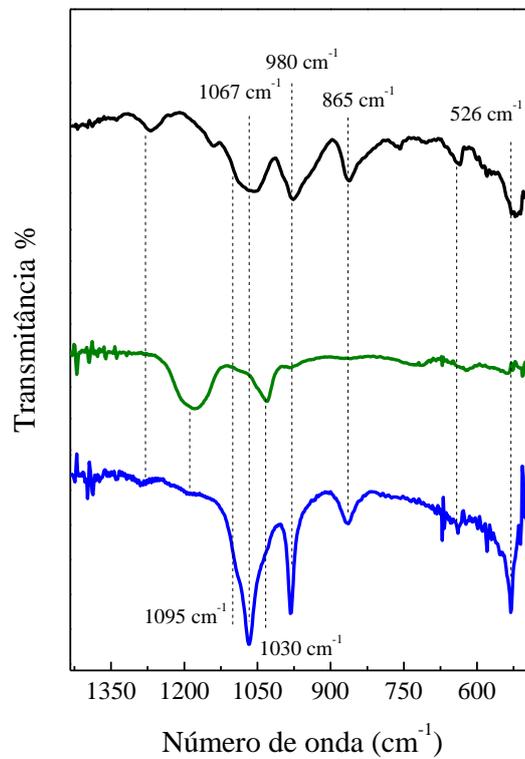
Fonte: Adaptado de Campos et al.<sup>14</sup>

O filme LbL  $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$  foi caracterizado por espectroscopia FTIR para confirmar a presença da emodina e obter informações sobre a interação dos materiais no filme. Sobre o silício foram preparados filmes LbL de polieletrólitos  $(PEI/PVS)_{10}$  e um filme de emodina pelo método *drop casting*. A linha de base para a análise foi realizada com o silício limpo. A Figura 18 ilustra os espectros para os três filmes. O espectro da emodina pura apresenta os picos em 1095, 1060, 980, 865 e 526  $\text{cm}^{-1}$  relacionados à vibração  $\delta$  C-C e C-H fora do plano do anel,<sup>58,59</sup> enquanto o filme  $(PEI/PVS)_{10}$  nessa região apresenta os picos em 1180 e 1030  $\text{cm}^{-1}$  relacionados a vibração do  $\delta$  C-C do PEI e estiramento simétrico do grupo v-sim SO do PVS.<sup>57,60,61</sup> O espectro do filme  $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$  apresenta predominantemente as bandas da emodina em 980  $\text{cm}^{-1}$ , 865  $\text{cm}^{-1}$  e 526  $\text{cm}^{-1}$ . Na região entre 1100 e 1020  $\text{cm}^{-1}$  aparece uma banda alargada resultante da soma do pico do PVS em 1030  $\text{cm}^{-1}$  e da emodina em 1095 e 1060  $\text{cm}^{-1}$ , ela também aparece mais intensa na região de 1067  $\text{cm}^{-1}$  que normalmente é associada a vibração do grupo C-O. A interação entre os materiais no filme pode estar ocorrendo entre o oxigênio da emodina e o grupo  $\text{NH}^+$  do PEI o que resulta

na alteração da intensidade da vibração do grupo C-O da emodina. O pico do PVS em  $1180\text{ cm}^{-1}$  que aparece no filme  $(\text{PEI/PVS})_{10}$  não aparece no  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_{10}$  pois o primeiro tem 10 camadas do polímero e o segundo apenas 2. Todos os picos e atribuições estão resumidos na Tabela 2.

Figura 18 – Espectro infravermelho do filme *cast* de emodina e dos filmes LbL  $(\text{PEI/PVS})_2$  e

$(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$



Fonte: Adaptado de Campos et al. <sup>14</sup>

Tabela 2 - Atribuições das bandas observadas no espectro FTIR dos filmes: *cast* de emodina e LbL do  $(PEI/PVS)_2$  e  $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$ .

Bandas da emodina ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bandas do filme $(PEI/PVS)_2$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bandas do filme $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições
526		526	$\delta$ -fora do plano C-C dos anéis aromáticos <sup>59</sup>
865		865	$\delta$ -fora do plano C-H e C-C <sup>59,62</sup>
980		980	$\delta$ - no plano do C-H anel <sup>59</sup>
	1030	1030	$\delta$ C-C do PEI <sup>57</sup>
1065		1065	$\delta$ -fora do plano C-C no anel <sup>58</sup>
	1180		v-sim SO do PVS <sup>58</sup>

Fonte: Adaptado de Campos et al. <sup>14</sup>

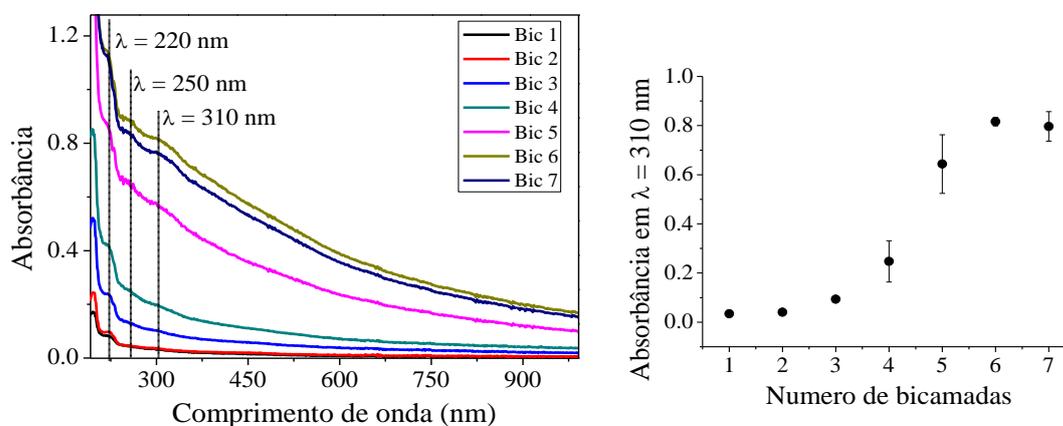
#### 3.5.4. Fabricação do filme $(PEI/PVS)_2(PEI/DPPG-POPG-EM)_n$

Os lipossomos já são conhecidos por sua capacidade de carrear fármacos e modular a liberação pela temperatura. Assim, nesta etapa do trabalho foram incluídos no filme LbL encapsulando emodina. Foram usados DPPG e POPG que apresentam carga externa negativa e assim puderam ser intercalados com um polieletrólito de carga positiva, o PEI.

O processo de deposição do filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  monitorado por UV-vis está ilustrado na Figura 19. Podemos observar que as três bandas de absorção da emodina, 220 nm, 250 nm e 310 nm aparecem, evidenciando a presença do fármaco no filme. Porém, a banda na região do visível não fica aparente. Isto é devido à característica de espalhamento de luz pela presença dos lipossomos, fato também observado em trabalhos anteriores e nas análises de NTA.

A deposição das bicamadas pode ocorrer de forma linear ou exponencial e o regime está relacionado ao pH, temperatura, força iônica das soluções de preparo <sup>63</sup> e natureza, morfologia e tamanho das partículas. O filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  apresentou um regime de crescimento exponencial, sendo que nas três primeiras bicamadas a adsorção não foi tão acentuada como foi entre a quarta até a sexta e a partir da sexta a deposição estabilizou, não adsorvendo mais material. O crescimento exponencial pode ser devido ao lipossomo ser relativamente grande (200-300 nm) o que acarreta em uma distribuição heterogênea do lipossomo sobre o substrato. É provável que o processo de deposição não seja exatamente como idealizado no qual uma camada de PEI recobre o substrato inteiro e outra de lipossomo respectivamente, mas sim, que haja o recobrimento de algumas partes, resultando na imobilização de uma maior quantidade de material em algumas bicamadas mais do que em outras.

Figura 19 – (A) Espectros UV-vis de cada bicamada do filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$ . (B) absorvância em 310 nm em função do número de bicamadas

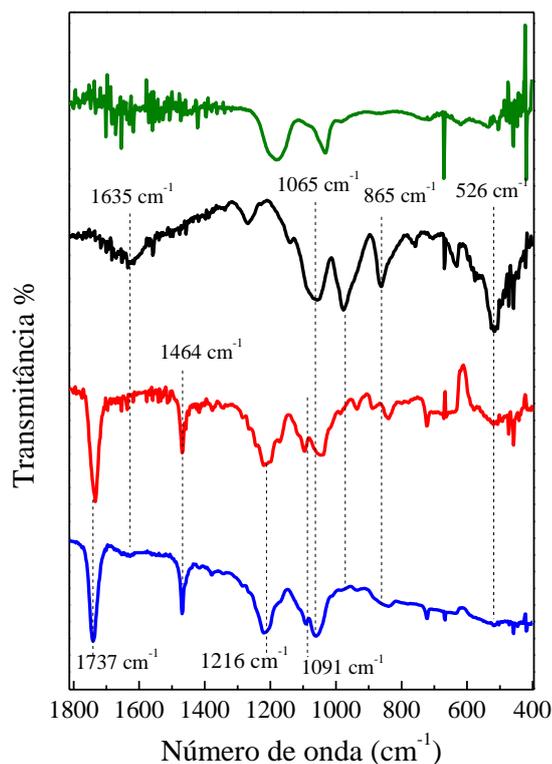


Fonte: Adaptado de Campos et al.<sup>14</sup>

Assim como o filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$  o  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  foi analisado por espectroscopia FTIR. A solução de lipossomos puros DPPG-POPG foi depositada no silício pelo método *casting*, e comparada com os espectros já citados anteriormente de  $(\text{PEI/PVS})_{10}$  e emodina pura. Na Figura 20 estão as principais bandas dos polieletrólitos, emodina, lipossomos e filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$ .

Os picos da emodina e dos polieletrólitos já foram discutidos na Seção anterior. Os lipossomos DPPG/POPG exibiram picos característicos em 1737, 1464, 1216 e 1091  $\text{cm}^{-1}$  relacionados ao estiramento dos grupos carboxílicos,  $\nu$  C-H,  $\nu$ -ass do grupo fosfato e  $\nu$ -sim do grupo C-O-C respectivamente.<sup>50,64</sup> Os picos da emodina em 1635, 865 e 526  $\text{cm}^{-1}$  aparecem no filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  mas a maior parte das bandas são provenientes dos lipossomos que são estruturas grandes e estão presentes em maior quantidade. Os picos em 1065 e 526  $\text{cm}^{-1}$  aparecem alongados no filme em comparação aos materiais puros, que são causados pela soma dos espectros da emodina e do lipossomo que ocorrem na mesma região. Assim, fica comprovado a presença de ambos os materiais na estrutura do filme LbL. Os picos dos espectros de infravermelho estão listados na Tabela 3.

Figura 20 - Espectro infravermelho dos filmes *cast* da emodina (preto), de lipossomos DPPG/POPG (vermelho) e dos filmes LbL de polieletrólitos (PEI/PVS)<sub>10</sub> (verde) e (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> (azul).



Fonte: Adaptado de Campos et al. <sup>14</sup>

Tabela 3 - Atribuições das bandas observadas no espectro FTIR dos filmes *cast* de emodina, lipossomos DPPG/POPG e LbL de polieletrólito (PEI/PVS)<sub>2</sub> e (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub>.

Bandas da emodina (cm <sup>-1</sup> )	Bandas do DPPG/POPG (cm <sup>-1</sup> )	Bandas do (PEI/PVS) <sub>2</sub> (PEI/ DPPG-POPG- EM) <sub>7</sub> (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
526		526	δ-fora do plano

			C-C dos anéis aromáticos <sup>59</sup>
865		865	δ-fora do plano C-H e C-C <sup>59,62</sup>
	1065	1065	v-sim C-O-C <sup>64</sup>
	1091	1091	v-ass fosfato <sup>64</sup>
	1216	1216	v-ass fosfato <sup>64</sup>
	1464	1464	v C-H <sup>50</sup>
1635		1635	v benzil <sup>62</sup>
	1737	1737	v carboxílico <sup>50</sup>

Fonte: Adaptado de Campos et al.<sup>14</sup>

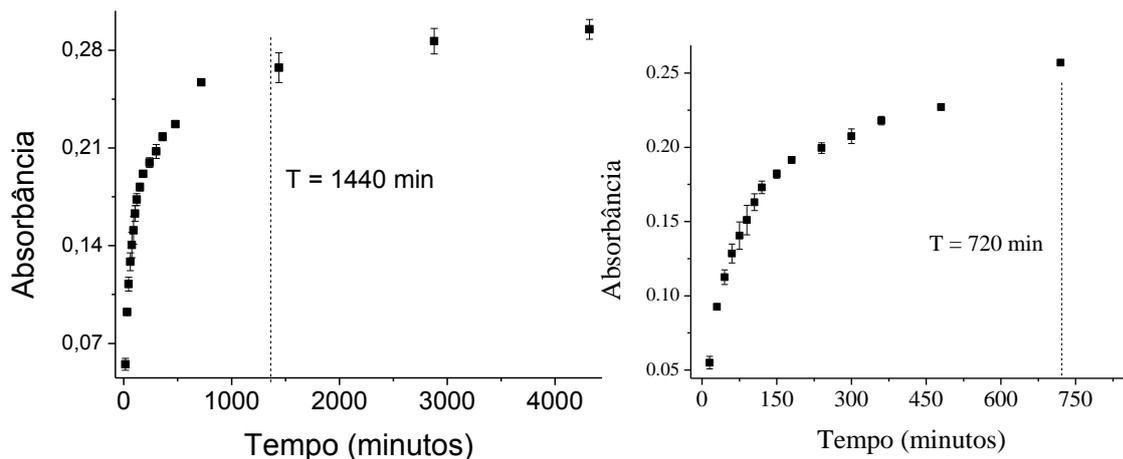
### 3.5.5. Teste de liberação

Para verificar a capacidade de liberação da emodina a partir dos filmes (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>7</sub> e (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> foi preparado o sistema como consta na Seção 2.4.5. (Liberação dos filmes). Os filmes foram colocados dentro suporte envolvido com a membrana e as soluções externas provenientes das liberações foram analisadas por UV-vis em 310 nm. Cada ponto das Figuras 21 e 22 correspondem a absorbância de cada solução nos tempo de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 480, 720, 1440, 2880, 4320 e 5760 minutos para os filmes (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>7</sub>, e 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720, 1440, 2880, 4320, 5760 e 7200 minutos para (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub>. Não foram realizadas medidas por UV-vis diretamente nos filmes, pois no caso do (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> os lipossomos podem

continuar presentes no substrato, dando uma alta absorbância devido ao espalhamento e não pela presença da emodina no filme.

A Figura 21 indica que com aproximadamente 1440 minutos (24 horas) a liberação da emodina dos filmes  $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$  fica estável. Assim, ampliando o gráfico até 720 minutos vemos que até 120 minutos a liberação segue uma tendência e que a partir deste momento há uma diminuição da taxa de liberação. Porém ainda assim, a liberação se mantém em 720 minutos (12 horas).

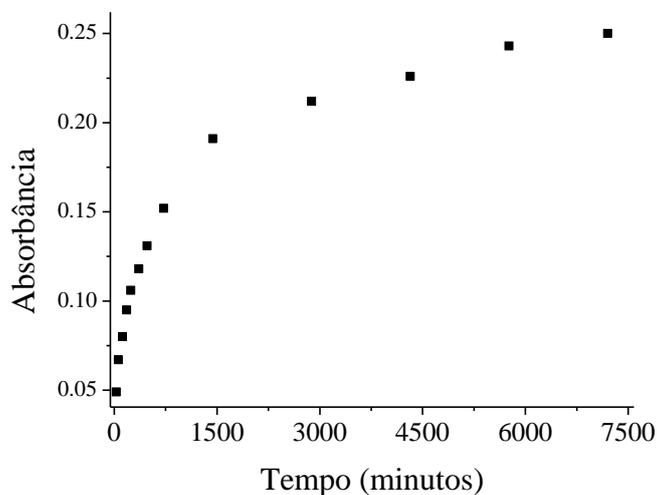
Figura 21 - Somatória da absorbância das soluções provenientes do filme  $(PEI/PVS)_2(PEI/EM)_7$  ao longo do tempo. À esquerda o gráfico completo e a direita um aumento até 720 minutos.



Fonte: Adaptado de Campos et al. <sup>14</sup>

A Figura 22 apresenta a absorbância das soluções provenientes dos filmes  $(PEI/PVS)_2(PEI/DPPG-POPG-EM)_7$  em função do tempo. Neste caso, em 1440 minutos também há uma pequena mudança na taxa de liberação, sendo mais expressiva até esse ponto. A partir disso uma menor quantidade de emodina é liberada, mas o processo ainda ocorre até 5760 horas (4 dias).

Figura 22 - Somatória da absorbância das soluções provenientes do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> ao longo do tempo.



Fonte: Adaptado de Campos et al. <sup>14</sup>

A diferença entre o perfil de liberação dos sistemas é relacionada a interação que ocorre entre a emodina e os materiais no filme. No caso do (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>7</sub> a interação que ocorre é entre o grupo OH<sup>-</sup> e o grupo amina do PEI, que com a mudança de pH da fabricação e liberação, pH 8,0 e 7,4 respectivamente, essa carga é diminuída e o filme se desmonta mais rapidamente, uma vez que a emodina tem o pKa<sub>1</sub>=8 e pKa<sub>2</sub>=10,9. <sup>56</sup> No filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> a emodina está incorporada no lipossomo e fica mais protegida contra as variações de pH, de forma a responder apenas á variação de temperatura, o que torna um pouco mais lento o processo. Isto já era esperado pelo emprego dos fosfolípídios com temperaturas de transição vítrea diferentes, que resultam em um lipossomo com T<sub>v</sub> próxima a 37°C.

Nesse trabalho foi obtido tempo mais longo de liberação pelos filmes (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>7</sub> e (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> em condições fisiológicas, quando comparado ao de Wang et al <sup>38</sup> que usou um filme LbL de polialilamina hidroclorada com dextran (PAHD) e carboximetilcelulose de sódio (CMC) formando o filme LbL de

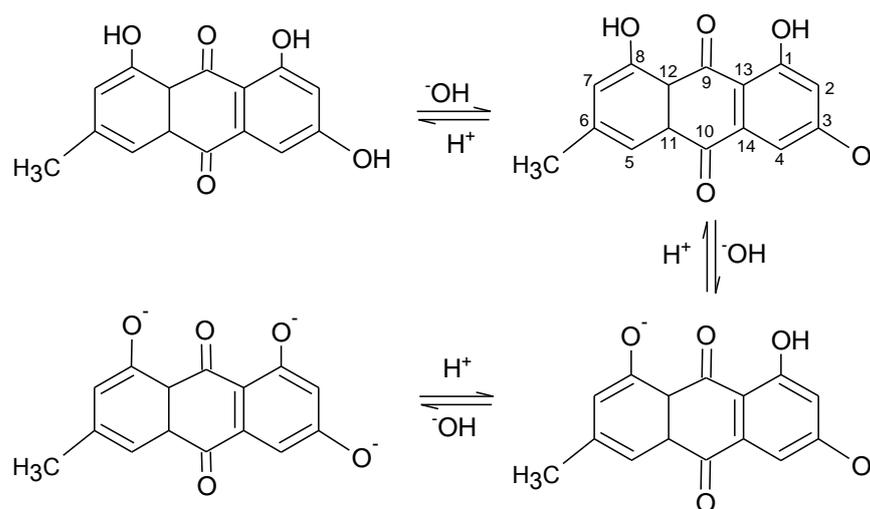
(PAHD/CMC)<sub>n</sub> como suporte para mergulhar em uma solução de emodina e ficar encharcado de fármaco. A liberação 100% deste filme ocorreu em 120 minutos, em solução de bicarbonato de sódio, mas não em água ou tampão PBS em condições fisiológicas.

Assim, os dois filmes fabricados neste trabalho promoveram a liberação da emodina de forma eficiente e apesar da diferença de tempo entre eles, ambos podem ser aplicados a sistemas de liberação com variação de pH ou temperatura.

### 3.5.6. Estudos eletroquímicos

Estudos eletroquímicos do (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>7</sub> e (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> podem dar informações relevantes sobre as características de oxidação/redução da emodina presente nos filmes em função do pH. De acordo com Pal e Jana<sup>65</sup>, a molécula de emodina pode ficar deprotonada nas posições do carbono 8, 3 e 1 conforme aumenta o pH, como indicado na Figura 23.

Figura 23 – Mudanças da estrutura da emodina com a mudança de pH.



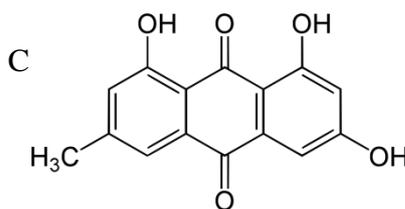
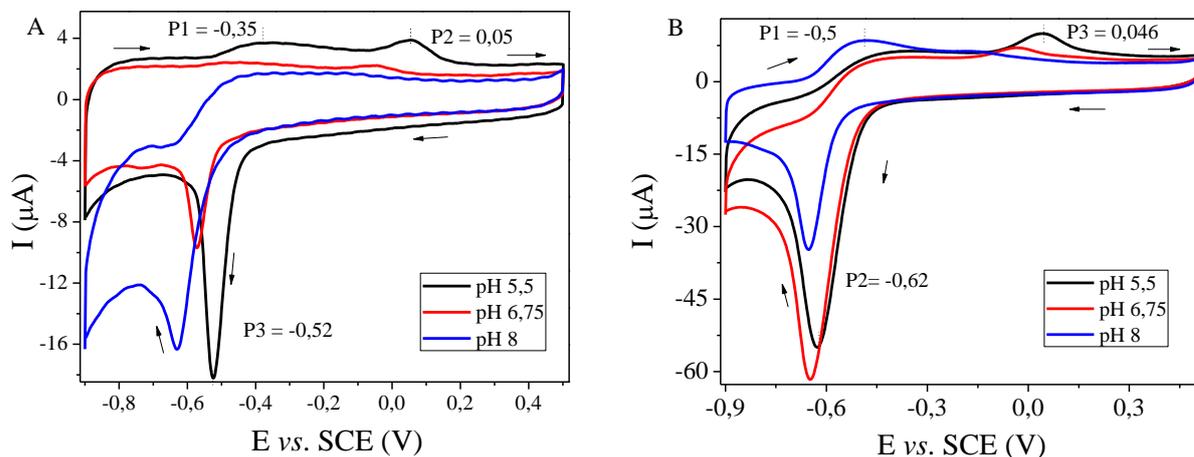
Fonte: Adaptado de Jana e Pal.<sup>65</sup>

As Figuras 24A, 24B e 25C mostram os voltamogramas cíclicos dos filmes  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$  e  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  realizados a  $100 \text{ mV.s}^{-1}$  e a estrutura química da emodina. O filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$  em pH 5,5 exibe os três picos característicos da emodina que são o P1 e P2 do par redox quase-reversível e o P3 do pico anódico irreversível.<sup>66</sup> O P1 e P3 são relacionados ao processo de oxidação enquanto o P2 corresponde ao processo de redução.<sup>67</sup> Neste valor de pH e abaixo a emodina é mais protonada e assim apresenta os três picos, em pH 6,7 os picos de oxidação são menos evidentes e em pH 8 os picos de oxidação desaparecem, indicando aumento de deprotonação da emodina proporcional ao pH no qual os filmes estão. A emodina é conhecida por ser um ácido fraco, ou seja, perde prótons para formar ânions. Considerando a aplicação dos filmes de emodina em sistemas transdérmicos, é conhecido que ácidos fracos apresentam maior dificuldade de difusão nas membranas celulares quando estão deprotonado, assim deduz-se que o filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$  quando em contato com a pele que possui caráter ácido (abaixo de pH 5) terá mais chance de atravessar a membrana celular e agir dentro da célula.

14,68,69

A voltametria cíclica do filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  em pH 5,5 exibe os picos P2 e P3, mas não o P1, enquanto em pH 8 o P1 aparece, contrário ao filme anterior. Os lipossomos são preparados em água, resultando em um estado de protonação diferente, como mencionado na Seção 2.5.2 (Solução de emodina). A incorporação da emodina no lipossomo altera o comportamento dentro da estrutura, e assim, como foi visto nos testes de liberação, a emodina não sofre com a alteração do pH.

Figura 24 – Voltametria cíclica dos filmes (A) (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>7</sub> e (B) (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/DPPG-POPG-EM)<sub>7</sub> em tampão fosfato de sódio com valores de pH de 5,5, 6,75 e 8 e velocidade de varredura de 100 mV.s<sup>-1</sup>. (C) Estrutura química da emodina.

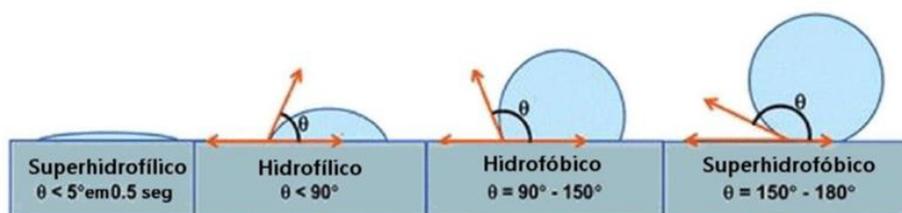


Fonte: Adaptado de Campos et al.<sup>14</sup>

### 3.5.7. Estudo de superfície

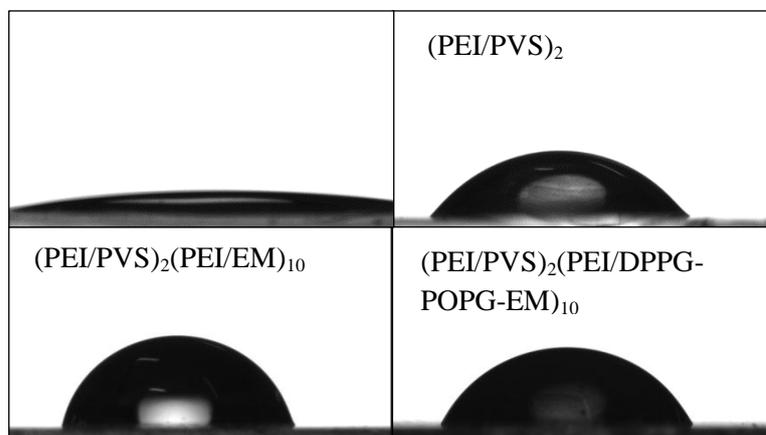
O ângulo de contato é uma técnica interessante para estudar a interação entre uma superfície em um líquido. Através dela pode-se determinar se a superfície de um material é hidrofílica ou hidrofóbica. A técnica consiste em pingar uma gota sobre a superfície, de água, por exemplo, e medir o ângulo formado. Se o ângulo for até 5° a superfície é considerada superhidrofílica, até 90° hidrofílica, entre 90 e 150° hidrofóbica e entre 150 e 180° superhidrofóbica, como esquematizado na Figura 25.

Figura 25 - Representação da formação da gota sobre as superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas.



Em aplicações biomédicas as características superficiais dos materiais tem grande influência na biocompatibilidade, pois afeta diretamente o desenvolvimento das células que estão em contato. Em particular, um alto grau de molhabilidade da superfície facilita a adesão e multiplicação celular ajudando no reparo de tecido cutâneo, sendo o oposto para materiais hidrofóbicos que atrapalham a cura do tecido lesado. Desta forma, foi verificado o ângulo de contato dos filmes  $(\text{PEI/PVS})_2$ ,  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$  e  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  a fim de correlacionar o grau de molhabilidade com a superfície dos filmes. Na Figura 26 estão as fotos da gota de água sobre o vidro hidrofílico e sobre os filmes  $(\text{PEI/PVS})_2$ ,  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$  e  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  com seus respectivos ângulos de contato. Sobre o vidro não há formação da gota, como já era esperado, por ter sido submetido ao processo de hidrofilição descrito na Seção 2.4.3 (Limpeza dos substratos). Após a adsorção dos polieletrólitos  $(\text{PEI/PVS})_2$  o ângulo de contato passa a ser  $80,75^\circ \pm 0,872$ , no filme de emodina  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$   $86,15^\circ \pm 1,12$  e  $84,34^\circ \pm 0,737$  para o  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$ . Esse aumento pode ser devido à presença da emodina na superfície do filme que não é totalmente solúvel em água ou no caso do filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  pode ter uma parcela de emodina na superfície do lipossomo e causar essa alteração. Também pode estar relacionado à superfície rugosa normalmente associada aos filmes LbL,<sup>22</sup> pois é conhecido que quanto maior a rugosidade da superfície maior é o ângulo de contato.<sup>70</sup>

Figura 26 – Perfil de gotas de água deionizada sobre o vidro hidrofílico e os filmes LbL  $(\text{PEI/PVS})_2$ ,  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_{10}$  e  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_{10}$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

O desenvolvimento celular é favorecido em superfícies moderadamente molháveis com valores de ângulos de contato entre  $48$  e  $62^\circ$ , quando comparado á superfícies mais hidrofóbicas ( $>80^\circ$ ) ou mais hidrofílicas ( $<35^\circ$ ).<sup>71</sup> Desta forma, os filmes  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$  e  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  podem ser aprimorados nesse quesito para aplicações biomédicas, visto que estão acima da faixa considerada ideal. Isso pode ser feito em trabalhos futuros estudando a rugosidade do filme em função do número de bicamadas, pois esses dois parâmetros estão relacionados,<sup>22</sup> e conferindo se há alteração na molhabilidade ou investindo em outros tipos de recobrimento sobre os filmes LbL.

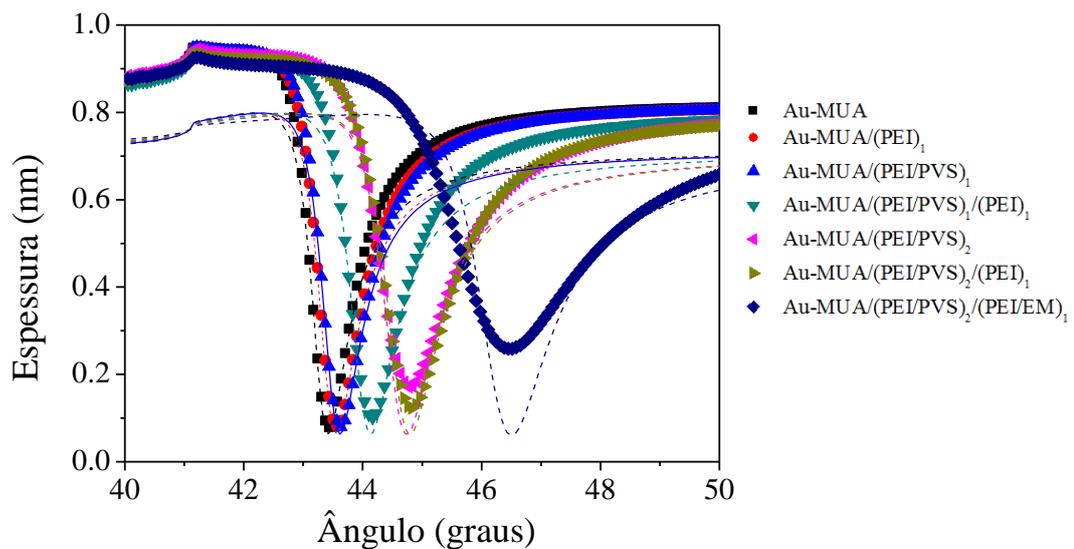
### 3.5.8. Análises por SPR

A Ressonância Plasmônica de Superfície é um fenômeno que acontece quando um feixe de luz polarizado atinge uma camada condutora de um metal nobre. A um ângulo determinado ocorre a excitação dos plasmons, resultando na diminuição da intensidade de luz

refletida, o que gera a curva angular obtida pela técnica. O SPR é afetado pela constante dielétrica do meio ( $\epsilon$ ) e, portanto, pelo índice de refração ( $n$ ), uma vez que estão relacionados pela expressão  $\epsilon = n^2$ . A adsorção de moléculas sobre a superfície destas nanoestruturas resulta em mudanças no índice de refração próximo à superfície do metal e como consequência o sinal ocorrerá em uma frequência diferente.<sup>72</sup>

A técnica SPR é interessante por permitir a determinação simultânea da espessura e índice de refração de filmes orgânicos ultrafinos, principalmente em valores pequenos entre 0,1 a 10 nm, difíceis de detectar por outras técnicas.<sup>54</sup> O filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_1$  foi analisado a cada camada depositada resultando em uma curva angular para cada etapa do processo, que podem ser visualizadas na Figura 27. O ângulo mínimo da refletividade foi deslocado para valores maiores a cada camada depositada devido ao aumento da espessura do filme.

Figura 27 – Curvas angulares de SPR do filme  $\text{Au-MUA}/(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_1$  a cada etapa de fabricação. Pontos e linhas tracejadas indicam resultados experimentais e curvas simuladas, respectivamente.



A Figura 28 apresenta as curvas  $d - n$  obtidos com lasers de 670 e 785 nm para cada camada do filme Au-MUA/(PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>1</sub>. Foram atribuídos valores para  $n$  entre 1,2 a 1,6 resultando em diferentes valores de espessura para cada valor de  $n$ . O ponto de intersecção das curvas  $d - n$  para os dois comprimentos de onda representa a  $d$  e o  $n$  para camada. Nos casos em que não houve intersecção, uma das curvas foi deslocada conforme descrita na Seção 2.4.6 (Instrumentação).

A Tabela 4 apresenta os valores de espessura e  $n$  para cada camada. Pode-se notar uma variação na espessura das camadas de alguns nanômetros sugerindo um crescimento heterogêneo do filme. A espessura não é relacionada somente com a quantidade de material depositado, mas também com a forma com que o material se acomoda na superfície. Já é conhecido que as cadeias poliméricas podem interpenetrar-se umas às outras, e que o padrão de deposição pode variar com a densidade de carga do polímero, pH das soluções, força iônica e temperatura resultando em camadas mais compactas ou menos densas.<sup>73,74</sup>

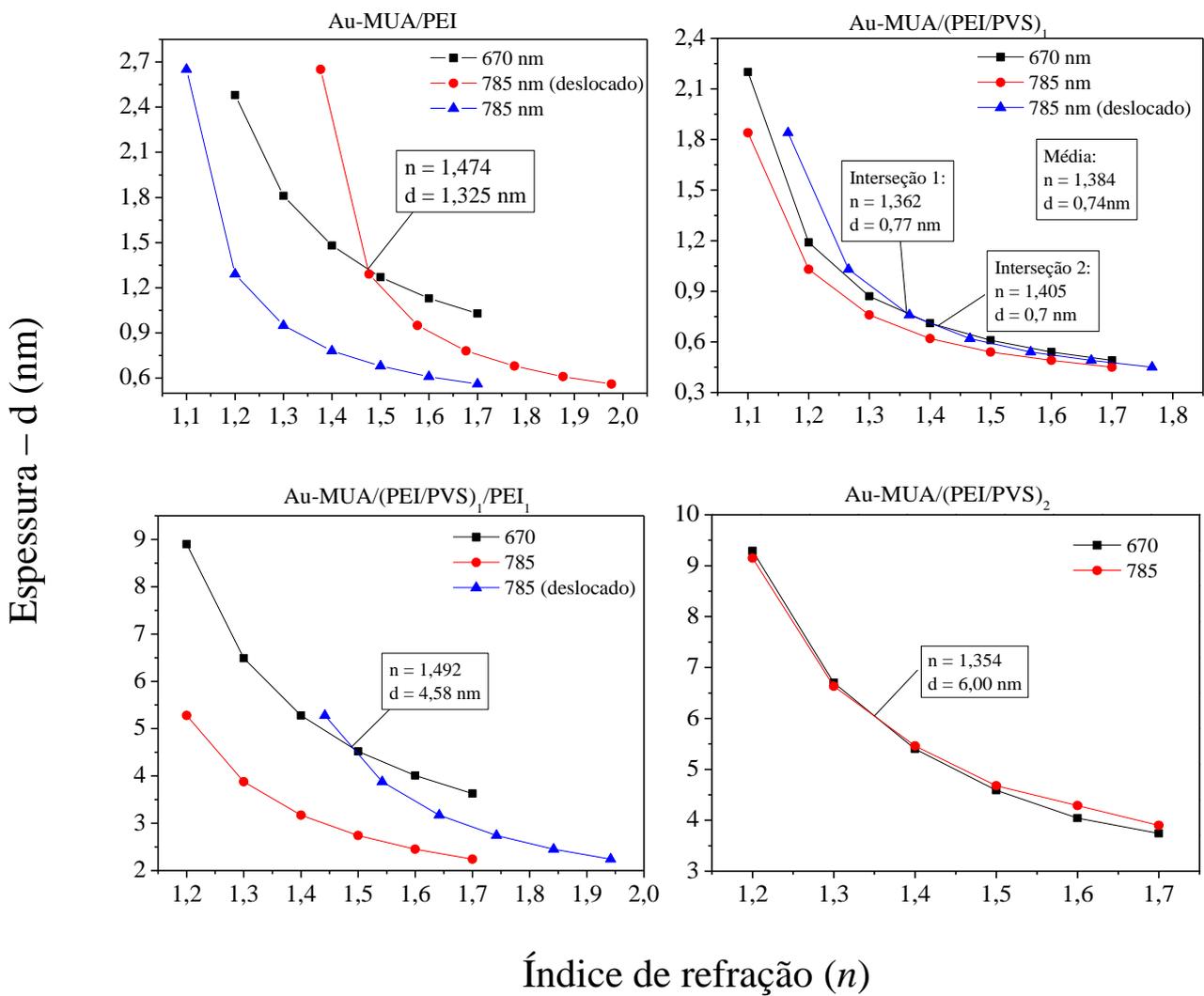
A somatória da espessura das três bicamadas resultou em 25,1 nm, que é um valor típico de filmes nanoestruturados, enquanto os valores do índice de refração foram coerentes para a camada de PEI na faixa de 1,4 e do PVS de 1,3, similar a valores previamente reportados na literatura.<sup>75,76</sup>

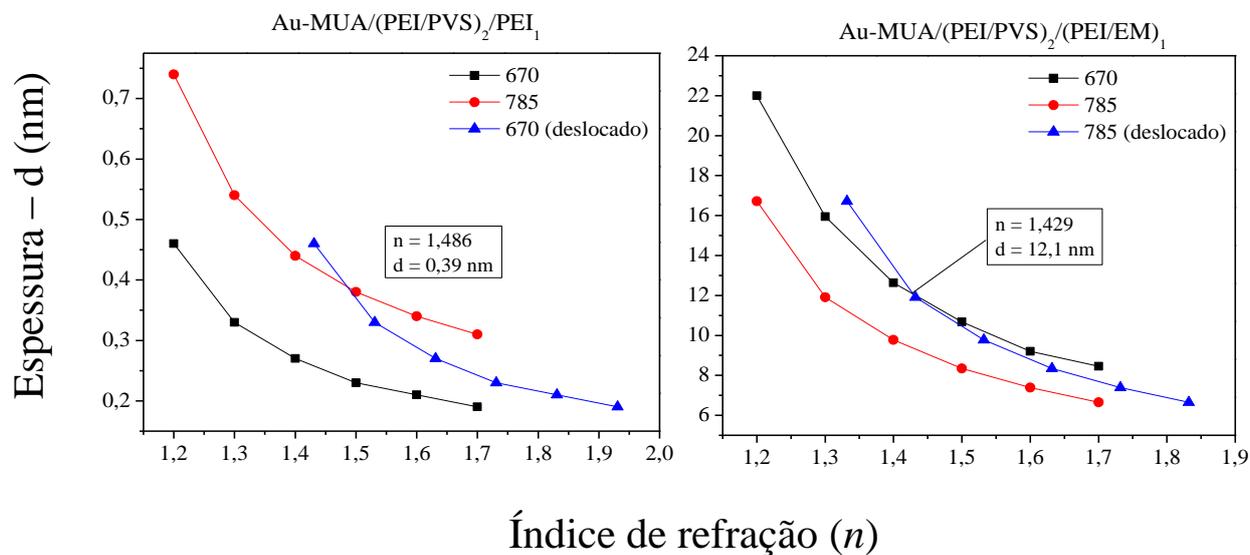
Tabela 4 - Espessura e índice de refração de cada camada do filme AU-MUA(PEI/PVS)<sub>2</sub>(PEI/EM)<sub>1</sub>.

Camada	Espessura (nm)	n
PEI <sub>1</sub>	1,325	1,474
PVS <sub>1</sub>	0,74	1,384
PEI <sub>2</sub>	4,58	1,492
PVS <sub>2</sub>	6,00	1,354

PEI <sub>3</sub>	0,39	1,486
EM <sub>1</sub>	12,1	1,429
TOTAL	25,1	-

Figura 28 – Determinação do índice de refração e da espessura de cada camada do filme Au-MUA/(PEI/PVS)<sub>2</sub>/(PEI/EM)<sub>1</sub> através da intersecção das curvas  $d - n$  para cada camada.





### 3.6. Conclusão

As análises de rastreamento de nanopartículas indicaram que foram obtidos lipossomos a partir da mistura de fosfolipídios DPPG/POPG e DPPG/POPG com emodina encapsulada que puderam ser empregados na construção dos filmes LbL. O diâmetro médio do DPPG-POPG-EM aumentou em relação ao DPPG-POPG puro devido à presença do fármaco em sua estrutura.

Nos espectros de emodina preparada em solução de tampão/etanol, água/etanol e lipossomos observou-se diferentes estados de protonação da molécula. Um maior grau de deprotonação é encontrado para tampão/etanol, ficando mais protonada quando encapsulada em lipossomo seguido da preparação em água/etanol, de forma que a banda na região visível varia de 490, 442 e 423 nm respectivamente. Dessa forma, para os filmes de emodina e polieletrólito o ideal foi trabalhar em tampão/etanol em pH 8, mantendo o grau de protonação e a carga da molécula para interagir com a carga positiva do grupo amina do PEI e estar próximo ao pH fisiológico.

A imobilização da emodina com polieletrólitos e incorporada em lipossomos geraram os filmes LbL  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$  e  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$ , os quais foram depositados com eficiência, tendo um aumento da absorbância nas bandas respectivas da emodina para cada bicamada. Ambos os filmes foram eficientes no processo de liberação, sendo que o  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/EM})_7$  apresentou um decréscimo mais acentuado, enquanto o  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PEI/DPPG-POPG-EM})_7$  teve um perfil mais lento em função do tempo como resultado das interações da emodina com os materiais dos filmes.

Nos testes eletroquímicos foi possível correlacionar os picos de oxidação e redução da emodina nos filmes para pH 8, 6,7 e 5,5 e inferir que em o filme em pH 5,5 teria uma melhor absorção pelas células em aplicações transdérmicas. Enquanto nas análises de superfície, os filmes apresentam caráter mais hidrofóbico, o que pode ser aprimorado com estudos de rugosidade e outros tipos de recobrimento em trabalhos futuros. A encapsulação da emodina e imobilização no filme LbL resultou em um aumento do tempo de liberação em relação aos demais sistemas contendo o fármaco favorecendo o seu uso em períodos prolongados.

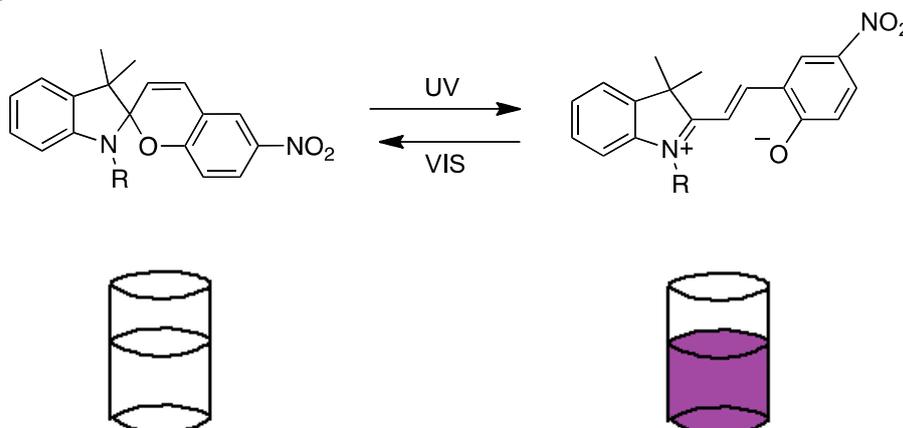
## Capítulo 3 – Filmes Layer-by-Layer de espiropirano

### 5.1. Introdução

Fotocromismo é um fenômeno no qual espécies químicas são convertidas durante a irradiação de luz entre duas formas que têm distintos espectros de absorção.<sup>77</sup> Vários tipos de moléculas fotoresponsivas são encontradas na literatura destacando os azobenzenos, estilbenos, diariletenos, fulgides e entre eles o espiropirano. Este tem a vantagem em relação aos outros de ser isomerizado reversivelmente com diferentes estímulos, como o uso de solventes, íons metálicos, pH, temperatura, potencial redox e força mecânica.<sup>9</sup>

O espiropirano (SP, do inglês *spiropyran*) é uma molécula composta pelos grupos benzopirano e indolina unidos, que quando recebe radiação UV, em  $\lambda = 365$  nm, dá origem ao isômero de anel aberto, a merocianina (MC, do inglês *merocyanine*), como esquematizado na Figura 29. O processo se dá na abertura entre a ligação C-O.<sup>9</sup> O espiropirano é incolor enquanto a merocianina tem uma forte absorbância na região de  $\lambda = 500$  a 620 nm, apresentando cor púrpura. A MC retorna espontaneamente para SP e o processo pode ser acelerado com a luz branca ou termicamente.<sup>9,78</sup>

Figura 29 - Mudança reversível entre a forma fechada espiropirano (SP) e aberta merocianina (MC) induzido por luz.



Fonte: Adaptado de Floreal *et al.*<sup>79</sup>

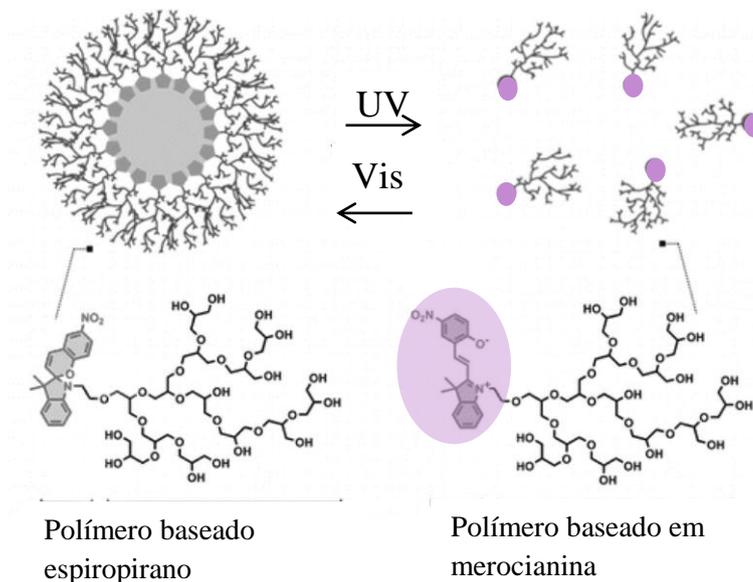
O espiropirano foi descoberto no início do século XX, mas seu comportamento fotocromico começou a ser observado em 1952 por Fisher e Hirshberg.<sup>9,79</sup> A partir disso, muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos pelas suas interessantes propriedades e tem sido a molécula mais popular da classe de compostos fotocromicos, com aplicação em diversas áreas como dispositivos de memória,<sup>80</sup> interruptores e monitores,<sup>81</sup> microválvulas,<sup>82</sup> sensores<sup>83</sup> e na área biológica como atividade enzimática,<sup>84</sup> polipeptídios fotocromicos,<sup>85</sup> incorporação de DNA<sup>86</sup>, entre outros.

Para facilitar o entendimento neste trabalho, o espiropirano foi abreviado para SP e a merocianina foi abreviada para MC e ambas se referem à mesma molécula, mudando apenas sua forma isomérica.

## 5.2. Revisão de literatura

Alguns trabalhos focam o uso da espiropirona em sistemas de liberação modificados. Son *et al.*, polimerizou a espiropirona na ponta de poligliceróis ramificados de forma que quando a molécula está na forma MC espontaneamente ou por receber luz branca, ela é convertida para SP, as porções hidrofóbicas tendem a se unir deixando o poliglicerol voltado para fora, formando uma micela. Irradiando a solução com luz UV a SP passa para MC, que representa sua forma zwitteriônica e polar, ocasionando a solubilização das cadeias poliméricas e assim o desarranjo da micela. Desse modo, o interior da micela pode conter um fármaco que será liberado somente com a irradiação da luz UV, formando um sistema de liberação inteligente.<sup>87</sup> A representação desse sistema está apresentado na Figura 30.

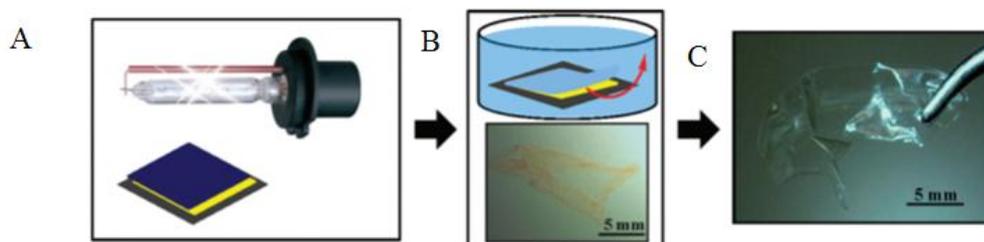
Figura 30 – Esquema de micelas compostas por SP sintetizadas em poligliceróis que se formam sob luz visível e desmancham em resposta à luz UV.



Fonte: Adaptado de Son *et al.*<sup>87</sup>

Li *et al.* fabricou um filme LbL no qual o SP foi incorporado no copolímero em bloco (poli(tert-butil acrilato-co-etil ácido acrilato-co-metacrilico) (SP-PTBEM) e então, intercalado com hidróxido duplo lamelar de MgAl (LDH, do inglês *Layered double hydroxide*), formando o filme (SP-PTBEM/LDHs)<sub>n</sub> que exibiu rápida transformação entre SP e MC sob ciclos de irradiação de luz branca e UV com fotoestabilidade e reversibilidade maior do que o SP-PTBEM em solução ou em filme formado por *drop-casting*. Também observou que sob luz UV o filme (SP-PTBEM/LDHs)<sub>n</sub> fica mais hidrofílico, enquanto sob luz branca mais hidrofóbico.<sup>78</sup> Em uma composição diferente, Pennakalathil *et al.*, fabricou filmes de poli(acrilato, merocyanine) (PMC) e de poli(cloreto de dialildimetilamoníaco) (PDADMAC) formando (PMC/PDADMAC)<sub>5</sub> de 5 bicamadas e sobre o filme depositou poli(sódio 4-stirenesulfonato) (PSS) e PDADMAC, formando o filme (PDADMAC/PSS)<sub>n</sub> com 25, 50 e 75 bicamadas, resultando na arquitetura final um filme (PMC/PDADMAC)<sub>5</sub>(PDADMAC/PSS)<sub>n</sub>. Em água e sob irradiação de luz branca o filme foi totalmente removido do substrato em segundos, como ilustrado na Figura 31.<sup>23</sup>

Figura 31 – (A) Esquema de irradiação por luz branca do filme (PMC/PDADMAC)<sub>5</sub>(PDADMAC/PSS)<sub>n</sub>. (B) Enxague do filme com água. (C) O filme após ser removido.



Fonte: Adaptado de Pennakalathil *et al.*<sup>23</sup>

Neste trabalho focamos na síntese de um polímero fotossensível com grupos de espiropirano (poli(SP-R)) e sua imobilização em substratos sólidos através da técnica LbL com capacidade de *disassemble* (desmontar) para aplicação em sistemas de liberação controlados pela luz. Os filmes foram montados após a exposição do polímero poli(SP-R) à luz UV para sua conversão à forma poli(MC-R) (aniônica) e intercalado com poli(alilamina hidroclorada) (PAH) (polication) formando o filme LbL (PAH/poli(SP-R))<sub>n</sub>. Diferente dos trabalhos citados anteriormente para LbL e liberação modificada com espiropirano, o filme (PAH/poli(SP-R))<sub>n</sub> focou em um período mais longo para liberação, em relação ao trabalho de Pennakalathil et al, por exemplo, em que um filme se desprende totalmente em 47 segundos, resultando em um sistema para aplicações que necessitam de um tempo prolongado. Este capítulo foi desenvolvido no laboratório Insight Centre for Data Analytics do grupo do Prof. Dr. Dermot Diamond, da Dublin City University (DCU), na Irlanda

### 5.3. Objetivos

Desenvolver um revestimento fotoresponsível para aplicação em sistemas de liberação que seja regulado pela luz, usando a técnica de fabricação de filmes LbL e do emprego de uma molécula fotoresponsiva. Os objetivos específicos para este trabalho são comparar as propriedades fotocromicas do monômero e polímero baseados em espiropirano SP-R/MC-R e poli(SP-R)/poli(MC-R) em solução, estudar a carga superficial e tamanho de partícula do polímero por potencial zeta e DLS, caracterizar o filme por UV-vis, MEV e perfilometria para obter mais informações sobre a sua superfície e rugosidade.

## 5.4. Metodologia

### 5.4.1. Materiais

Os reagentes usados neste trabalho foram: 1-(2-hidroxietil)-3,3-dimetilindolino-6'-nitrobenzopyrylospiran (SP1), obtido comercialmente pela TCI Europe; 5-norbornene-2-ácido carboxílico, obtido comercialmente pela Alfa Aesar; tetrahidrofurano seco (THF), N,N'-diciclohexilcarbodiimide (DCC), 4-(dimetilamino)piridine (DMAP), Polialilamina hidrocloreada (PAH) com  $M_w = 15000$ , Grubbs de segunda geração e dimetilformamida (DMF) obtidos comercialmente pela Sigma Aldrich.

Para a construção dos filmes LbL foram usadas lâminas de vidro com o tamanho 24 x 60 mm, com espessura entre 0,085 e 0,115 mm, cortadas em retângulos de 7 x 50 mm e lâminas de silício cortadas em 10 x 20 mm.

### 5.4.2. Síntese do monômero

O monômero 5-norbornene-2-ácido carboxílico éster etílico de espiropirano (SP-R) foi previamente sintetizado pelo grupo de pesquisa Insight Centre for Data Analytics, National Centre for Sensor Research, da Dublin City University (DCU), baseado nos trabalhos de Florea et al e Keum et al, como descrito: o SP1 (0,3 g, 0,851 mmol) e 5-norbornene-2-ácido carboxílico (0,104 mL, 0,851 mol) foram misturados e dissolvidos em tetraidrofurano (THF) seco (20 mL) e resfriados à 0°C. Durante 1 hora soluções de DCC (0,21 g, 1,02 mmol) e DMAP (0,010 g, 0,08 mmol) em THF (5 mL) foram gotejadas. Durante mais duas horas a solução foi mantida resfriada, sob agitação, e então aquecida até 25°C durante 24 horas. Durante este período, a ureia diciclohexil foi precipitada, filtrada e lavada com THF (3 x 50

mL). Após evaporação do solvente uma cera vermelha resultante foi purificada usando cromatografia em coluna de sílica gel no escuro com mistura de hexano/acetato de etila.<sup>79,88</sup>

#### 5.4.3. Síntese do polímero

A síntese do poli(5-norbornene-2-ácido carboxílico espiropirano etil éster) (poli(SP-R)) foi realizada baseada em um método previamente descrito:<sup>79</sup> uma solução do monômero SP-R e do catalisador Grubbs de segunda geração, preparados em clorometano degaseificado ( $N_2$ ) foram misturados na proporção molar final de 300:1 (poly(SP-R)<sub>300</sub>) e a concentração final do monômero foi 10 mmol.L<sup>-1</sup>. A mistura foi deixada por 14 horas, tampada, sob agitação, em temperatura ambiente para polimerização e então foi parada pela adição de éter vinil-etílico e exposto à atmosfera por 30 minutos, ainda sob agitação. A solução de polímero foi adicionada em hexano e o precipitado foi removido por filtração a vácuo.

#### 5.4.4. Fabricação do filme

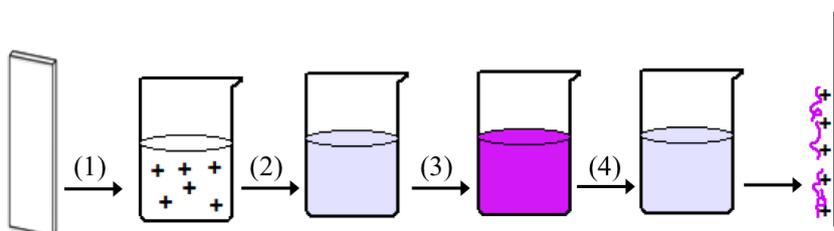
A limpeza dos substratos foi feita de acordo com a Seção 2.4.3. (Limpeza dos substratos). O polieletrólito usado para intercalar com o poli(SP-R) foi o PAH preparado em solução aquosa, a 1 mg.mL<sup>-1</sup>, com pH ajustado para 7 com NaOH. Este pH foi escolhido baseado no trabalho de Silva, H. S. 2010, no qual explica que em pH ácido o PAH está mais carregado enquanto a sílica está menos carregada. Em pH básico ocorre o oposto, a sílica fica com mais cargas e o PAH fica quase sem carga. Em pH 7 os dois materiais estão com carga intermediária, tendo assim mais chance de adsorver material na primeira bicamada e assim sucessivamente.<sup>89</sup> Três tipos de soluções de poli(SP-R) foram testadas, uma em DMF, outra em uma mistura de DMF:água na proporção de (1:3) e outra em (3:1) (v:v), todas em 1

mg.mL<sup>-1</sup>. Para iniciar a fabricação do filme, as soluções de poli(SP-R) foram irradiadas 3 minutos por luz ultravioleta câmara (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker UVP) antes do início da fabricação dos filmes.

Os filmes foram fabricados sobre lâminas de vidro e silício imersos nas seguintes soluções: i) 3 minutos em PAH, ii) 30 segundos de lavagem em água deionizada, iii) 5 minutos em solução de poli(SP-R) previamente irradiada com luz ultravioleta por três minutos para a conversão em poli(MC-R) ou sempre que necessário e iiiii) 30 segundos de lavagem em água deionizada formando (PAH/poli(SP-R))<sub>n</sub>. O ciclo foi repetido até obter o número de bicamadas desejadas, o qual é representado pela letra (n). O esquema de montagem do filme está exemplificado na Figura 29. Ao final de cada ciclo a absorbância do vidro contendo o filme foi monitorada por espectroscopia UV-vis.

A fim de analisar a morfologia de cada bicamada (da primeira a quinta) através do MEV o filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> foi depositado sobre silício, preparado em diferentes passos. Inicialmente, as soluções de formação do filme foram adicionadas em microtubos de plástico de 2 mL e a cada bicamada 300 µL de cada solução foram removidos, obtendo-se assim um filme com 5 degraus, referente a cada bicamada.

Figura 32 – Esquema de fabricação do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub>. 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.



Fonte: Adaptado de Campos *et. al.* <sup>22</sup>

#### 5.4.5. Teste de estímulo à luz UV/branca

As soluções do monômero SP-R e polímero poli(SP-R) preparados a  $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$  em DMF e o filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> foram submetidos à ciclos de irradiação com luz ultravioleta e visível para conferir se o polímero manteria a resposta aos estímulos luminosos, semelhante ao monômero e após sua imobilização no filme LbL. As soluções e o filme foram colocados em uma câmara (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker UVP) para irradiação com luz ultravioleta por 1, 2 e 3 minutos intercalados com irradiação de luz branca por 1, 2 e 3 minutos da fonte Fiber Lite LMI-6000 da marca Dolan-Jenner Industries, com uma lâmpada de 780 lumens, ajustada na potência máxima. A cada intervalo de tempo o filme e as soluções foram analisados por espectroscopia UV-vis.

#### 5.4.6. Teste *disassembly*

Para avaliar a capacidade de desmontagem do filme sob luz branca (LB) o (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> foi colocado em uma cubeta de quartzo contendo DMF:água na proporção de (3:1) (v:v) a 10 cm de distância da fonte de luz branca, por período prolongado, à temperatura ambiente. Um esquema simplificado do processo está ilustrado na Figura 33. A absorvância do filme foi avaliada em intervalos de 30 e 60 minutos por espectroscopia UV-vis. Um modelo exponencial que melhor se ajusta à curva foi usado para determinar a constante de desprendimento, usando a seguinte equação 3:

$$y = a * e^{-kt} + b \quad (3)$$

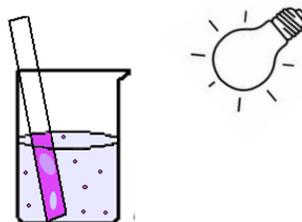
Onde  $y$  é a absorvância em 345 nm,  $a$  é o fator de escala,  $k$  é a constante da taxa de decaimento de primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ),  $b$  é o deslocamento da linha de base e  $t$  é o tempo em (min).

A meia-vida ( $t_{\frac{1}{2}}$ ) do desprendimento do filme foi calculada usando a equação 4:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (4)$$

O teste de controle foi realizado colocando o filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> nas mesmas condições anteriores (em cubeta de quartzo contendo DMF/água na proporção de 3:1 (v:v)), mas, em uma caixa fechada sem receber nenhum tipo de iluminação. A análise por espectroscopia UV-vis foi realizada no mesmo intervalo, sendo a cada 30 e 60 minutos.

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.



Fonte: Adaptado de Campos et al.<sup>22</sup>

#### 5.4.7. Instrumentação

Todas as análises de absorvância UV-vis deste capítulo foram realizadas em um espectrômetro modelo Cary 50 da marca Varian. Para a deposição dos filmes e os testes com os ciclos de irradiação UV/luz branca no filme, a linha de base foi feita com o vidro limpo.

Para as análises em solução, a linha de base usada foi a cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, contendo o mesmo solvente do analito. Para os ensaios de desprendimento do filme foi utilizado a cubeta contendo o solvente e a lâmina de vidro.

O tamanho da partícula de polímero determinada por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e sua carga superficial, o potencial zeta ( $\zeta$ -potencial) foram estimados pelo equipamento Zetasizer, modelo Nano ZS, com uma célula capilar especial DTS1070 ambos obtidos pela Malvern Instruments Ltd., UK. A solução de poli(SP-R) estudada por DLS e  $\zeta$ -potencial foi preparada em  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em DMF e analisada pelo software Zetasizer (Malvern). As amostras foram feitas em triplicatas. A solução de poli(SP-R) foi irradiada com luz ultravioleta durante três minutos para a conversão da poli(SP-R) em poli(MC-R) e analisada pelo potencial zeta. Após 10 minutos e a partir do retorno espontâneo de poli(MC-R) para poli(SP-R) a análise foi repetida, para verificar se há diferença na carga entre as formas poli(SP-R) e poli(MC-R). O índice de refração usado para o DMF foi 1,431 e para o polímero 1,47.<sup>90</sup>

A morfologia do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> depositado sobre silício foi analisada por um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da marca Carl Zeiss EVOLS 15, com uma tensão de aceleração de 9,64 kV. A morfologia foi verificada nas diferentes etapas de fabricação, nas bicamadas 1, 2, 3, 4 e 5. O filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> foi previamente revestido com uma camada de 10 nm de ouro por *sputtering*. A espessura do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> foi analisada pelo perfilômetro de superfície modelo Dektak 150 da marca Veeco Instruments Inc, sendo feito três tipos de análises, a primeira com o filme íntegro, outra com o filme submetido ao teste *disassembly* a o último com o filme contendo apenas uma bicamada.

## 5.5. Resultados e discussões

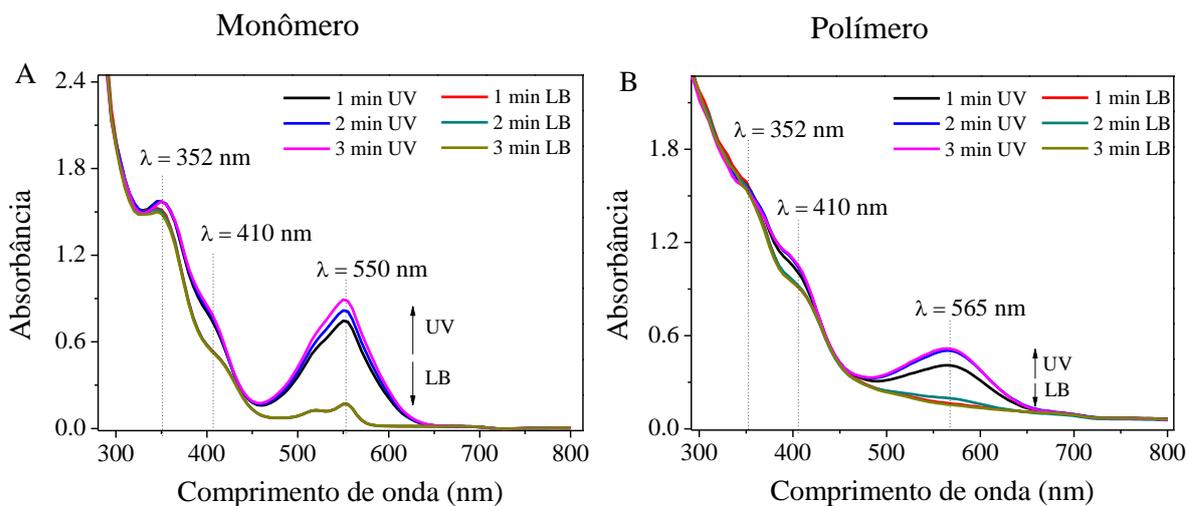
### 5.5.1. Caracterização do polímero poli(SP-R) em solução

O SP possui importantes propriedades fotocromicas que podem variar de acordo com o meio em que se encontra.<sup>79</sup> Dessa forma, para compreender o efeito da polimerização do SP-R foi realizado um estudo do monômero SP-R e do polímero poli(SP-R) no qual as soluções preparadas em  $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$  em DMF foram expostas à luz na seguinte ordem: luz UV por 1 min, LB por 1 minutos; UV por 2 min e LB por 2 min e por fim UV por 3 min e LB por 3 min. Entre cada ciclo de UV/LB as soluções foram analisadas por espectroscopia UV-vis e os espectros estão ilustrados nas Figuras 31A e 31B. As duas soluções apresentaram absorvâncias típicas da SP em  $\lambda = 352 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 410 \text{ nm}$  e na região do visível  $\lambda = 550 \text{ nm}$  e  $565 \text{ nm}$  para o monômero e para o polímero, respectivamente. Essas bandas são atribuídas à excitação eletrônica  $\pi-\pi^*$  provenientes do grupo benzopirano e da forma conjugada da merocianina.<sup>91</sup> O deslocamento na região do visível, é comum, pois a absorvância desta banda é fortemente influenciada pela polaridade do solvente e o meio em que se encontra.<sup>79,83,92,93</sup>

As duas soluções, Figuras 34A e 34B, apresentam respostas similares quando estimulados com luz. Quando expostos à luz UV a absorvância em  $550 \text{ nm}$  e  $565 \text{ nm}$  aumenta gradativamente com o tempo de exposição (1, 2 e 3 minutos), mas quando expostos à luz branca, a absorvância decai no mesmo nível, de forma que a linha vermelha, verde e amarelo escuro ficam sobrepostas, mostrando que 1 minuto é o tempo suficiente para a MC-R retornar a SP-R independente do tempo de irradiação por UV. Assim a polimerização do monômero SP-R não interfere na resposta ao estímulo UV/LB. A Figura 34 representa a estrutura química do polímero nas formas poli(SP-R) e poli(MC-R) evidenciando a conversão estimulada pela luz UV e branca. As fotos das soluções do monômero nas formas SP e MC e

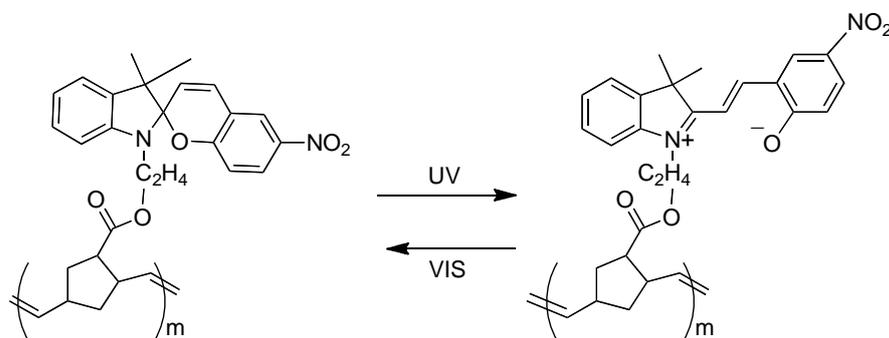
do polímero nas formas poli(SP-R) e poli(MC-R) estão ilustradas nas Figuras 36A, 36B, 37A e 37B, respectivamente.

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),  $0,17 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As soluções foram expostas à luz ultravioleta (UV) e luz branca (LB) em ciclos intercalados de 1, 2 e 3 minutos.



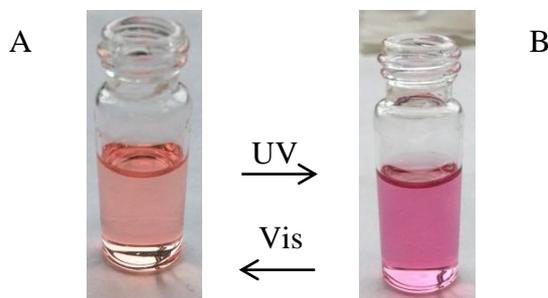
Fonte: Adaptado de Campos *et al.*<sup>22</sup>

Figura 35 – Estruturas químicas ilustrando a mudança reversível entre a forma fechada espiropirano (SP) e aberta merocianina (MC) induzido por luz na matriz polimérica.



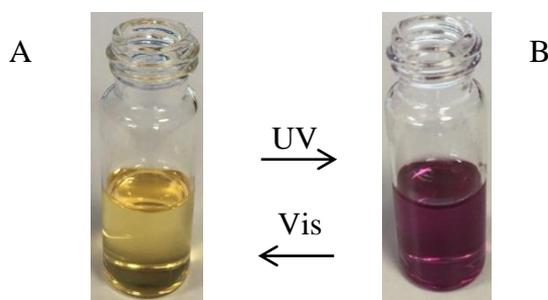
Fonte: Adaptado de Campos *et al.*<sup>22</sup>

Figura 36 - Solução do monômero (A) SP-R  $\leftrightarrow$  (B) MC-R em DMF que são convertidas com luz UV e visível.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37 – Solução de (A) poli(SP-R)  $\leftrightarrow$  (B) poli(MC-R) em DMF que são convertidas com luz UV e visível.

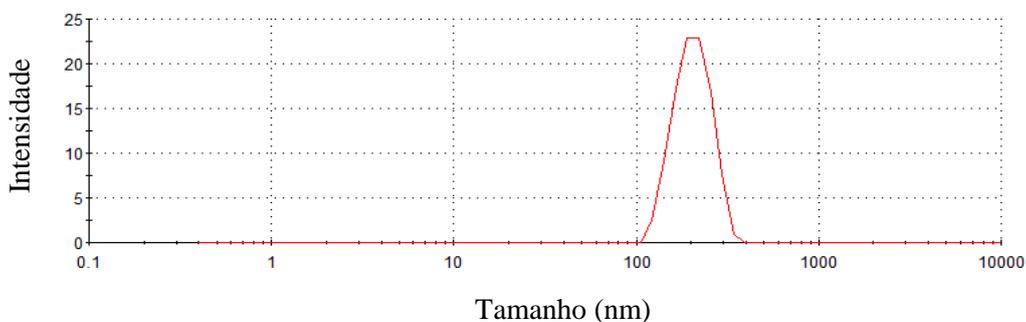


Fonte: Elaborado pelo autor.

O tamanho da partícula do polímero poli(SP-R) e sua carga superficial foram determinados por DLS e testes de potencial zeta em uma solução preparada a  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em DMF. O tamanho da partícula determinado para o poli(SP-R) foi em torno de 206,7 nm com um índice de polidispersão (PdI) de 0,43, como apresentado na Figura 38. O potencial zeta da solução de poli(SP-R) irradiada por luz UV e convertida para poli(MC-R) foi realizado para comparar a carga superficial das duas formas da molécula. Como pode ser visto nas Figuras

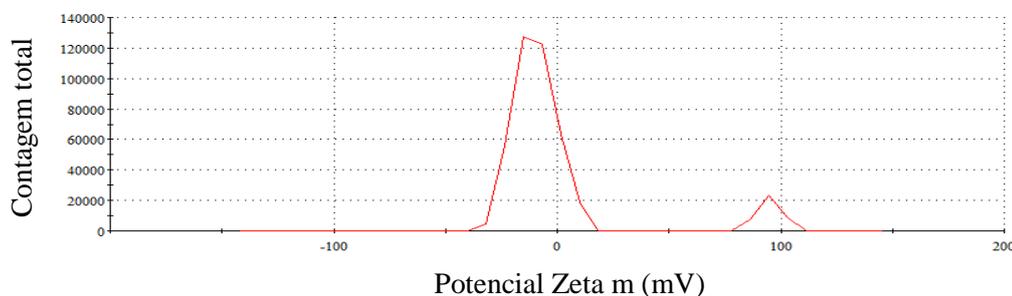
39 e 40, a solução de poli(MC-R) apresentou dois picos, um positivo em 95 mV com a contagem de 22929,7 e outro negativo em -9,87 mV com contagem de 127701. Isso já era esperado devido à natureza zwitteriônica da molécula MC. Após 10 minutos, aproximadamente, outra análise foi feita com a mesma solução, a qual não apresentou mais a carga negativa, e a positiva decresceu para 39,6 mV, com uma contagem de 2304, o que evidencia o retorno espontâneo da forma poli(MC-R) para a estrutura neutra poli(SP-R). Esse resultado indica que a poli(MC-R) pode ser usada com poliânion, pois o pico da carga negativa é maior que a positiva em termos de contagem, sendo portanto, considerada a carga dominante. Resultados semelhantes foram encontrados por Thompson, et al, que fez cálculos sobre a estrutura eletrônica da SP/MC e mostrou que o grupo aniônico apresenta uma densidade de carga muito maior do que o grupo catiônico.<sup>94</sup> Além disso, o grupo negativo fica largamente exposto, enquanto o grupo positivo fica próximo à cadeia polimérica, o que provavelmente dificulta a interação eletrostática nesse ponto com um polieletrólito de carga oposta para a formação do filme LbL. Como indicam as Figuras 39 e 40 as cargas positivas e negativas são canceladas com a exposição do polímero à luz branca, corroborando com a ideia de desmontar o filme sob a incidência de luz branca de forma a suprimir as interações eletrostáticas ali presentes.

Figura 38 – Distribuição de tamanho do poli(SP-R) em solução de DMF, 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>, com pico máximo em 206 nm.



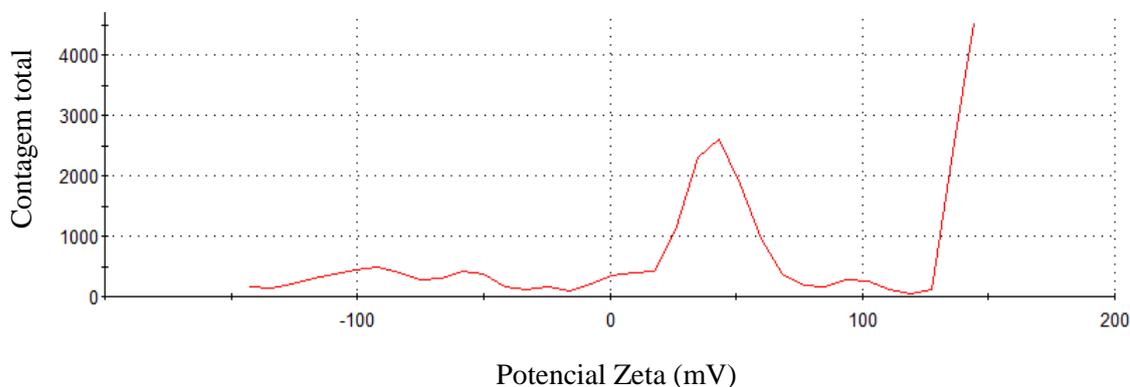
Fonte: Adaptado de Campos *et al.*<sup>22</sup>

Figura 39 – Potencial zeta da solução de poli(MC-R) em DMF,  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , apresentando dois picos, um positivo em  $95,00 \text{ mV}$  com uma contagem de  $22929,7$  e outro negativo em  $-9,87 \text{ mV}$  com contagem de  $127701,0$ , coerente com a natureza zwitteriônica da merocianina.



Fonte: Adaptado de Campos *et al.*<sup>22</sup>

Figura 40 – Potencial zeta da solução de poli(MC-R) em DMF,  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , dez minutos após ser exposta à luz UV, com um pico em  $39,6 \text{ mV}$  e contagem de  $2304$ , indicando que a forma MC está retornando para SP, neutra.



Fonte: Adaptado de Campos *et al.*<sup>22</sup>

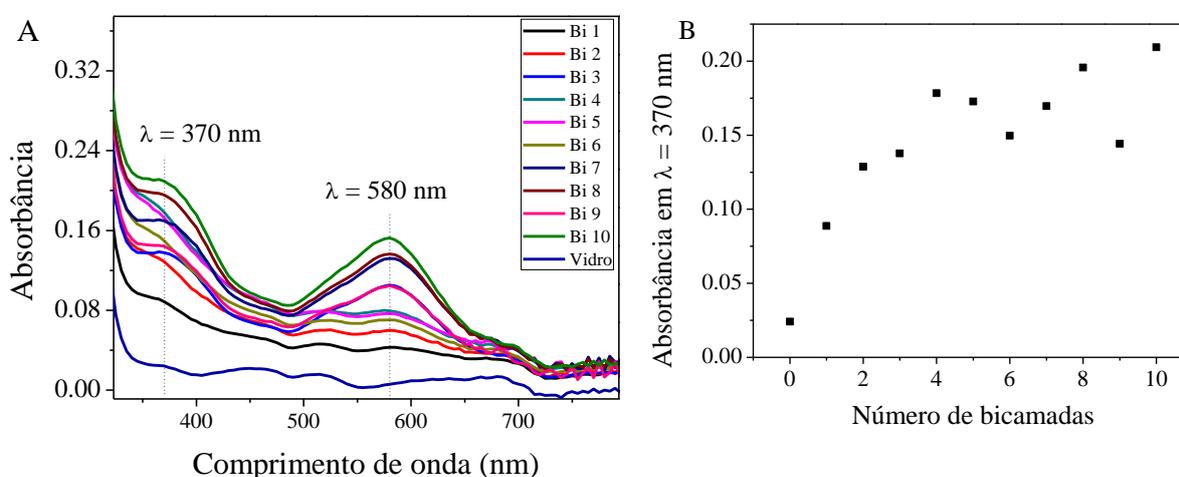
### 5.5.2. Caracterização do filme (PAH/poli(MC-R))<sub>n</sub>

A deposição dos polímeros PAH e poli(SP-R) foi monitorada a cada passo por espectroscopia UV-vis. Após cada bicamada uma medida foi realizada para verificar se houve aumento da absorbância. Como o PAH não apresenta banda de absorção na região UV-vis,

somente a absorbância do poli(MC-R) foi utilizada no monitoramento. O poli(SP-R) tem uma alta solubilidade em solventes orgânicos, como DMF, assim, o primeiro filme fabricado (PAH/poli(SP-R))<sup>10</sup> foi feito com este polímero preparado em DMF. Na Figura 41A, pode ser visto o espectro UV-vis de cada bicamada do filme e na Figura 38B a relação entre o número de bicamadas e a absorbância em  $\lambda = 370$  nm. Nota-se que houve um aumento da absorbância até a quarta bicamada e após esta apenas uma oscilação deste valor, indicando que a deposição do material sobre o substrato não está sendo satisfatório.

Outra solução de poli(SP-R) foi preparada em DMF:água (v:v) (1:3) na tentativa de fabricação de um filme melhor, porém essa solução precipitou rapidamente. Assim, uma nova composição da solução de DMF:água (v:v) (3:1) foi utilizada para a construção do filme cujo espectros estão apresentados na, Figura 41A. Nesta proporção o filme cresceu de forma satisfatória. Uma possível explicação é o poli(SP-R) ter uma interação mais forte com o DMF do que com o material na superfície do filme. No entanto, na mistura de DMF e água são mudadas as interações intermoleculares e ocorre a interação entre o poli(SP-R) e a superfície do filme.

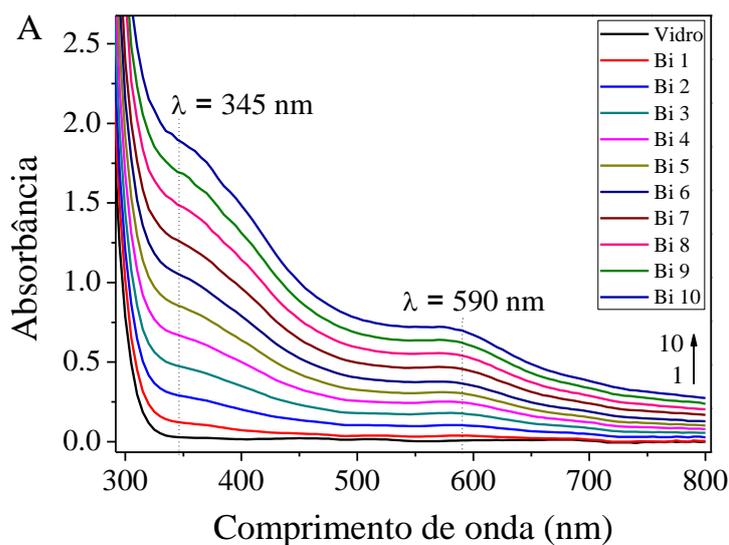
Figura 41 – (A) Espectros de cada bicamada do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>10</sub> com a solução de poli(SP-R) preparado em DMF. (B) Absorbância do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>10</sub> em  $\lambda = 370$  nm vs o número de bicamadas.

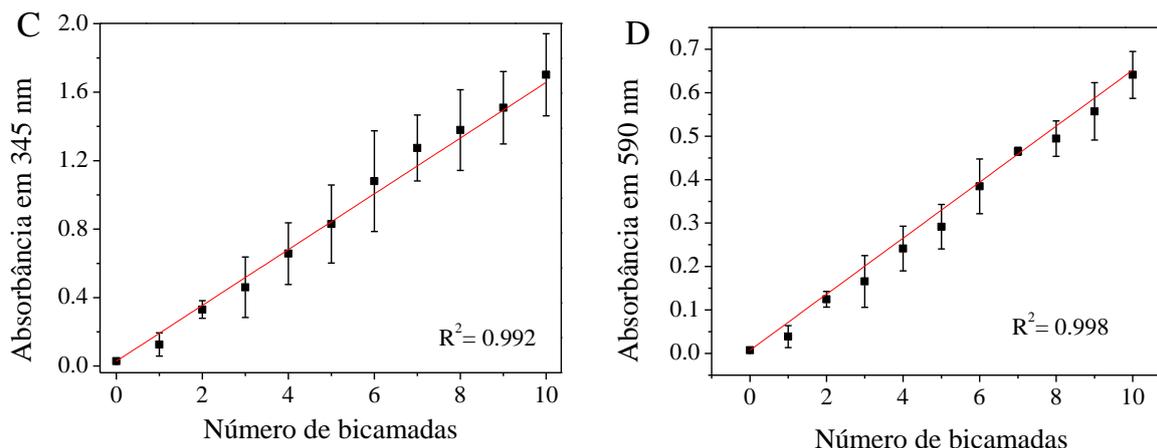


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 42A pode ser visualizado a deposição do (PAH/poli(MC-R))<sub>10</sub> em cada etapa do processo, e apresenta duas bandas características do poli(MC-R) em  $\lambda=345$  nm e  $\lambda=590$  nm. A Figura 42B é a foto do filme (PAH/poli(MC-R))<sub>10</sub> sobre o substrato de vidro após ter sido irradiado por luz UV durante 3 minutos ilustrando a deposição regular do filme. As Figuras 42C e 42 D representam a relação entre o número de bicamadas e a absorbância em  $\lambda=345$  nm e  $\lambda=590$  nm respectivamente, e indicam que a deposição do filme nas duas bandas é do tipo linear. Isso significa que em cada ciclo está sendo depositada a mesma quantidade de material.<sup>95,96</sup> As bandas que apareceram no filme são semelhantes às da solução de poli(MC-R), Figura 34, porém, são mais alargadas, o que pode ser atribuída à agregação de material na superfície, o que é um comportamento típico dos filmes LbL de polímeros.<sup>97-99</sup>

Figura 42 - (A) Espectros de cada bicamada do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>10</sub> 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))<sub>10</sub> após ser exposto a luz UV por 3 minutos. (C) Absorbância do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>10</sub> em  $\lambda = 345$  nm vs o número de bicamadas. (D) Absorbância do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>10</sub> em  $\lambda = 590$  nm vs o número de bicamadas.



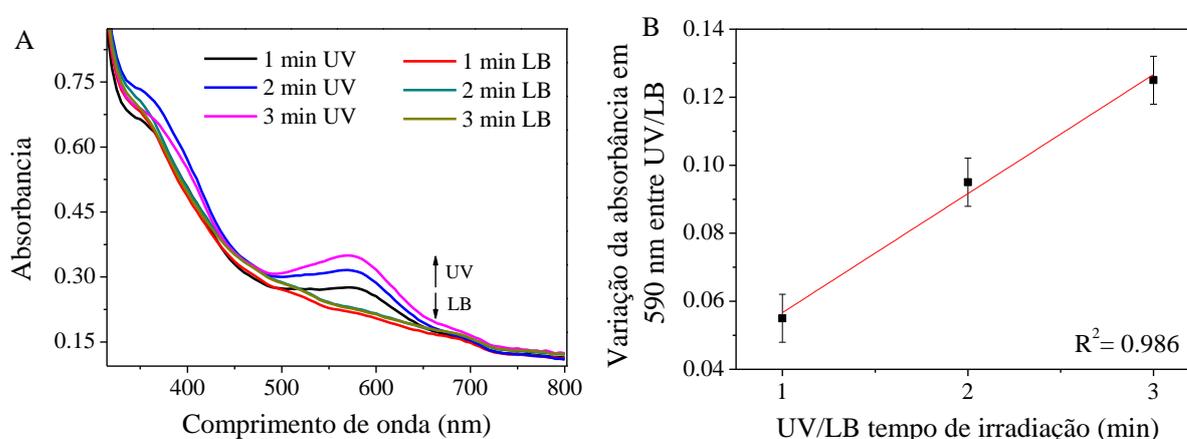


Fonte: Adaptado de Campos *et al.* <sup>22</sup>

O mesmo teste que foi feito com as soluções de monômero (SP-R) e polímero poli(SP-R) em resposta à luz UV e branca, foi realizado com o filme (PAH/poli(MC-R))<sub>5</sub> para verificar se o poli(SP-R) manteve suas características fotocromicas após a imobilização. Assim, o filme foi colocado em uma cubeta com DMF:água (3:1) (v:v) e irradiado por luz UV e branca intercalados durante 1, 2 e 3 minutos, e em cada intervalo foi feita uma análise por espectroscopia UV-vis. Como pode ser visto na Figura 43A, a banda em  $\lambda=590$  nm da poli(MC-R) teve um aumento da absorbância para  $0,050 \pm 0,007$ ,  $0,095 \pm 0,008$  e  $0,125 \pm 0,007$  (média e desvio padrão) conforme o tempo de irradiação com a luz UV e decresceu sempre para o mesmo ponto quando irradiado com a luz branca, similar às soluções. Nota-se que a magnitude da absorbância do filme é um pouco menor que a da solução, mesmo no tempo máximo, o que pode ser explicado pela diminuição dos graus de liberdade da molécula de SP-R/MC-R na matriz polimérica após a imobilização, levando em conta que o tamanho da MC é um pouco maior do que a forma SP e que após a fabricação do filme as moléculas estão aprisionadas na estrutura. <sup>9</sup> Porém, o filme ainda apresenta resposta quando estimulado com a luz UV e branca demonstrando que pode ser usado com material foto-responsivo em diversas

aplicações. A mudança na absorbância em  $\lambda = 590$  nm entre (PAH/poli(MC-R))<sub>5</sub> e (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> a cada ciclo UV/LB em 1, 2 e 3 minutos respectivamente, estão indicados na Figura 43B.

Figura 43 – (A) Espectro UV-vis do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> 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))<sub>5</sub> e (PAH/poli(MC-R))<sub>5</sub> a cada ciclo UV/LB.



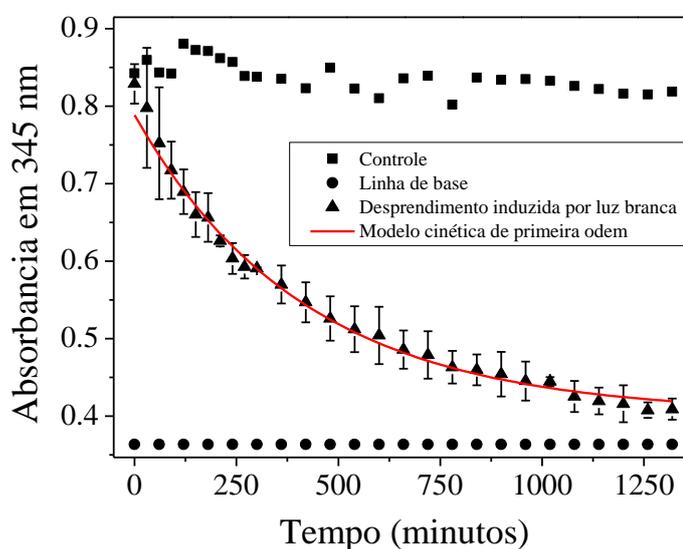
Fonte: Adaptado de Campos *et al.*<sup>22</sup>

Para testar a capacidade de *disassemble* do filme do substrato quando estimulado com a luz, o (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> foi colocado em cubeta contendo DMF:Água (3:1) (v:v) e exposto à luz branca. Em intervalos inicialmente de 30 e depois 60 minutos a absorbância do filme foi monitorada por espectroscopia UV-vis por um período prolongado até sua estabilização. O esperado é que com o filme (PAH/poli(MC-R))<sub>5</sub> exposto à luz branca as moléculas de poli(MC-R) retornem à forma poli(SP-R) de natureza neutra (como confirmado pela análise de potencial zeta) e as interações eletrostáticas entre os polímeros no filme fossem reduzidas despreendendo o material do substrato. Assim, o filme sobre o substrato pode servir como suporte para a inserção de outros tipos de moléculas entre as bicamadas que poderão ser

liberados a partir do estímulo da luz branca. Como a banda em  $\lambda = 345$  nm é permanente, ela foi usada e plotada em função do tempo para avaliar o progresso do teste. Para confirmar o efeito da luz no filme, foi feito um teste controle com (PAH/poli(MC-R))<sub>5</sub> nas mesmas condições anteriores, em solução de DMF e água, porém em uma caixa de papelão fechada, sem receber nenhum tipo de iluminação. No mesmo intervalo de tempo, 30 e 60 minutos, o filme foi retirado e analisado por espectroscopia UV-vis.

A absorvância em  $\lambda=345$  nm em função do tempo do filme (PAH/poli(MC-R))<sub>5</sub> exposto à luz branca e o controle estão ilustrados na Figura 44. O primeiro teve um decréscimo da absorvância ao longo do tempo e estabilizou em 1320 minutos (22 horas) quando alcançou um valor próximo da linha de base (cubeta contendo DMF:água na razão 3:1 (v:v) com uma lâmina de vidro limpa). O decréscimo da absorvância em relação à linha de base foi  $90,4 \pm 2,9\%$  enquanto o controle teve alguma oscilação, mas se manteve próximo da mesma absorvância inicial, no mesmo período de tempo comprovando a função da luz na resposta do filme. Um modelo de cinética de primeira ordem foi estipulado, como ilustra a Figura 44, bastante aproximado do resultado obtido. O valor de k foi estimado em  $2,60 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  e uma meia-vida ( $t_{\frac{1}{2}}$ ) de 257 minutos para o processo de desprendimento.

Figura 44 – Absorbância em  $\lambda = 345$  nm do filme (PAH/poli(MC-R))<sub>5</sub> 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.

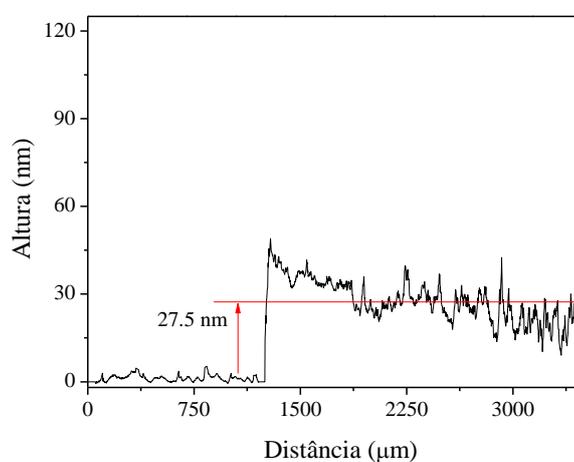


Fonte: Adaptado de Campos *et al.* <sup>22</sup>

A altura dos filmes (PAH/poli(SP-R))<sub>n</sub> com 1 e 5 bicamadas em silício foram determinadas por perfilômetria, antes e após serem submetidos ao teste *disassembly*. O filme com uma bicamada apresentou uma espessura média de 27,5 nm, o de 5 bicamadas 165 nm, e após o *disassembly* 11 nm, como ilustrado nas Figuras 45, 46 e 47, respectivamente. A espessura dos filmes com 1 e 5 bicamadas estão coerentes, somando um valor aproximado a 165 nm. Valores similares são encontrados na literatura para filmes poliméricos, Han *et al* estudou a espessura de filmes LbL com misturas de polieletrólitos de PSS e PAA formando (PEI/PSS-PAA)<sub>1</sub>(PAH/PSS-PAA)<sub>4</sub> no qual filmes de 3 e 5 bicamadas apresentaram espessura de 71 e 123 nm, respectivamente <sup>100</sup> enquanto Zhang *et al* fabricou filmes de PSS intercalado com misturas de PAA e PAH e encontrou que cada bicamada tem aproximadamente  $18,9 \pm 2,6$  nm, porém ambos os autores e outros demonstraram que a espessura dos filmes varia de

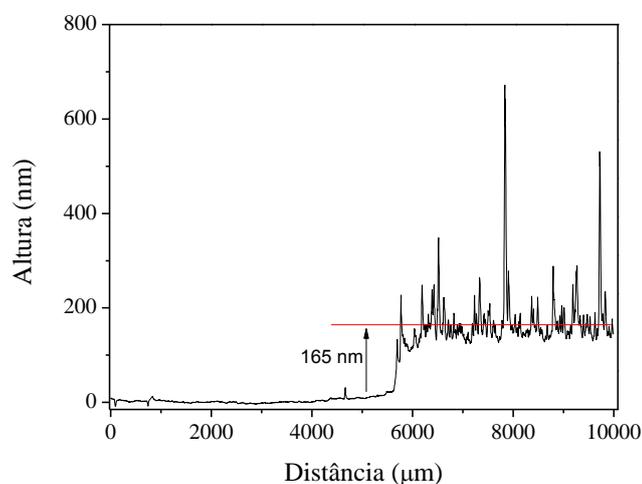
acordo com o material usado, tempo de deposição, força iônica das soluções e número de bicamadas.<sup>100-102</sup> Após o teste de desprendimento a espessura encontrada do filme foi 11 nm, confirmando o desprendimento dos materiais do substrato como foi observada por espectroscopia UV-vis (Figura 41). Nas Figuras 46 e 47 podem ser visualizados picos acima da média da espessura que são atribuídos a agregados e rugosidade do filme.

Figura 45 – Perfilômetria do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>1</sub> com uma bicamada sobre o silício, apresentando em média 27,5 nm de altura, como indicado pela linha vermelha.



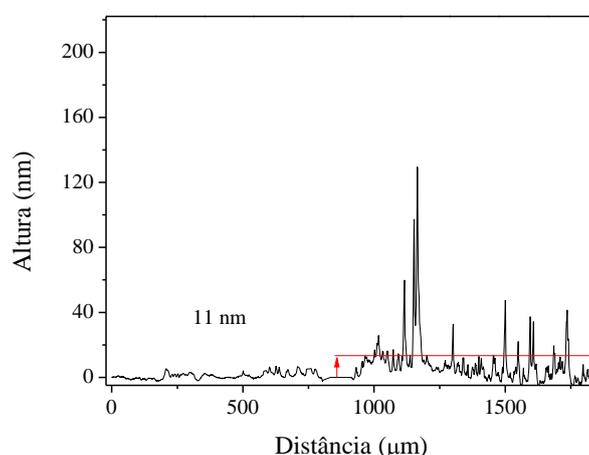
Fonte: Adaptado de Campos *et al.*<sup>22</sup>

Figura 46 - Perfilômetria do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> com cinco bicamadas sobre o silício, apresentando em média 165 nm de altura, como indicado pela linha vermelha.



Fonte: Adaptado de Campos *et al.*<sup>22</sup>

Figura 47 - Perfilômetria do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> 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.



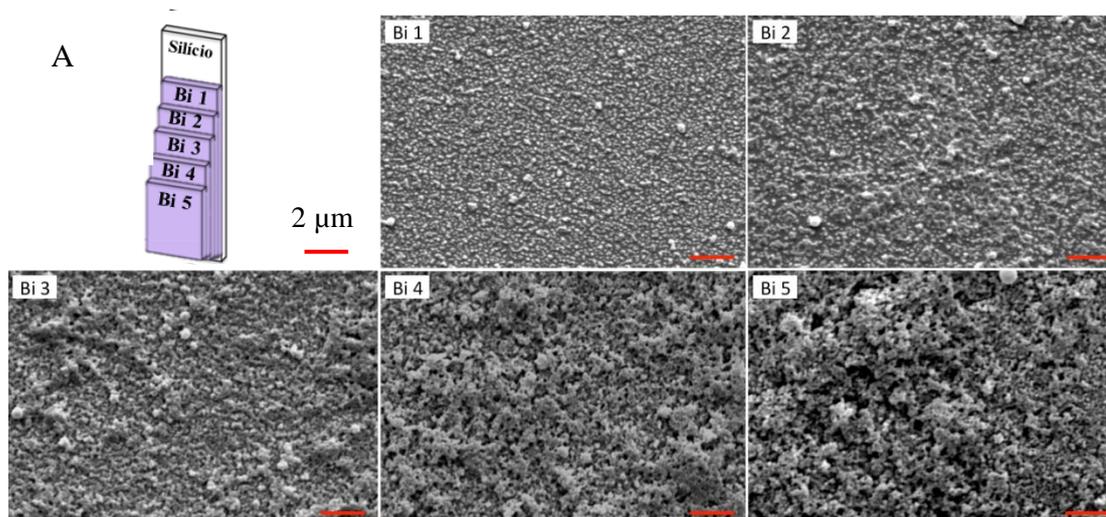
Fonte: Adaptado de Campos et al.<sup>22</sup>

A morfologia da superfície do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> foi estudada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para obter informações sobre a distribuição de material em cada bicamada. Para isso o filme foi fabricado removendo a cada bicamada um pouco do volume de solução de polímeros formando degraus na sua arquitetura, como pode ser visto o esquema na Figura 48A. Nas Figuras 48B Bi 1-5 estão as imagens obtidas do MEV de cada uma das cinco bicamadas do filme. Na primeira e segunda o silício não está completamente recoberto o que pode ser atribuído à fraca interação entre o substrato e os polímeros, resultando em um reduzido número de pontos de ligação na superfície do substrato. Quanto maior é a densidade de carga do polímero mais pontos de ligação há na superfície resultando num filme mais plano, como está ilustrado na Figura 46, elaborado por Rojas et al.<sup>103,104</sup> O que pode ter sido o caso do PAH que foi preparado em um pH na qual o polieletrólito e o substrato estão parcialmente carregados, como explicado na Seção 3.4.4 (Fabricação do filme).

A cada bicamada depositada houve um aumento gradual na rugosidade do filme. Vários trabalhos têm reportado esse comportamento em filmes LbL poliméricos, Lobo *et al* fabricou filmes de poly(o-metoxianiline) (POMA) alternado com polyvinylsulfonic acid (PVS) e verificou que a rugosidade aumenta nas primeiras bicamadas e estabiliza nas ultimas.<sup>105</sup> Dal'Acqua, *et al.*, estudou a deposição de filmes de poli(alilamina hidrocloreada) (PAH) e TiO<sub>2</sub> misturados intercalado com poli(ácido acrílico) (PAA) com nanopartícula de ouro com 40, 60, 80 e 100 bicamadas e notou um aumento na rugosidade apesar da absorbância do filme não aumentar exponencialmente de acordo com os ciclos de deposição. Raposo *et al* relaciona a fraca interação das primeiras bicamadas com o aumento da rugosidade ao longo do processo de formação do filme, que produz ilhas onde os polímeros são adsorvidos nas primeiras bicamadas e facilita a adsorção de mais polímeros sobre estes criando uma superfície irregular. Essa rugosidade também foi observada nas análises por perfilometria e que apresentou picos acima da média em 500 e 600 nm no filme de 5 bicamadas (Figura 46) mas não apresentou no filme com uma bicamada (Figura 45) concordando com as imagens de MEV, que mostra o aumento de agregados com o número de bicamadas. Também é coerente com a espectroscopia UV-vis onde aparecem bandas mais largas no filme do que em solução Figura 42A. O filme após a exposição à luz branca apresentou alguns picos até 120 nm (Figura 47), sugerindo que o filme foi desmontado em partes e sobraram agregados em sua estrutura.

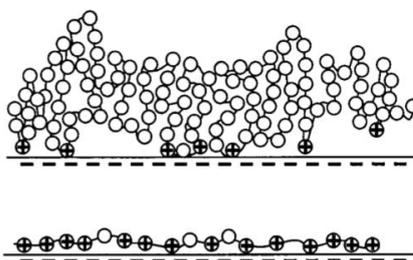
Apesar de apresentar superfície rugosa o filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> manteve suas propriedades fotocromicas, como observado na Figura 43 com satisfatório desempenho nos testes de desprendimento em resposta à luz, Figura 44.

Figura 48 – Esquema de fabricação do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> em degraus (A). Imagens de MEV de cada uma das 5 bicamadas do filme (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> 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 μm.



Fonte: Adaptado de Campos *et al.*<sup>22</sup>

Figura 49 – Esquema de adsorção de polieletrólitos com baixa densidade de carga (acima) e alta densidade de carga (abaixo).



Fonte: Adaptado de Rojas *et al.*<sup>103,104</sup>

## 5.6. Conclusão

O polímero poli(SP-R) sintetizado a partir do monômero SP-norborneno apresentou propriedades fotocromicas similares ao monômero em solução, com a conversão da poli(SP-R) para poli(MC-R) com a exposição a luz UV e retorno da poli(MC-R) para poli(SP-R) com a exposição a luz branca. Da mesma forma, foram preservadas as bandas de absorbância UV-vis da molécula após a polimerização.

O potencial zeta da solução do polímero na forma de poli(MC-R) e poli(SP-R) indicou a mudança da carga elétrica de zwitteriônico com predominância negativa passando para neutra, respectivamente, suportando a ideia do seu uso na construção do filme como poliânion e desprendimento do filme quando exposto à luz branca, pela supressão da carga e assim das interações entre os materiais no filme.

O filme (PAH/poli(SP-R))<sub>n</sub> é melhor depositado quando a poli(SP-R) é preparada em mistura de solvente orgânico (DMF) com água do que apenas em DMF puro. O filme LbL apresenta deposição linear, bandas de absorbância por espectroscopia UV-vis e resposta aos ciclos de luz UV/branca semelhantes à solução de polímero, indicando que mesmo imobilizado, a propriedade fotocromica da molécula foi preservada. O (PAH/poli(SP-R))<sub>5</sub> quando exposto a luz branca se desprende do substrato  $90,4 \pm 2,9\%$  em relação a linha de base, por um período de 22 horas. Enquanto no teste de controle, a absorbância se mantém próxima à inicial, comprovando que o filme apresenta resposta a fotoestimulação.

As imagens de MEV e a perfilometria indicam que a superfície do filme é rugosa, o que aumenta com a deposição de cada bicamada. O filme com 5 bicamadas tem uma espessura de 165 nm e em contraste, quando é submetido à luz branca apresenta uma espessura de 11 nm comprovando que desmontagem do filme e perda de material está ocorrendo, como foi observado por espectroscopia UV-vis. Isto mostra a vantagem do sistema em relação aos demais com um tempo maior de liberação e o potencial de uso do filme em

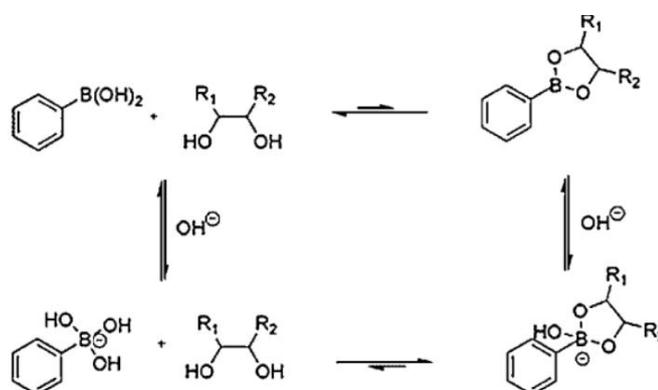
sistemas para diversas aplicações tais como pesticida para plantações, agentes terapêuticos em sistemas biológicos, embalagens inteligentes para alimentos que podem liberar um aditivo ou agir na absorção da luz, entre outros.

## Capítulo 4 – Filmes Layer-by-Layer de ácido fenil borônico

### 7.1. Introdução

Materiais que tenham uma resposta para a presença de carboidratos podem ter grande impacto sobre aplicações médicas e industriais.<sup>26</sup> O ácido borônico, (BA, do inglês *Boronic Acid*) tem sido foco de muitos estudos devido à sua habilidade em se ligar covalentemente a diol e açúcares, podendo ser empregado em diversas aplicações como hidrogéis, sistemas de liberação modificados e sensores, com maior ênfase ao monitoramento de diabetes.<sup>106,107</sup> O BA pode ser sintetizado com um fenil, originando o ácido fenil borônico (PBA, do inglês *Phenyl Boronic Acid*). O PBA em pH ácido é encontrado na forma trigonal e em pH básico reage com os íons hidróxido para formar íons boronato tetraédrico, através de ligação covalente.<sup>26</sup> O mecanismo de ligação do PBA a diols em meio ácido e básico está ilustrado na Figura 50.

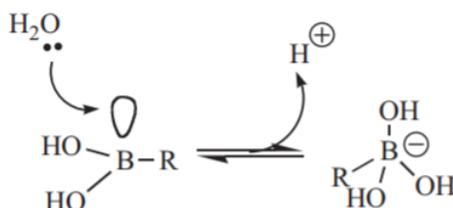
Figura 50 – Esquema de ligação covalente entre a molécula de PBA e um diol em meio ácido ou básico.



Fonte: adaptado de Levy et al.<sup>26</sup>

O átomo de boro do BA é hibridizado em  $sp^2$ , em solução aquosa, e dependendo do pH, o oxigênio e hidrogênio entram no orbital vazio do boro, gerando a hibridização  $sp^3$  e liberando um próton, como pode ser visualizado na Figura 51.<sup>108</sup> A acidez do ácido borônico é determinada pelas propriedades do seu grupo funcional, sendo os valores de pKa para o ácido fenil borônico entre 4,5 e 8,8.<sup>108</sup>

Figura 51 – Esquema de hibridização das formas  $sp^2$  para  $sp^3$  do ácido borônico.



Fonte: adaptado de Fu et al.<sup>108</sup>

Outro material empregado neste trabalho foi o 8-hidroxipirene-1,3,6 trissulfônico sal trissódico ácido (HPTS), conhecido como piranina. É um corante altamente fluorescente e solúvel em água, com pKa na região fisiológica, em 7,3. Devido à um grupo hidroxila presente em sua estrutura no estado protonado tem resposta à variação de pH e por isso tem sido aplicado em vários tipos de sensores, como de gases, aminoácidos, pH, solventes e em bioimagem.<sup>109</sup>

A piranina é bastante estudada com o BA pela sua propriedade fluorescente, que diminui conforme se liga ao BA. Em uma solução contendo BA e piranina, quando um diol é adicionado, a interação do BA com o diol é mais forte do que o BA com o corante, de forma que o BA se solta da piranina e se liga ao diol e a intensidade de fluorescência da piranina

aumenta. A partir deste princípio, vários sensores ópticos para carboidratos são desenvolvidos para monitoramento de diabetes e açúcares em alimentos.<sup>110-112</sup>

Neste trabalho a piranina foi utilizada como um poliânion para ser intercalado com polímeros baseados em PBA e facilitar o monitoramento do sistema de liberação pelas suas propriedades fluorescentes.

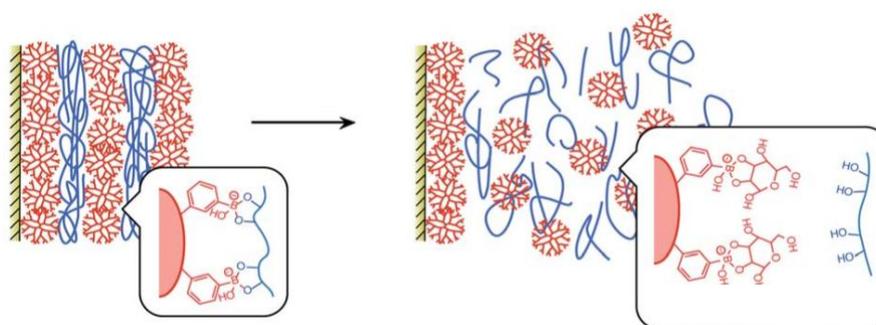
## 7.2. Revisão de literatura

Alguns trabalhos têm utilizado o BA em filmes LbL para a construção de revestimentos que respondam à açúcares, de forma que as camadas se desprendem umas das outras e o filme se desmonta. A velocidade de *disassemble* pode ser correlacionada com a concentração do carboidrato ou o tipo. A ideia é aplicar esses sistemas para o controle de carboidratos, colocando por exemplo, insulina entre as camadas e quando o filme é exposto em um ambiente com alta concentração de glicose a insulina é liberada para abaixar a concentração.

Watahiki et al<sup>113</sup>, estudou filmes LbL de dendrímeros PAMAM (poli(amido amina)) modificados com PBA e intercalados com poli(alcool polivinílico) em vários pHs, através das ligações éster do boronato, como ilustrado na Figura 52. Ele verificou que o filme não é estável em valores de pH entre 4 e 6 pois o filme se desmonta mesmo sem a presença de carboidratos. As ligações boronato éster são instáveis em pH ácido e a constante de ligação aumenta com o aumento do pH. Assim em pH básico (PBA na forma tetragonal) o filme tende a ser mais estável.<sup>113</sup> Em pH 7,4, 37°C e presença de 100 mmol.L<sup>-1</sup> de glicose o filme se desmontou de 50 a 60% em 90 minutos. A porcentagem de decomposição do filme diminuiu com a concentração da glicose.<sup>113</sup>

Suwa et al <sup>114</sup>, também construíram filmes LbL de PAMAM modificado com 4-carboxifenil ácido borônico e intercalou com PVS. Os filmes foram construídos em valores de pH entre 7 e 9 pela ligações boronato éster e similar ao trabalho anterior o filme se desmontou em pH 6 sem a presença de carboidratos. Outros testes realizados em pH entre 7,4 e 9 mostraram que o filme se desmontou de 20 a 25% em presença de 30 mmol.L<sup>-1</sup> de glicose e de 90 a 60% em 10 mmol.L<sup>-1</sup> de frutose, evidenciando que a resposta para a frutose é melhor do que para a glicose mesmo em concentrações mais baixas. <sup>114</sup>

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.

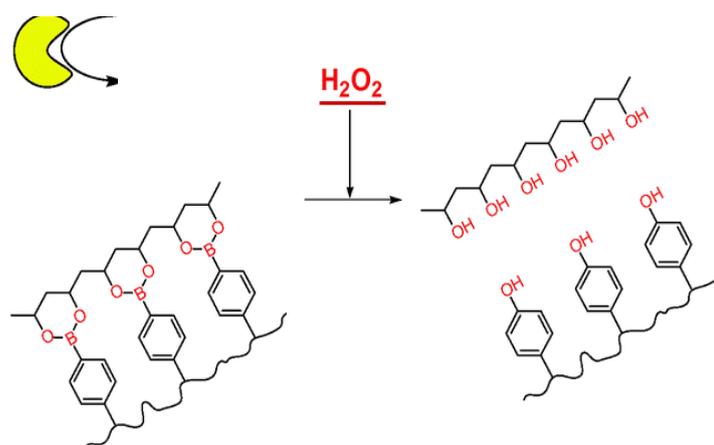


Fonte: adaptado de Watahiki et al. <sup>113</sup>

Sato et al <sup>115</sup>, funcionalizou o polímero PAH com ácido fenil borônico e intercalou com PVA, utilizando a técnica LbL, através das ligações boronato éster. Neste caso, o diferencial do trabalho foi funcionalizar o substrato previamente com a enzima glicose oxidase (GOx). Este filme foi estável em condições fisiológicas e se desmontou em 60 minutos em uma solução de 10 mmol.L<sup>-1</sup> de glicose e 120 minutos em 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>. A concentração de glicose interferiu diretamente no tempo de resposta do filme, sendo o tempo menor para concentrações maiores. A resposta desse filme ocorreu pela produção de peróxido

de hidrogênio proveniente da oxidação da GOx pela enzima, que quebra as ligações entre o boro e carbono e assim desmonta o filme,<sup>115</sup>. O esquema de formação e decomposição do filme está ilustrado na Figura 53.

Figura 53 - Esquema de montagem do filme LbL de PVA e PBA, e decomposição na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) com a quebra da ligação carbono-boro, a partir da oxidação da glicose pela GOX.



Fonte: adaptado de Sato et al.<sup>115</sup>

Neste trabalho foram testados a deposição de filmes LbL de polímeros baseados em PBA, intercalados com poliânion PVS, com a intenção de usar o grupo  $N^+$  do polímero de PBA para interagir com a carga negativa do PVS, como rota alternativa para a fabricação de filmes, diferente dos trabalhos citados que utilizavam a ligação éster e apresentavam maior sensibilidade à variação de pH. Também foi avaliado o efeito da posição dos isômeros *para*, *meta* e *orto* na fabricação e desmontagem do filme na presença de glicose e frutose. Para facilitar o entendimento será utilizado no decorrer do trabalho as siglas poli(PBA) como nome genérico para se referir ao polímero baseado em ácido fenil borônico, e as siglas poli(PBA $p$ ), poli(PBA $m$ ) e poli(PBA $o$ ) referente aos isômeros *para*, *meta* e *orto*, respectivamente. Também será usada a sigla PYR para a piranina, que vem do inglês, pyranine. Este capítulo

foi desenvolvido no laboratório Insight Centre for Data Analytics do grupo do Prof. Dr. Dermot Diamond, da Dublin City University (DCU), na Irlanda.

### 7.3. Objetivos

Fabricar filmes responsíveis à carboidratos para aplicação em sistemas de liberação que sejam regulados pela concentração de glicose e/ou frutose no meio, usando a técnica LbL e um polímero baseado em ácido fenil borônico. Os objetivos específicos são estudar a variação da carga elétrica da solução de poli(PBA) em diferentes valores de pH para estimar qual é o melhor para desenvolver os filmes, investigar qual é o melhor isômero (*para, meta ou orto*) do polímero baseado em ácido fenil borônico para a construção do filme e *disassemble*, caracterizar os filmes por espectroscopia UV-vis e FTIR, determinar a espessura por perfilometria e avaliar o comportamento dos filmes em soluções de glicose e frutose através de espectroscopia UV-vis e fluorescência em função do tempo.

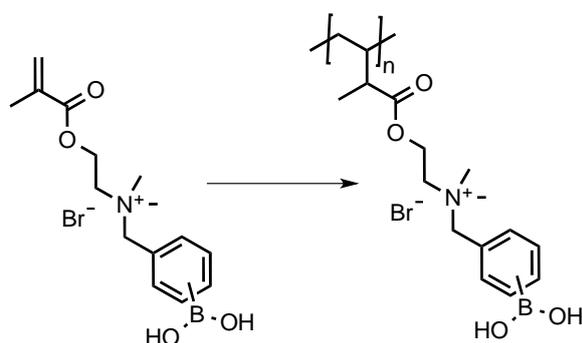
### 7.4. Materiais a métodos

Os reagentes utilizados foram a polietilenoimina (PEI) (50% em H<sub>2</sub>O), Poli(vinil sulfônico) (PVS) (25% em H<sub>2</sub>O), ácido 8-hidroxipireno-1,3,6 trissulfônico sal trissodico (piranina) com massa molar de 524,37 g.mol<sup>-1</sup>, óxido de fenilbis (2,4,6-trimetilbenzoil) fosfina (PBPO), D-glicose e D-frutose foram adquiridos pela Sigma Aldrich. Ácido 2-(bromometil) fenilborônico, ácido 3-(bromometil) fenilborônico e ácido 4-(bromometil) fenilborônico foram adquiridos pela Fluorochem.

#### 7.4.1. Polimerização do ácido fenil borônico (PBA) derivado

Neste trabalho foi utilizado o monômero baseado no ácido fenil borônico, nomeado de Metacrilato, etilmetilamina, ácido fenil borônico (MEAFB) que foi polimerizado e resultou no polímero nomeado de Àcido Propanóico, etilmetilamina, ácido fenil borônico (APEAFB). A síntese do monômero e a polimerização foram feitos de acordo com Campos, et al <sup>116</sup>. A estrutura química do monômero e do polímero estão representadas na Figura 54. No decorrer do trabalho foram chamados genericamente por monômero de PBA e o polímero poli(PBA) para facilitar a compreensão.

Figura 54 – Estrutura química do monômero e polímero baseado em ácido fenil borônico (PBA) nomeados de MEAFB e APEAFB à esquerda e á direita respectivamente.



Fonte: elaborado pelo grupo de pesquisa.

#### 7.4.2. Fabricação dos filmes

Todos os processos e soluções foram feitos com água deionizada ( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ) do sistema de purificação de água da Merck Millipore Milli-Q. O tampão fosfato foi preparado com fosfato de potássio dihidrogenado ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ,

0,1 mol.L<sup>-1</sup>) com pH 7,4. A limpeza dos substratos foi realizada como já descrito no Capítulo 2, Seção 2.4.3 (Limpeza dos substratos).

Todos os filmes foram feitos com duas bicamadas precursoras, sendo o substrato mergulhado nas seguintes soluções: (i) PEI (1 mg.mL<sup>-1</sup> em água) por 3 minutos, (ii) 30 segundos em água, (iii) 3 minutos em PVS (4 µL.mL<sup>-1</sup> em água) e (iiii) 30 segundos em água, este ciclo foi repetido duas vezes, formando (PEI/PVS)<sub>2</sub>. O tempos de imersão foram baseados em trabalhos anteriores.<sup>57</sup>

Diferentes filmes com os isômeros *orto*, *meta* e *para* de poli(PBA), (representados pela letra x) foram preparados com o seguinte procedimento: (i) 5 minutos em poli(PBAx) (1 mg.mL<sup>-1</sup> em água, com pH ajustado a 7,4 com NaOH e ácido acético), (ii) 30 segundos em água, (iii) 3 minutos em PVS e (iiii) 30 segundos em água, formando (PEI/PVS)<sub>2</sub>/(PBAx/PVS)<sub>n</sub>. O processo foi repetido (n) vezes até obter o número de bicamadas desejadas e resultou em três tipos de filme, (PEI/PVS)<sub>2</sub>/(PBAp/PVS)<sub>n</sub>, (PEI/PVS)<sub>2</sub>/(PBAm/PVS)<sub>n</sub> e (PEI/PVS)<sub>2</sub>/(PBAo/PVS)<sub>n</sub>.

O filme de piranina e PBAp seguiu o procedimento semelhante: (i) 5 minutos em poli(PBAp) (1 mg.mL<sup>-1</sup> em água, com pH ajustado a 7,4 com NaOH e ácido acético), (ii) 30 segundos em água, (iii) 5 minutos em piranina (1 mmol.L<sup>-1</sup> em água) e (iiii) 30 segundos em água, formando (PEI/PVS)<sub>2</sub>/PBAp/PYR)<sub>n</sub>.

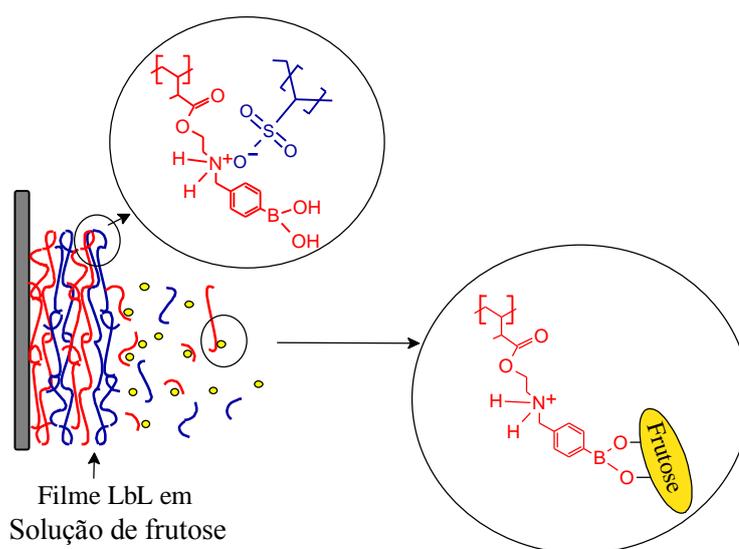
#### 7.4.3. Teste *disassembly*

O teste *disassembly* dos filmes (PEI/PVS)<sub>2</sub>/PBAx/PVS)<sub>n</sub> e (PEI/PVS)<sub>2</sub>/PBAp/PYR)<sub>5</sub> foi realizado colocando os filmes dentro de um bécker contendo tampão fosfato, pH 7,4, sob agitação, a 36°C. Após a estabilização, os filmes foram imersos em glicose (100 mmol.L<sup>-1</sup> preparado em tampão fosfato, pH 7,4) ou frutose (100, 30 ou 10 mmol.L<sup>-1</sup> em tampão fosfato,

pH 7,4) sob agitação, a 36°C. A Figura 55 apresenta uma representação esquemática do processo *disassembly*. Durante esse processo, em diferentes intervalos de tempo o quartzo contendo os filmes foram secos e monitorados por espectroscopia UV-vis para avaliar o efeito dos monossacarídeos nos filmes.

A solução proveniente do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>/PBA<sub>p</sub>/PYR<sub>5</sub> liberada foi monitorada por espectroscopia de fluorescência por conter o corante fluorescente piranina, que deve aumentar na solução conforme as camadas de (PEI/PVS)<sub>2</sub>/PBA<sub>p</sub>/PYR<sub>5</sub> forem sendo desmontadas em presença dos monossacarídeos.

Figura 55 – Representação esquemática do processo *disassembly* do filme (PBA<sub>p</sub>/PVS)<sub>n</sub>, o vermelho representa o polímero poli(PBA), o azul o PVS e o amarelo a frutose.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 7.4.4. Instrumentação

As análises por espectroscopia UV-vis foram realizadas em um equipamento modelo Cary 50, da marca Varian. Para a deposição do filme e teste *disassembly* a linha de base foi

feita com um quartzo limpo, enquanto para soluções foi utilizado uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e volume de 3 mL, contendo o mesmo solvente usado para o analito. Os testes de fluorescência foram feitos em um equipamento JASCO modelo FP-8300 com cubeta de quartzo (quatro lados polidos), com caminho óptico de 1,0 cm e volume de 3 mL.

Os espectros de FTIR foram coletados pelo equipamento Nicolet Nexus 470, com fluxo de nitrogênio, no modo transmissão, com 128 aquisições. Os materiais foram analisados em lâminas de silício, no qual foram feitos filmes por *drop casting* de PEI ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em água), PVS ( $4 \mu\text{L.mL}^{-1}$  em água), piranina ( $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  em água), poli(PBAp) ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em solução aquosa acertada para pH 7,4 ajustado com NaOH e ácido acético) e os filmes LbL (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/PVS)<sub>20</sub> e (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/PYR)<sub>20</sub>. O método *drop casting* consiste em pingar a solução sobre silício e deixar secar. Neste caso os filmes foram secos em estufa a vácuo, a 400 mmHg, de um dia para outro.

O potencial zeta ( $\zeta$ -potencial) do poli(PBAp) foi estimado pelo equipamento Zetasizer, modelo Nano ZS, com uma célula capilar especial DTS1070, ambos obtidos pela Malvern Instruments Ltd. O poli(PBAp) foi preparado a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em solução aquosa e foi medido em diferentes valores de pH, ajustados com NaOH e ácido acético numa faixa de 5,4 a 12,1.

Os experimentos de FTIR foram realizados no Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo (USP). Os demais experimentos foram realizados no Insight Centre for Data Analytics, da Dublin City University (DCU), na Irlanda.

## 7.5. Resultados e discussões

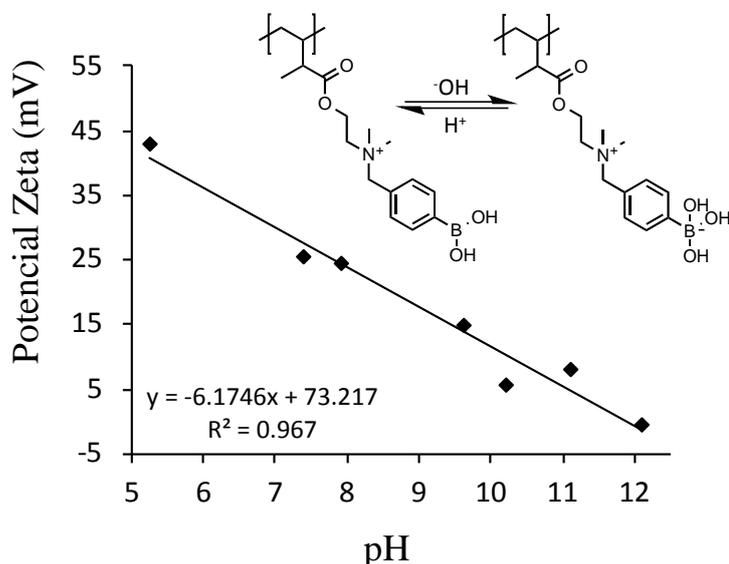
### 7.5.1. Caracterização do polímero BA em solução

Um estudo inicial foi realizado com a solução de poli(PBA $p$ ) para checar qual o pH em que a molécula estaria mais carregada e possivelmente resultaria em uma melhor deposição do material pela técnica LbL, por aumentar a interação eletrostática. A solução de poli(PBA) preparada em água teve o pH corrigido em valores entre 5,2 e 12,1 com NaOH e ácido acético e os valores de potencial zeta foram mensurados para cada um desses intervalos.

Em pH em torno de 5, o poli(PBA $p$ ) apresenta uma carga superficial média positiva, próximo a 40 mV, proveniente do N<sup>+</sup>, que neste pH é a dominante. Conforme o pH aumenta o grupamento do BA passa da forma trigonal planar para a tetraédrica <sup>26</sup> (adição de um grupo hidroxila), se tornando mais negativo gradativamente, de forma que em pH = 12,1 a molécula fica com carga -5 mV, como segue ilustrado na Figura 56, que apresenta a estrutura química do poli(PBA) em meio ácido e básico e a curva de calibração para o potencial zeta da solução em função da variação do pH.

Dessa forma, foi escolhido o pH entre 7,3~7,4 que apresenta potencial zeta de +25,4 mV. Esse valor é semelhante à outros polieletrólitos positivos usados para construir filmes LbL como o PEI e o PAH que são usados em alguns trabalhos com potencial zeta de +39,5 mV e +18,9 mV <sup>117</sup> e negativos como o PVS -36,4 mV. Assim, esse é o pH ideal para ser usado como polication além de estar na faixa fisiológica.

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.



Fonte: elaborado pelo grupo de pesquisa.

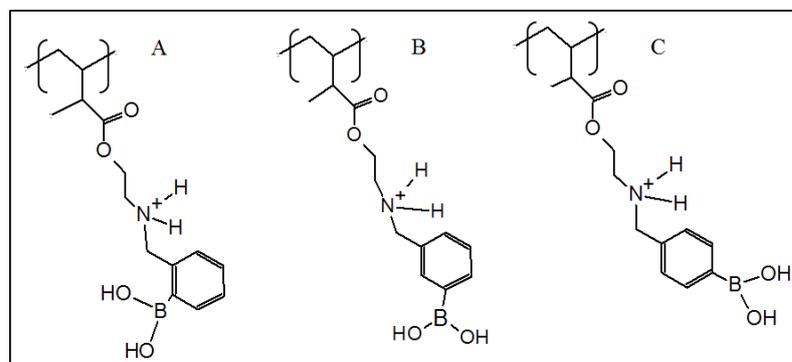
## 7.5.2. Filmes PVS e PBA

### 7.5.2.1. Fabricação do (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBA<sub>x</sub>/PVS)<sub>5</sub>

O polímero de BA pode ser sintetizado com o átomo boro nas posições *orto*, *meta*, ou *para* do anel, como ilustra a Figura 57. Para determinar qual é a melhor estrutura para produção de filmes LbL os três isômeros foram testados em filme com 2 bicamadas precursoras de polieletrólito PEI e PVS e, posteriormente, os polímeros foram intercalados com PVS em 5 bicamadas, formando os filmes (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBA<sub>o</sub>/PVS)<sub>5</sub>, (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBA<sub>m</sub>/PVS)<sub>5</sub> e (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBA<sub>p</sub>/PVS)<sub>5</sub> com os polímeros na posição *orto*, *meta* e *para*, respectivamente. Os espectros UV-vis de cada bicamada para cada filme estão ilustrados na Figura 58 e a relação entre a absorvância em  $\lambda = 230$  nm, a banda característica

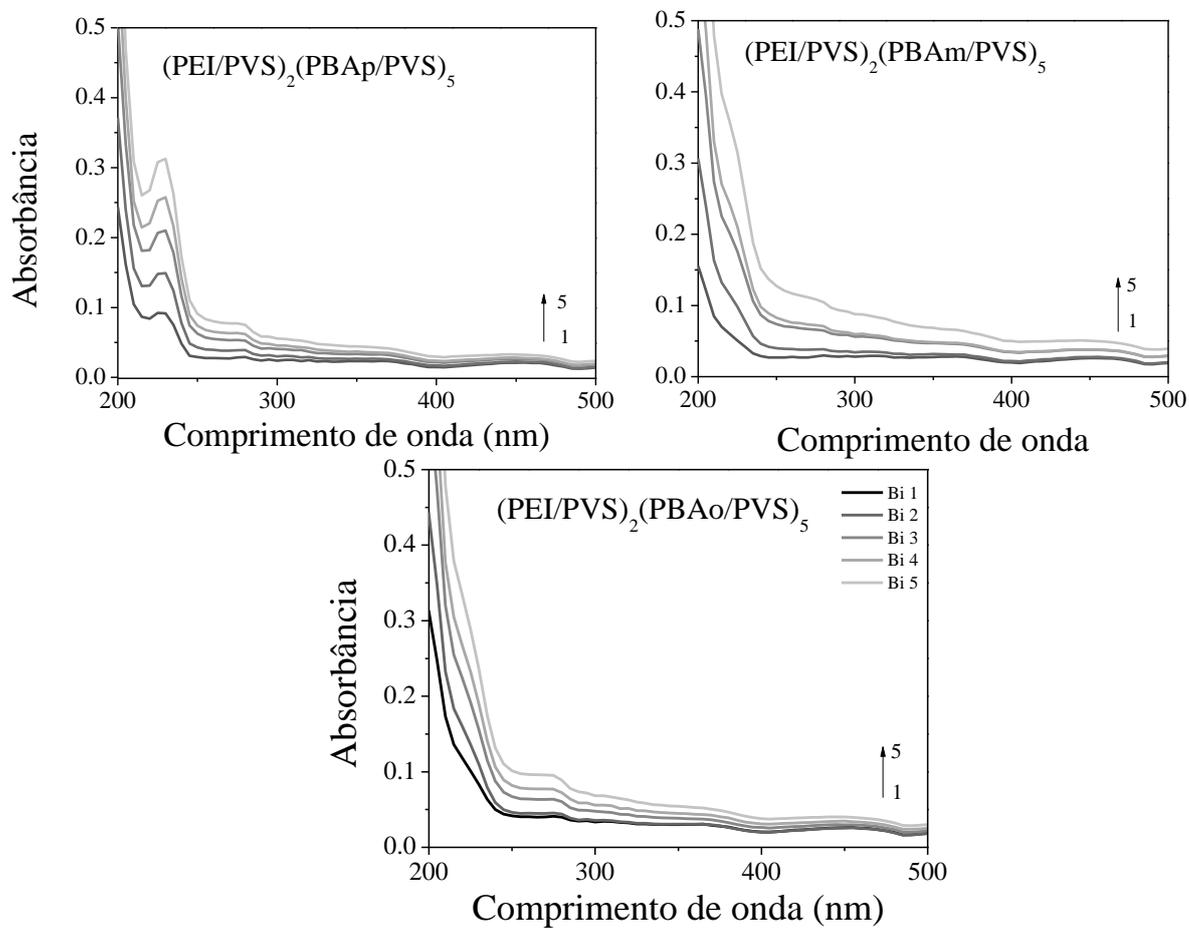
do poli(PBA) com maior intensidade, e o número de bicamadas está ilustrado na Figura 59. A partir do ajuste linear da deposição dos filmes obteve-se os valores do coeficiente angular para cada crescimento, sendo 0,03301, 0,04821 e 0,06529 dos filmes  $(PEI/PVS)_2(PBA_o/PVS)_5$ ,  $(PEI/PVS)_2(PBA_m/PVS)_5$  e  $(PEI/PVS)_2(PBA_p/PVS)_5$ , respectivamente. O filme com o polímero *para* foi o que apresentou o maior valor de coeficiente angular, indicando que mais material está sendo depositado a cada bicamada comparado aos demais filmes. Isso pode ser atribuído à posição, na qual na estrutura *orto* o grupo BA está mais próximo da carga positiva  $N^+$  usada na construção do filme, atrapalhando sua interação com o poliânion PVS. Para a estrutura *meta* a interferência é menor apresentando um declividade intermediária. Assim, o isômero *para* foi o escolhido para fabricar os filmes LbL de poli(PBA).

Figura 57 – Estrutura química dos isômeros do polímero de BA na posição (A) *orto*, (B) *meta* e (C) *para*.



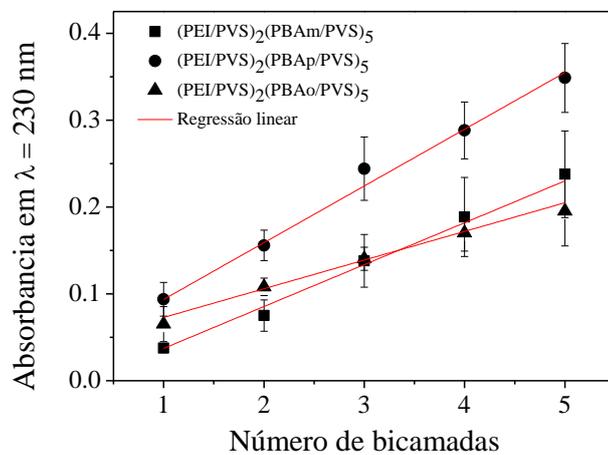
Fonte: elaborado pelo grupo de pesquisa.

Figura 58 – Espectros UV-vis de cada bicamada dos filmes  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAo})_5$ ,  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAm})_5$  e  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAp})_5$



Fonte: elaborado pelo autor.

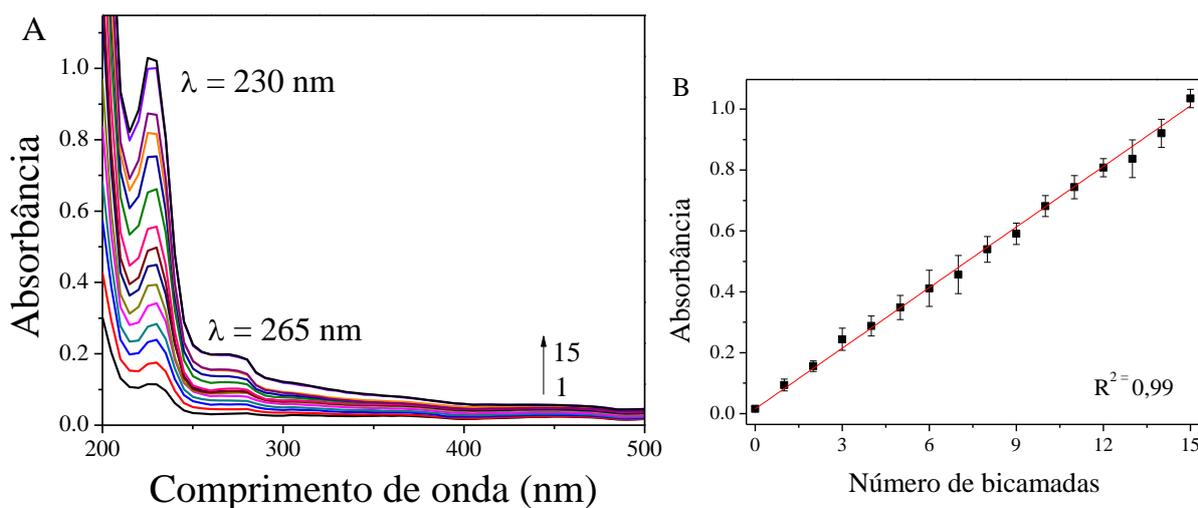
Figura 59 - Relação entre a absorvância em  $\lambda = 230 \text{ nm}$  e o número de bicamadas dos filmes  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAo/PVS})_5$ ,  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAm/PVS})_5$  e  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAp/PVS})_5$ . As linhas vermelhas representam regressão linear da deposição de cada filme.



Fonte: elaborado pelo autor.

Um filme de  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAP/PVS})_{15}$  de 15 bicamadas, similar ao de 5 bicamadas, foi fabricado para conferir a capacidade de deposição de números maiores de bicamadas. A Figura 60A mostra os espectros UV-vis de cada uma das 15 bicamadas do filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAP/PVS})_{15}$ , com as duas bandas em  $\lambda=230$  nm e  $\lambda=265$  nm características do BA, relacionadas à transição  $\pi-\pi^*$  do anel fenil e do grupo  $\text{B}(\text{OH})_2$ . A Figura 60B relaciona a absorvância em  $\lambda=230$  nm com o número de bicamadas. Como pode ser visto, a regressão linear descreve o crescimento do filme indicando que a cada bicamada depositada a mesma quantidade de material está sendo adsorvida.<sup>95</sup>

Figura 60 – (A) Espectros UV-vis de cada bicamada do filme LbL  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAP/PVS})_{15}$ . (B) Relação entre a absorvância em  $\lambda = 230$  nm e o número de bicamadas do filme.



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 7.5.2.1. Análises por FTIR e perfilometria

Análises por espectroscopia FTIR foram realizadas para correlacionar os picos de absorção no infravermelho do filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAP/PVS})_{15}$  e dos polímeros usados na sua

construção. Desta forma, o PEI, PBA<sub>p</sub> e PVS foram pingados em lâminas de silício e secos em estufa à vácuo. Os espectros estão apresentados na Figura 61. No espectro do poli(PBA<sub>p</sub>) há um pico largo entre 3600 a 3200 cm<sup>-1</sup> atribuído ao estiramento ν O-H do BA e em 3000 cm<sup>-1</sup> relacionada ao estiramento ν C-H no anel. Em 1580 e 1425 cm<sup>-1</sup> os picos são devido ao estiramento ν C-C do anel, enquanto em 1382 e 1345 cm<sup>-1</sup> estão presentes dois ombros caracterizados pela deformação do δ B-O. Em 1117 cm<sup>-1</sup> há deformação δ-no plano do C-H, em 1010 e 926 cm<sup>-1</sup> estão relacionados à deformação no δ B-O-H e em 650 e 618 cm<sup>-1</sup> são atribuídos à deformação δ-fora do plano de BO<sub>2</sub> e δ-no plano do anel C-C-C, respectivamente.<sup>118,119</sup>

No espectro do PEI estão presentes os picos relacionados ao estiramento em 3280 cm<sup>-1</sup> devido ao grupo ν NH<sup>120,121</sup> e em 2930 e 2815 cm<sup>-1</sup> devido ao grupo ν CH<sup>120,121</sup>. O pico em 1573 cm<sup>-1</sup> é atribuído à deformação δ NH,<sup>57,120,121</sup> e em 1465 e 1412 cm<sup>-1</sup> à deformação do δ C-H,<sup>122,57</sup> em 1300, 1100 e 1040 à deformação do δ C-N<sup>122, 123</sup>. Enquanto o PVS apresenta um pico em 1107, 744<sup>124</sup> e 620 cm<sup>-1</sup> correspondente à deformação simétrica do δ SO<sub>2</sub> e C-S.<sup>125</sup>

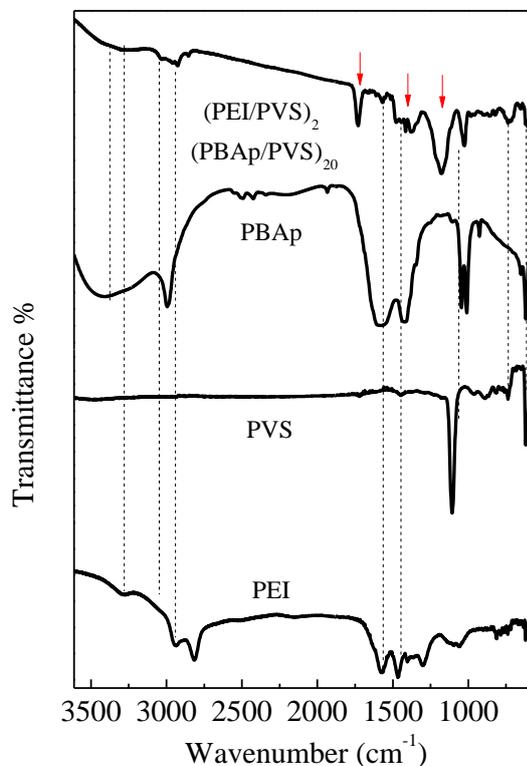
O espectro do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBA<sub>p</sub>/PVS)<sub>20</sub> apresenta um pico largo na região entre 3600 e 3150 cm<sup>-1</sup> resultante do pico da hidroxila entre 3200 a 3600 cm<sup>-1</sup> do poli(PBA<sub>p</sub>) somado ao 3280 cm<sup>-1</sup> relacionado ao grupo NH do PEI. Na região em 3030-2850 vários picos apareceram juntos pela soma dos picos em 3000, 2930 e 2815 cm<sup>-1</sup>, provenientes do poli(PBA<sub>p</sub>) e do PEI do estiramento ν C-H.

Um pico novo aparece no filme em 1730 cm<sup>-1</sup> que é normalmente associado ao grupo C=O, mas a probabilidade que tenha surgido uma nova ligação no filme entre o poli(PBA<sub>p</sub>) e o PVS é baixa. Quando uma ligação de hidrogênio é formada com um grupo carbonila a sua frequência de vibração é movida para valores mais baixos.<sup>126</sup> Comparando o espectro do filme LbL e do *cast* de poli(PBA<sub>p</sub>), observa-se que no segundo há um ombro em 1705 cm<sup>-1</sup>,

pouco evidente, enquanto no filme essa banda é suprimida e deslocada para  $1730\text{ cm}^{-1}$ , bastante pronunciada. Isso indica que no filme *cast* de poli(PBAp) pode ter mais ligações de hidrogênio, devido à quantidade de polímero presente causando maior agregação e interação entre suas próprias moléculas. No filme LbL, o poli(PBAp) está presente em menor concentração e intercalado pelo PVS, e assim há menos interação entre suas cadeias, causando o deslocamento e evidência do pico. Em  $1580\text{ cm}^{-1}$  o pico é proveniente da absorção do PBAp e do PEI, porém, bastante reduzido, quando comparado à região de  $1330\text{ a }1475\text{ cm}^{-1}$ , isso pode ser devido à interação eletrostática na região do nitrogênio, que apresenta a carga positiva, e com a proximidade do PVS nessa região a intensidade da vibração foi alterada. Um pico largo foi encontrada para na região de  $1330\text{ a }1475\text{ cm}^{-1}$  provenientes da mistura das bandas de PEI e PBAp nessa região.

O pico em  $1107\text{ cm}^{-1}$  que aparece no filme feito por *drop casting* do PVS é relacionado a deformação do ácido sulfônico. No filme LbL (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/PVS)<sub>20</sub> este pico se deslocou para uma frequência maior e ficou mais alargado, aparecendo na região entre  $1100\text{ e }1265\text{ cm}^{-1}$ . Isso pode ocorrer devido à hidratação do grupo <sup>124</sup> ou às interações intermoleculares, que ocorre no filme justamente nessa região com o N<sup>+</sup> do BA. O pico em  $1025\text{ cm}^{-1}$  está relacionado às bandas  $1046\text{ e }1010\text{ cm}^{-1}$  do poli(PBAp), assim como em  $618\text{ cm}^{-1}$  que aparece um pico resultado da soma do PVS em  $620\text{ cm}^{-1}$  e  $618\text{ cm}^{-1}$  do poli(PBAp). Desta forma, os espectros indicam a presença dos picos característicos de cada material e sua presença no filme LbL confirmando a montagem do filme. A alteração de alguns picos no filme em relação ao material puro indicam que está ocorrendo interação entre os polímeros. Todos os picos estão listados na Tabela 5.

Figura 61 – Espectros de FTIR dos filmes feitos por *drop casting* dos materiais puros PEI, PVS e poli(PBAp) e do filme LbL  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAp/PVS})_{15}$ . As setas vermelhas indicam as diferenças entre os materiais puros e o filme LbL.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Atribuições das frequências de vibração dos materiais puros PBAp, PEI, PVS e do filme LbL  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAp/PVS})_{20}$ .

PBAp	PEI	PVS	$(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAp/PVS})_{20}$	Atribuições
3600-3200			3600 e 3150	$\nu$ O-H <sup>118,119</sup>
	3280			$\nu$ NH <sup>120,121</sup>
3000			3030-2850	$\nu$ C-H <sup>119</sup>
	2930			$\nu$ CH <sup>120,121</sup>
	2815			$\nu$ CH <sup>120,121</sup>

			1730	C=O
1580				$\delta$ C-C <sup>118,119</sup>
	1573		1568	$\delta$ NH <sup>57,120,121</sup>
	1465		1330-1490	$\delta$ C-H <sup>122</sup>
1425				$\delta$ C-C <sup>118,119</sup>
	1412			$\delta$ C-H <sup>57</sup>
1382				$\delta$ B-O <sup>119</sup>
1345				$\delta$ B-O <sup>119</sup>
	1300			$\delta$ C-N <sup>123</sup>
			1132-1240	$\delta$ SO <sub>2</sub>
1117				$\delta$ -no plano C-H <sup>119</sup>
		1107		$\delta$ SO <sub>2</sub> <sup>125</sup>
	1100			$\delta$ C-N <sup>123</sup>
	1040			$\delta$ C-N <sup>122</sup>
1046			1025	$\delta$ B-O-H
1010				$\delta$ B-O-H <sup>118</sup>
926				$\delta$ B-O-H <sup>118</sup>
		744	744	$\delta$ SO <sub>2</sub>
650				$\delta$ -fora do plano BO <sub>2</sub> <sup>118</sup>
		620		$\delta$ C-S <sup>125</sup>
618			610	$\delta$ -no plano do anel C-C-C <sup>118</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor.

O filme  $(PEI/PVS)_2(PBAp)_5$  foi analisado por elipsometria, porém o sinal se manteve próximo ao zero e assim não foi possível determinar sua espessura. Acredita-se que esse filme seja mais fino e ficou abaixo do limite de detecção da técnica.

#### 7.5.2.2. Teste *disassembly*

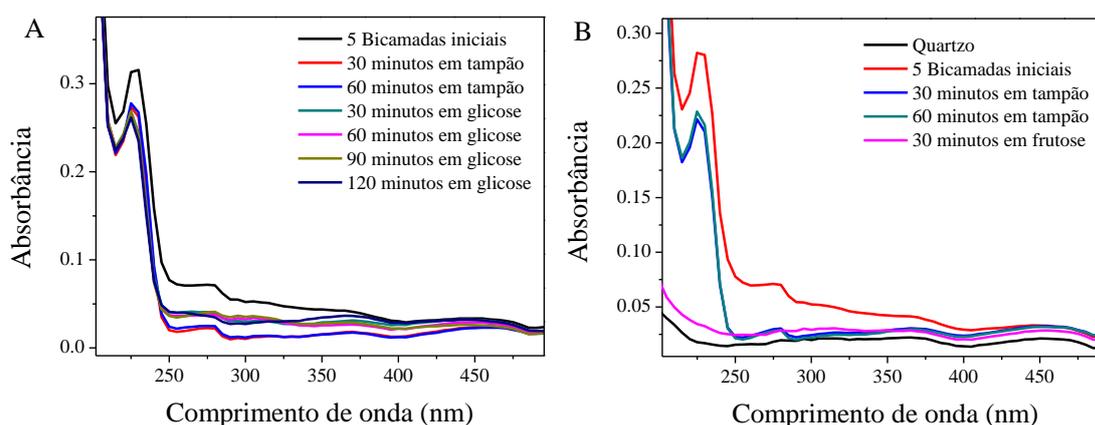
Após a fabricação do filme  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PVS)_5$  o seu desempenho para a resposta á glicose foi verificada. Os primeiros experimentos foram feitos colocando o  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PVS)_5$  em tampão fosfato, com pH em 7,4, sob agitação e após 30 e 60 minutos o filme foi analisado por espectroscopia UV-vis. Após os primeiros 30 minutos em tampão a absorbância em 230 nm decresceu um pouco, provavelmente ocasionado pela perda de material que não estava bem adsorvido no filme ou à mudança da força iônica entre a solução de preparo do filme e tampão. Mantendo o filme por mais 30 minutos em tampão este estabilizou e o efeito real dos monossacarídeos pôde ser analisado, como ilustrado na Figura 61A. Em seguida, o filme foi colocado em solução de glicose preparada em tampão fosfato, pH 7,4, na concentração de  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ , sob agitação e analisando por espectroscopia UV-vis nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Não houve decréscimo da absorbância em 230 nm, significando que o filme não responde à glicose e o filme continua adsorvido sobre o substrato, mesmo em concentrações consideradas altas como  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

O mesmo procedimento foi aplicado para solução de frutose, sendo o filme colocado 60 minutos em tampão para estabilizar e posteriormente, 30 minutos em frutose. A resposta do filme  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PVS)_5$  teve um decréscimo quase total de absorbância, como apresentado na Figura 62B, significando que o filme apresenta resposta para a frutose. Isso ocorre porque a ligação do ácido borônico com a D-frutose é mais forte do que com a D-glicose. Vários trabalhos com diferentes compostos de ácido borônico reportam que a

constante de ligação (K) para BA e D-frutose é várias vezes maior do que para BA e D-glicose.<sup>106,112,113</sup>

Existem trabalhos com foco na síntese de novos polímeros a fim de aumentar a seletividade para a glicose.<sup>106</sup> Segundo Egawa et al, filmes LbL com polímeros que ficam menos empacotados têm uma resposta maior para a D-glicose do que os que são mais densos.<sup>106</sup> Em trabalhos futuros poderão ser testados outros poliânions que deixem o filme mais poroso e possa facilitar a ligação entre a D-glicose e o ácido borônico.

Figura 62 – Espectros do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAP/PVS)<sub>5</sub> em: (A) em tampão fosfato e em solução glicose 100 mmol.L<sup>-1</sup> e (B) em tampão fosfato e em solução de frutose 100 mmol.L<sup>-1</sup>.



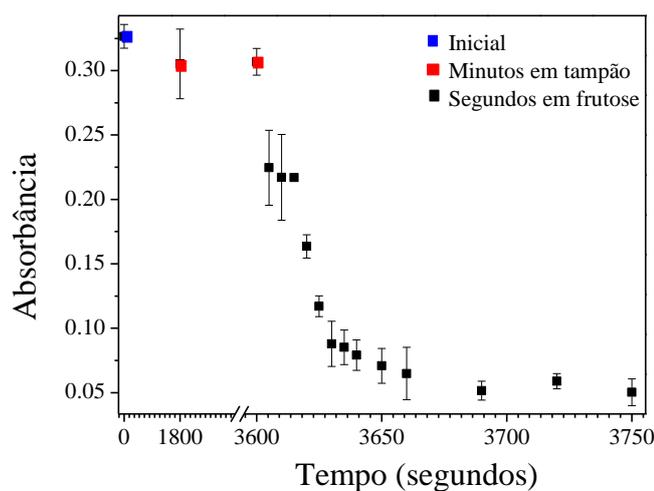
Fonte: elaborado pelo autor.

A partir da resposta positiva do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAP/PVS)<sub>5</sub> para a frutose, vários experimentos foram feitos para encontrar o tempo real de *disassembly* do filme. A princípio o filme foi colocado em solução de frutose preparada em tampão fosfato a 100 mmol.L<sup>-1</sup>, sob agitação durante 30 minutos, e quase todo o filme foi removido. Assim, outra tentativa foi realizada mergulhando o filme em solução de frutose a 10 mmol.L<sup>-1</sup>, por 30 minutos, e novamente o filme foi removido totalmente. O intervalo de tempo foi sendo reduzido

gradualmente, de minutos para segundos e assim foi possível determinar o tempo real de desmontagem do filme.

A Figura 63 ilustra a absorvância inicial do filme  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PVS)_5$ , após 30 e 60 minutos em tampão fosfato, e em seguida em solução de frutose  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , ambos em pH 7,4, sob agitação e  $36^\circ\text{C}$ . Como pode ser visto, o filme tem uma absorvância diminuída nos primeiros 30 minutos em tampão, pela perda de material, como já citado, seguido da estabilização. Quando colocado na presença de frutose, a absorvância decresceu 88% em relação ao valor estabilizado no tampão em cerca de 90 segundos.

Figura 63 – Absorvância 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  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ .



Fonte: elaborado pelo autor.

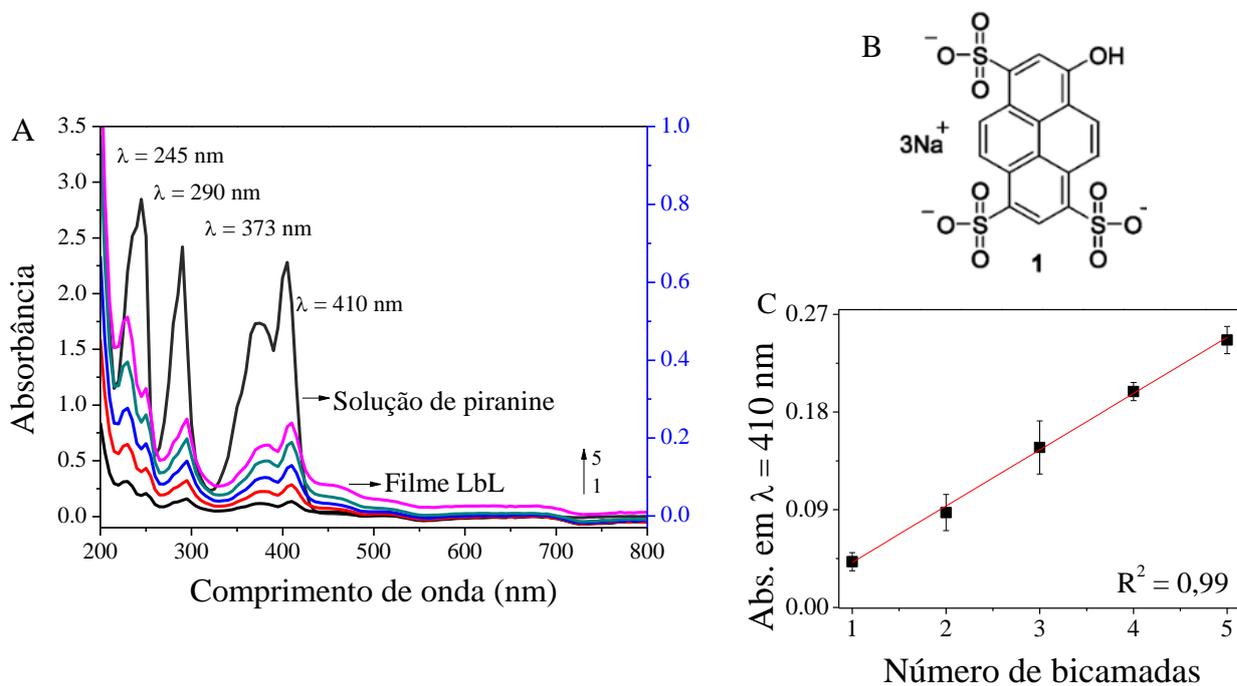
A fim de comparação foi verificada a capacidade de liberação dos filmes  $(PEI/PVS)_2(PBAo/PVS)_5$  e  $(PEI/PVS)_2(PBAm/PVS)_5$  usando os mesmos parâmetros do  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PVS)_5$ . As Figuras 64A e 64B ilustram os espectros dos filmes  $(PEI/PVS)_2(PBAo/PVS)_5$  e  $(PEI/PVS)_2(PBAm/PVS)_5$ , respectivamente, com as 5 bicamadas



que possam agir sob altas concentrações de monossacarídeos. Para investigar a construção do filme com uma molécula de tamanho menor, quando comparada ao PVS que possui longas cadeias poliméricas, foi escolhido como modelo de droga o corante fluorescente piranina, que possui carga negativa, pode substituir o PVS e com isso verificar a fabricação e *disassembly* do filme pela técnica de fluorescência.

A Figura 65A ilustra o espectro da solução de piranina em  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  preparada em água ( eixo y à esquerda) e o filme preparado com duas bicamadas de  $(\text{PEI/PVS})_2$  precursoras e 5 bicamadas de poli(PBAp) intercalado com piranina (PYR) formando o filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBAp/PYR})_5$ , monitorado por espectroscopia UV-vis a cada bicamada (eixo y à direita). Desta figura é possível observar as bandas características da piranina na solução em  $\lambda = 245 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 290 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 373 \text{ nm}$  e  $\lambda = 410 \text{ nm}$ . No filme a banda em  $\lambda = 245 \text{ nm}$  aparece dividida em  $\lambda = 230 \text{ nm}$  proveniente da transição  $n-\pi^*$  do grupo sulfóxido e em  $\lambda = 250 \text{ nm}$ , que é devido à transição  $\pi-\pi^*$  do anel <sup>124</sup> assim como em  $\lambda = 290 \text{ nm}$ . As bandas em  $\lambda = 373 \text{ nm}$  e  $\lambda = 410 \text{ nm}$  são mantidas e aparece uma nova em  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . Essas duas bandas estão relacionadas com o estado de protonação da molécula, ocorrendo um aumento da banda em  $\lambda = 410$  e diminuição em  $\lambda = 450 \text{ nm}$  quando ela está protonada e o oposto quando está deprotonada. <sup>109</sup> Assim, é possível observar uma mudança no estado de protonação da piranina da solução para o filme pela variação dessas bandas. A Figura 65B apresenta a relação entre a absorvância do filme em  $\lambda = 410 \text{ nm}$  *versus* o número de bicamadas, indicando a deposição linear do material sobre o substrato, mesmo utilizando como modelo a molécula pequena piranina.

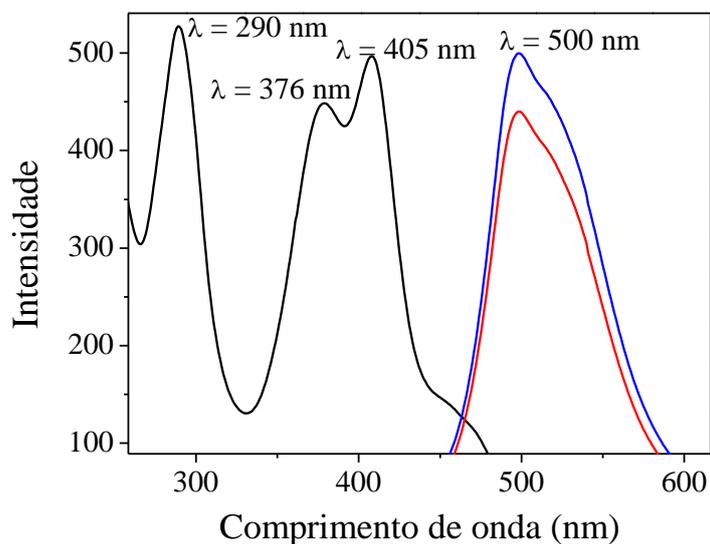
Figura 65 – (A) Espectro de absorvância da solução de piranina, no eixo y á esquerda, e de cada bicamada do filme LbL (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/Pyr)<sub>5</sub> á direita. (B) Estrutura química da piranina. (C) Relação entre a absorvância do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/Pyr)<sub>5</sub> em  $\lambda = 410$  nm e o número de bicamadas.



Fonte: elaborado pelo autor.

A análise do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/PYR)<sub>5</sub> pela técnica de fluorescência pode ser visto na Figura 66. O espectro do filme para emissão em  $\lambda = 500$  nm apresentam as bandas de excitação em  $\lambda = 290$  nm, 376 nm e 405 nm, similar ao espectro de absorção no UV-vis. Quando o filme é excitado em  $\lambda = 376$  nm ou 405 nm ambos resultam na banda de emissão em  $\lambda = 500$  nm, como segue no gráfico em vermelha e azul, respectivamente.

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).



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 7.5.3.2. Análises por FTIR e perfilometria do filme $(PEI/PVS)_2(PBAp/PYR)_5$

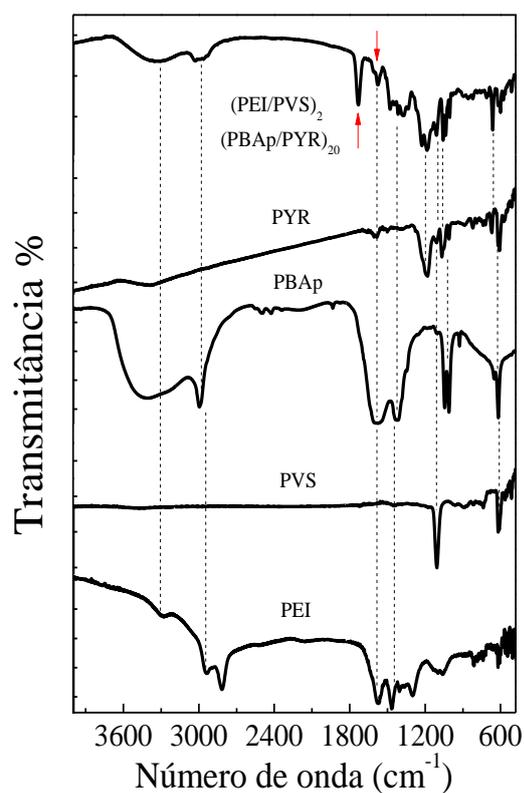
A espectroscopia FTIR dos materiais puros poli(PBAp), PEI, PVS e piranina e do filme LbL  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PYR)_{20}$  podem ser vistos na Figura 67. A atribuição dos picos do poli(PBAp), PEI e PVS já foram feitos na Seção anterior 4.5.2.1 (Análises por FTIR e perfilometria). A piranina apresenta picos em  $3380\text{ cm}^{-1}$  devido à deformação do grupo  $\nu$  O-H, em  $1180$  e  $1110\text{ cm}^{-1}$  relacionados à deformação do  $\nu$  S=O, em  $1062$  e  $1010\text{ cm}^{-1}$  atribuídos ao grupo  $\text{SO}_3$  e  $668$  e  $620\text{ cm}^{-1}$  devido à deformação  $\nu$  C-S.<sup>125,127</sup>

Assim como no filme LbL  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PVS)_{20}$ , no filme  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PYR)_{20}$  aparece o pico alargado entre  $3150$  e  $3600\text{ cm}^{-1}$  devido á deformação do  $\nu$  OH do poli(PBA) e do NH do PEI, e outra entre  $3000$  e  $2915\text{ cm}^{-1}$

relacionado ao C-H do PEI. Também aparecem os picos novos em 1730 e 1580  $\text{cm}^{-1}$  como no filme anterior, como já explicado na Seção 4.5.2.1. Um pico largo pode ser observado na região de 1330 a 1475  $\text{cm}^{-1}$  provenientes da mistura das bandas de PEI e PBA $p$  nessa região. Aparece também em 1186 relacionado ao S=O da piranina e 1110 e 1000 devido á mistura das bandas do PEI, PVS, poli(PBA) e piranina nessa região.<sup>118,127</sup>

Na região de 610-620  $\text{cm}^{-1}$  tem um pico muito semelhante ao do piranina. Em 664 um pico mais alongado foi observado que pode ser a somatória do pico em 650  $\text{cm}^{-1}$  do PBA e 668  $\text{cm}^{-1}$  da piranina. Os espectros confirmam a presença dos materiais no filme, principalmente do PBA $p$  e piranina que estão em maior quantidade e os deslocamentos indicam a interação dos materiais, o que é esperado em filmes LbL.<sup>128</sup> Todos os picos estão listados na Tabela 6.

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.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Atribuições das frequências de vibração dos filmes feitos pelo método *drop casting* de PBAp, PEI, PVS, Piranina e do filme LbL  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PYR)_{20}$ .

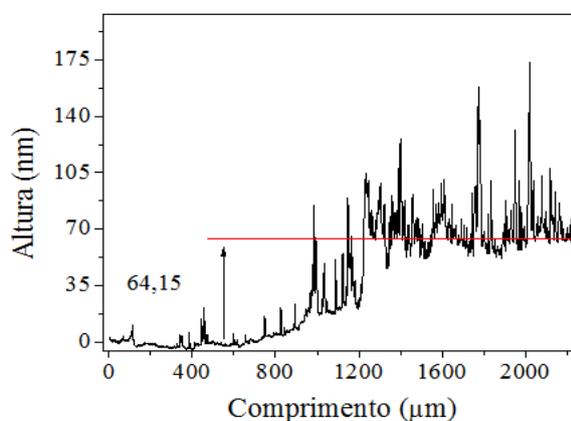
PBAp (cm <sup>-1</sup> )	PEI (cm <sup>-1</sup> )	PVS (cm <sup>-1</sup> )	PYR (cm <sup>-1</sup> )	$(PEI/PVS)_2(PBAp/PYR)_{20}$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
3600- 3200				3600 e 3150	v O-H 118,119

	3280				$\nu$ NH <sup>120,121</sup>
3000				2915-3000	$\nu$ C-H <sup>119</sup>
	2930				$\nu$ CH <sup>120,121</sup>
	2815				$\nu$ CH <sup>120,121</sup>
				1730	C=O
1705					C=O...OH
1580				1580	$\delta$ C-C <sup>118,119</sup>
					$\delta$ NH
	1573				$\delta$ NH 57,120,121
	1465			1330-1475	$\delta$ C-H <sup>122</sup>
1425					$\delta$ C-C <sup>118,119</sup>
	1412				$\delta$ C-H <sup>57</sup>
1382					$\delta$ B-O <sup>119</sup>
1345					$\delta$ B-O <sup>119</sup>
	1300				$\delta$ C-N <sup>123</sup>
			1180	1186	$\delta$ S=O <sup>127</sup>
1117				1110	$\delta$ C-H no plano <sup>119</sup>
			1110		$\delta$ S=O <sup>127</sup>
	1100				$\delta$ C-N <sup>123</sup>
		1107			$\delta$ SO <sub>2</sub> <sup>125</sup>
			1062		$\delta$ SO <sub>3</sub> <sup>127</sup>
	1040				$\delta$ C-N <sup>122</sup>

1010				1000	$\delta$ B-O-H <sup>118</sup>
			1010		$\delta$ SO <sub>3</sub> <sup>127</sup>
926					B-O-H <sup>118</sup>
		744		744	
650				664	$\delta$ BO <sub>2</sub> fora do plano <sup>118</sup>
			668		
		620			$\delta$ C-S <sup>125</sup>
618				610-620	$\delta$ C-C-C <sup>118</sup>
			610-620		

Fonte: Elaborado pelo autor.

A espessura do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAP/PYR)<sub>5</sub> foi determinada por perfilometria, como apresentado na Figura 68. Houve um aumento gradual da altura, provavelmente devido á variação de volume das soluções usadas para preparar o filme, que dificulta o início de todas as bicamadas exatamente no mesmo ponto. O filme tem em média 64,15 nm de espessura, como indicado pela linha vermelha na Figura 68, e picos até 174 nm devido aos agregados que formam sobre o filme, um comportamento comum da técnica LbL. <sup>22</sup>

Figura 68 – Análise de perfilômetria do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/PYR)<sub>5</sub>

Fonte: elaborado pelo autor.

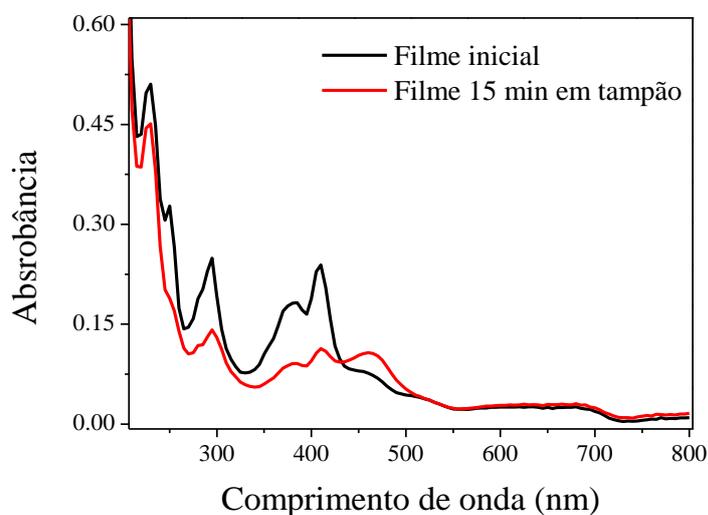
#### 7.5.3.3. Teste *disassembly*

A partir da formação do filme de poli(PBAp) e o corante fluorescente piranina foi possível acompanhar a liberação do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/PYR)<sub>5</sub> através de espectroscopia UV-vis e fluorescência. Para realizar esse teste foram utilizados os mesmo parâmetros determinados para o filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/PVS)<sub>5</sub> na Seção 4.5.2.2 (Teste *disassembly*). O filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/PYR)<sub>5</sub> foi colocado em tampão fosfato pH 7,4, sob agitação e 36°C, durante 60 minutos, sendo que a cada 10 minutos o filme foi avaliado por espectroscopia UV-vis e a solução por espectroscopia de fluorescência.

Os espectros UV-vis do filme com 5 bicamadas e 15 minutos após ter sido mergulhado em tampão pode ser visualizado na Figura 69. No espectro é possível observar um decréscimo da absorbância do filme no tampão, e que a bandas em  $\lambda = 410$  nm desloca para  $\lambda = 450$  nm. Como foi explicado na Seção 4.5.3.1 de fabricação do filme, essa variação está associada ao estado de protonação da molécula. No pH 6, em que a piranina foi preparada e utilizada para a construção do filme ela estava protonada e uma porção das moléculas de piranina interagiu

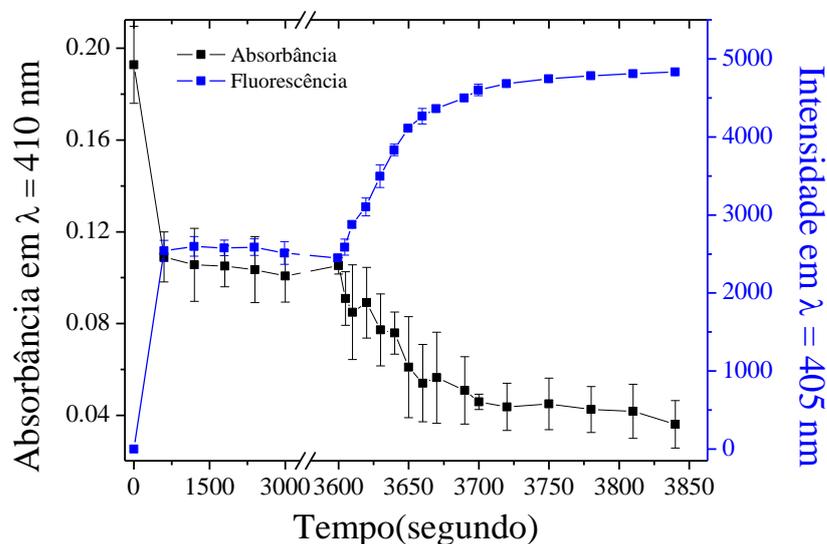
com o poli(PBAp) por ligações de hidrogênio, enquanto a outra por interação eletrostática. Quando esse filme foi mergulhado em pH 7,4 a piranina passou para um estado mais deprotonado e desfez as ligações de hidrogênio, deixando que o filme fosse parcialmente desmontado e restou a porção do filme que foi montada por interações eletrostáticas. Isso pode ser constatado na Figura 70 pelas duas técnicas espectroscópicas, a qual mostra que a absorvância do filme após 10 minutos em tampão decaiu 44,1% em relação à inicial, enquanto a fluorescência da solução aumentou 47,3% (considerando a intensidade da solução em 3850 segundos como 100%). Nos próximos 20, 30, 40, 50 e 60 minutos em tampão, o filme e a solução se mantiveram estáveis. A partir disso, o filme foi mergulhado em frutose 30 mmol.L<sup>-1</sup> preparada em tampão fosfato, pH 7,4, sob agitação e 36°C, para estimar a real resposta do filme ao monossacarídeo. As duas técnicas foram complementares, de forma que enquanto a absorvância do filme diminuía a intensidade da solução da fluorescência aumentava, estabilizando em aproximadamente 180 segundos. Pela absorvância 67,8% do filme foi desmontado (cálculo feito com o valor de absorvância após 60 minutos no tampão).

Figura 69 – Espectros de absorvância do filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBAp/PYR)<sub>5</sub> inicial e após 15 minutos em tampão.



Fonte: elaborado pelo autor.

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,  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ . No eixo direito, em azul está a intensidade das soluções provenientes de cada etapa do processo de liberação.



Fonte: elaborado pelo autor.

O filme  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PVS)_5$  se decompôs 88% em 90 segundos em solução de frutose a  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  enquanto o  $(PEI/PVS)_2(PBAp/PYR)_5$  se decompôs 67,8% em 180 segundos em solução de frutose a  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Esta diferença de comportamento pode estar associada à força da interação eletrostática maior entre o poli(PBAp) e piranina do que com o PVS. Cada material usado resulta em um filme LbL com características particulares, porém tanto o PVS quanto o corante podem ser empregados nos sistemas de resposta a frutose. Esse resultado mostra a versatilidade do sistema e possibilidade de emprego de outros materiais e biomoléculas.

## 7.6. Conclusão

O pH do poli(PBA) tem uma relação direta com a carga do polímero. Em pH ácido a carga superficial é predominantemente positiva, diminuindo gradativamente com o aumento da acidez, devido à incorporação de mais uma hidroxila ao grupo borônico, tornando-o mais negativo. Desta forma o pH 7,3-7,4, foi o escolhido para o estudo, no qual a carga de superfície do PBA<sub>p</sub> é 25,4 mV, por ser um valor próximo dos polieletrólitos usados em filmes LbL e estar na faixa fisiológica.

Entre os isômeros de PBA *orto*, *meta* e *para*, o *para* foi o que apresentou o maior índice de crescimento, indicado pelo coeficiente angular obtido aplicando a equação da reta nos gráficos de crescimento dos filmes. No isômero *para* o BA está mais distante do grupo positivo que interage com o polieletrólito de carga oposta, apresentando menor interferência do que o *meta* e *orto*. O mesmo padrão foi observado nos testes *disassembly* do filme, no qual o filme com o isômero *para* foi o que apresentou maior porcentagem de *disassembly*. Portanto, o PBA *para*, foi o escolhido para os demais experimentos.

A espectroscopia UV-vis comprovou a montagem dos dois filmes a cada camada de poli(PBA) usado como polication intercalado com os poliânions PVS ou piranina, com a formação de (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBA<sub>p</sub>/PVS)<sub>n</sub> e (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBA<sub>p</sub>/PYR)<sub>n</sub>, com a apresentação das principais bandas de absorção do PBA e da piranina, respectivamente. A técnica FTIR apresentou picos correspondentes a cada material usado e alguns picos deslocados indicando sua presença nos filmes e possíveis interações entre seus componentes.

Os testes *disassembly* indicaram que o filme (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBA<sub>p</sub>/PVS)<sub>n</sub> não apresenta resposta à glicose, mas sim à frutose, devido ao valor da constante de ligação do PBA e frutose ser maior do que com a glicose. Os parâmetros para determinar o tempo de decomposição dos filmes foram otimizados e foi encontrado que em 10 mmol.L<sup>-1</sup> de frutose o (PEI/PVS)<sub>2</sub>(PBA<sub>p</sub>/PVS)<sub>5</sub> desmonta 88% em 90 segundos, enquanto o

$(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBA}_p/\text{PYR})_5$  desmonta 67,8% em 180 segundos em uma solução de  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$  de frutose. Isso indica que apesar do filme  $(\text{PEI/PVS})_2(\text{PBA}_p/\text{PYR})_5$  ser construído com uma molécula de poliânion relativamente pequena em relação ao polímero PVS, a interação é mais forte, o que têm influência no processo, mas ainda assim permite a construção e aplicação deste filme em sistemas inteligentes de resposta á frutose com o uso de moléculas pequenas. Em relação aos demais sistemas criados com PBA este oferece uma maior seletividade e resposta extremamente rápida para a frutose.

## 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 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  $\beta$ -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, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C 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 CO<sub>2</sub> 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<sup>o</sup>.; 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>.