

Relatório Final de Pesquisa - CNPq



Fabrication of hybrid SiC and nanodiamond particles with immobilised photoreceptors and their bio-analytical application for controlled drug delivery

Pesquisadora: Dr. Eloah Pereira Ávila

Processo CNPq: 150967/2017-9

Rio de Janeiro, novembro de 2018

SUMÁRIO

1. Resumo	4
2. Abstract	5
3. Introdução	5
3.1. Sistema de liberação controlada de fármacos e sua importância	5
3.2. Nanodiamantes: definição e aplicações	6
3.3. Grupos protetores fotocliváveis	9
4. Objetivos	9
4.1. Objetivo geral	9
4.2. Objetivos específicos	10
5. Resultados e discussão	10
5.1. Preparação dos linkers fotorremovíveis	11
5.1.1. Preparação do alcino	14
5.1.2. Preparação do grupo azida	16
5.1.3. Preparação de um 1,2,4-triazol fotorremovível	20
5.2. Preparação dos Nanodiamantes (ND)	21
5.2.1. Preparação dos ND-COOH	22
5.2.2. Preparação dos ND-OH	26
5.2.3. Funcionalização do ND-OH	27
5.2.4. Funcionalização do ND-COOH	29
6. Conclusões e perspectivas futuras	30
7. Parte Experimental	31
7.1. Materiais e métodos	31
8. Referências	31

1. Resumo

As nanopartículas têm sido utilizados em vastas aplicações, desde o armazenamento de energia até a biotecnologia. A natureza versátil destes materiais está ligada à possibilidade de adaptar de forma controlada as propriedades físicas e químicas dos materiais. Materiais inorgânicos demonstraram apresentar estabilidade química e estrutural superior em comparação com materiais orgânicos. Assim, materiais nanoestruturados inorgânicos ganharam considerável importância em diversas aplicações biotecnológicas relacionadas a materiais compósitos para implantes, sensores e liberação de fármacos. Os sistemas de administração de fármacos desempenham vários papéis, tais como melhorar a fraca solubilidade, aumentar a estabilidade *in vivo* e otimizar a biodistribuição e a farmacocinética dos medicamentos. Eles também podem ser usados para direcionar tecidos específicos e tipos de células através da funcionalização apropriada. No entanto, sua aplicação biotecnológica ainda é bastante limitada que se deve à eventual citotoxicidade e baixa estabilidade coloidal da maioria destas partículas. Entre estas partículas, as estruturas baseadas em carbono chamam a atenção de diversos grupos de pesquisas devido à biocompatibilidade, alta área de superfície e estabilidade. Deste modo, se faz necessário a preparação de novas nanopartículas que apresentam baixas citotoxicidades, condições essenciais para direcionar o desenvolvimento de novos sistemas para administração de medicamentos.

Entre os materiais à base de carbono, as partículas de nanodiamante (NDs) começaram a emergir como novas candidatas para aplicações promissoras no campo da nano-biotecnologia, como sonda de imagens e transportadoras de medicamentos. Os NDs não apresentam citotoxicidades quando comparados a outros tipos de nanopartículas, como por exemplo, partículas de ouro. Entre as estratégias não penetrantes do tratamento antineoplásico, as terapias fotodinâmica (PDT) e fototérmica (PTT) são consideradas as mais eficazes para o futuro. Até agora, o desenvolvimento de PDT e PTT é limitado pela capacidade da penetração da luz no tecido. Esta pesquisa está focada na elaboração e investigação de novos nanomateriais híbridos que podem ser usados na terapia invasiva estabelecida mais recentemente, com base no tratamento ultrassonográfico (Sonodinâmica) e de raios-X moles (Fotodinâmica) do câncer. Neste projeto, uma abordagem de preparação de nanocompósitos de NDs funcionalizados foi realizada. A ideia do projeto é baseada na funcionalização de NDs com grupos fotorremovíveis que, na presença de radiação UV, pode liberar fármacos de modo seletivo para dentro da célula. A imobilização covalente de foto-sensibilizadores e componentes bioativos na superfície de nanocompósitos via linker foto-clivável é planejada para garantir sua liberação controlada.

2. Abstract

Nanoparticles have been used in vast applications ranging from energy storage to biotechnology. However, its biotechnological application is still quite limited due to the eventual cytotoxicity and low colloidal stability of most of these particles. Among these particles, carbon-based structures attract the attention of various research groups due to biocompatibility, high surface area and stability. Thus, it is necessary to prepare new nanoparticles that have low cytotoxicities, essential conditions to direct the development of new systems for administering drugs. Among carbon-based materials, nanodiamond particles (NDs) have begun to emerge as new candidates for promising applications in the field of nano-biotechnology, such as imaging and drug carriers. NDs do not present cytotoxicity when compared to other types of nanoparticles, such as gold particles. Among the non-invasive strategies of antineoplastic treatment, photodynamic (PDT) and photothermal (PTT) therapies are considered the most effective for the future. So far, the development of PDT and PTT is limited by the ability of light penetration into tissue. This research is focused on the elaboration and investigation of new hybrid nanomaterials that can be used in the most recently established invasive therapy, based on ultrasound (sonodynamics) and soft X-ray (Photodynamic) treatment of cancer.

In this project, an approach to the preparation of nanocomposites of functionalized NDs was performed. The idea of the project is based on the functionalization of NDs with photorechargeable groups that, in the presence of UV radiation, can selectively release drugs selectively into the cell. The covalent immobilization of photosensitizers and bioactive components on the surface of nanocomposites via photo-cleavable linker is planned to guarantee their controlled release.

3. Introdução

3.1. Sistema de liberação controlada de fármacos e sua importância

Os métodos convencionais de administração são desenvolvidos para liberar rapidamente o agente ativo (moléculas bioativas) ou terapêutico (fármaco). Geralmente são empregados sistemas diluentes solúveis com o intuito de favorecer a dissolução do agente, embora manter os níveis de sua concentração dentro da faixa terapêutica ainda seja um grande desafio¹. Em terapias convencionais de administração, a concentração do fármaco na corrente sanguínea aumenta até atingir o nível máximo de dissolução (pico) e então começa a declinar. A partir deste ponto, é necessária a

administração de nova dose para manter os níveis de concentração. Com o objetivo de contornar este problema, o avanço científico no campo da nanotecnologia vem ganhando esforços para utilizar sistemas nanoestruturados para a liberação controlada com o objetivo de modular a liberação do fármaco na faixa terapêutica por tempo prolongado utilizando-se dosagem única. A distribuição de fármacos pode melhorar a solubilidade, aumentar a estabilidade *in vivo*, além de aperfeiçoar a biodistribuição e a farmacocinética dos medicamentos. Para realizar o transporte de medicamentos no organismo, uma alternativa é o uso de compostos nanoestruturados. Uma outra maneira se dá pelo agrupamento destas moléculas pelo lado externo do material, em volta da superfície².

No que diz respeito a esta categoria, os materiais à base de carbono, como fulerenos, nanotubos de carbono, Nanodiamantes (NDs) e pontos quânticos de óxido de grafeno (GOQDs, do inglês, Graphene oxide quantum dots) foram investigados como veículos e para tratamento anticâncer e antimicrobiano. Esta classe de nanocompostos chama a atenção devido à sua biocompatibilidade, alta área de superfície e propriedades úteis, como a fotoluminescência³⁻⁶.

3.2. Nanodiamantes: definição e aplicações

Nanodiamantes (NDs) consistem em partículas de carbono com tamanho de aproximadamente 5 nm. Sua forma geral é esférica ou elíptica; no centro se encontra uma rede de diamante principalmente de arranjo cúbico, composta principalmente por carbono. Sua superfície se assemelha à estrutura de grafite enquanto o núcleo se assemelha à estrutura do diamante^{7,8} (Figura 1). A natureza versátil desses materiais está ligada à possibilidade de se adaptar de forma controlada as propriedades físicas e químicas dos materiais.

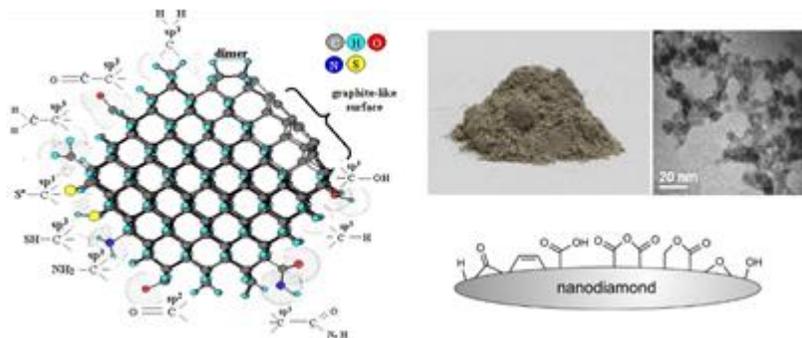
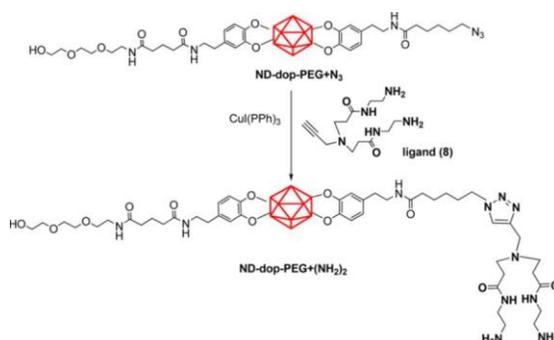


Figura 1. a) Estrutura interna do Nanodiamante; b) superfície “like” grafite e a imagem de nanodiamantes individuais agrupados e sua representação

Estudos recentes mostram que a superfície contém grupos funcionais como hidroxilas, epóxidos, cetonas, entre outros. Desta forma, é possível funcionalizar sua superfície através de ligações covalentes com compostos orgânicos⁷. Suas principais vantagens são o baixo custo de produção, alta biocompatibilidade e baixa citotoxicidade⁹. Com isso, estas partículas têm sido amplamente estudadas para aplicações principalmente biológicas e eletrônicas.

O potencial terapêutico dos NDs como transportadores de droga foi mostrado pela primeira vez por Ho e colaboradores que conseguiram sintetizar NDs adsorvidos com doxorrubicina, medicamento utilizado na terapia contra o câncer.¹⁰ Diabetes e câncer são apenas dois exemplos em que o tratamento com o fármaco funcionalizado com NDs podem ter um potencial terapêutico real.¹¹ A insulina adsorvida sobre NDs foi mostrada para dessorver ao longo do tempo. Daqui se conclui que este último sistema pode potencialmente servir como uma terapia de liberação controlada para os diabéticos, negando assim a necessidade de injeções de insulina.^{12,13}

Uma outra aplicação no ramo da química medicinal foi descrita por Khanal e colaboradores, no qual desenvolveram um trabalho imobilização simultânea de moléculas bioativas de direcionamento e medicamentos na nanoestrutura NDs para a conveniência de detecção e tratamento alvejado.¹⁴ Um material modelo contendo âncoras de dopamina trietilenoglicol (EG) e azida (N₃) modificada (dop-EG e dop-N₃) foi sintetizada. A presença de EG, cadeia oxialquílica, é responsável pelo aumento da solubilidade de NDs em água e meios biológicos, enquanto o grupo-N₃ permite modificação pós-sintética do NDs usando "*click chemistry*", metodologia conhecida na literatura para a obtenção de 1,2,4-triazóis, unidades que podem conferir bioatividade (Esquema 1), além de apresentarem resistência a reações de oxidação, hidrólise, entre outras e também a facilidade destes anéis em realizar ligações de hidrogênio intermoleculares. Os triazóis também apresentam atividade antibacteriana.¹⁵



Esquema 1 - Imobilização de trietenoglicol e azida na superfície de NDs (Khanal *et al.* 2015)

Um outro estudo demonstrou que NDs com carboidratos imobilizados têm uma interação específica com proteínas de membrana bacterianas, consolidando sua aplicação antimicrobiana.^{14,16,17} Portanto, partículas de nanodiamantes vêm surgindo como candidatos especialmente promissores em diversos ramos da Química Medicinal. Após estudos recentes, observou-se que os NDs não apresentam a toxicidade frequentemente observada com outras nanopartículas, e especialmente de AuNPs, reforçando ainda mais a sua adequação em sistemas de liberação de fármacos e nanoplataformas de imagem.¹⁸⁻²⁴

Acredita-se que os NDs e GOQDs sejam mais promissores que os fulerenos e os nanotubos de carbono a aplicação biomédica devido à sua ausência de citotoxicidade quando comparadas a outros tipos de nanopartículas e por esta razão, começaram a surgir como candidatos para aplicações promissoras na área de nanobiotecnologia.^{3,4} NDs e outros compostos à base de carbono não mostram toxicidade quando comparadas a nanopartículas de ouro, em especial, tornando-os ideais plataformas de entrega de droga em nano-escala.^{25,26}

Como estratégia para liberação controlada, propõe-se neste projeto a síntese de moléculas orgânicas que são sensíveis a um agente externo, que permite a clivagem seletiva da ligação de interesse, no sítio onde o fármaco é conectado às nanopartículas realizando a liberação da molécula de interesse, neste caso, o medicamento. Como agente externo, a luz é uma ferramenta simples e “verde” utilizada em reações químicas, utilizada tanto para reações em síntese de moléculas mais complexas quanto de clivagem específicas de ligações químicas.

3.3. Grupos protetores fotocliváveis

Grupos protetores fotorremovíveis (chamados de fotoentregador, fotocliváveis ou fotoativáveis) são compostos que, na presença de uma radiação eletromagnética específica, são capazes de clivar seletivamente uma ligação. Devido a essa propriedade, estas moléculas são conhecidas por permitir a liberação controlada de outros compostos químicos tais como bioagentes (neurotransmissores, moléculas de sinalização celular), inseticidas, feromônios, entre outros.²⁷

Os critérios para um composto ser um bom grupo fotorremovível (PPG, do inglês Protecting Photoremovable Group) são: forte absorção em comprimentos de onda acima de 300 nm, devem ser estáveis no meio reacional durante a fotólise, atravessar barreiras biológicas (membranas celulares); afinidade a componentes alvo específicos: locais de ligação em células cancerosas ou o local ativo de uma enzima; os subprodutos devem ser transparentes ao comprimento de onda de irradiação.

Como exemplos, grupos cumarina-4-ilmetil são compostos estáveis, com propriedades fluorescentes. Skwarczynski *et al.* desenvolveram um trabalho envolvendo a ativação pela luz visível do paclitaxel (antitumoral) ligado à cumarina. Esta estratégia consiste na clivagem da ligação benzílica pela luz que, por sua vez, permite a liberação do fármaco no local de interesse.²⁸ Grupos derivados de *o*-nitrobenzeno também são comumente utilizados como espécies fotocliváveis.

O desenvolvimento dinâmico dos sistemas de liberação de medicamentos utilizando NDs como veículos abre perspectivas de novas formulações de medicamentos para combater doenças como o câncer e diabetes. Além disso, o uso da luz visível ou ultravioleta para a liberação controlada de fármacos na tentativa de minimizar os problemas causados pela administração convencional (toxicidade e resistência bacteriana) é uma estratégia interessante na presença de grupos fotossensíveis.²⁷ Visto também a promissora aplicação dos materiais nanoestruturados à base de carbono em Química Medicinal, propõe-se neste projeto a síntese de nanodiamantes funcionalizados com compostos orgânicos fotossensíveis.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Visto que NDs são materiais interessantes no ponto de vista biotecnológico e promissores para a química medicinal, este projeto de pesquisa tem como foco a elaboração e investigação de novos nanomateriais híbridos de nanodiamantes que podem ser utilizados em sistemas de liberação

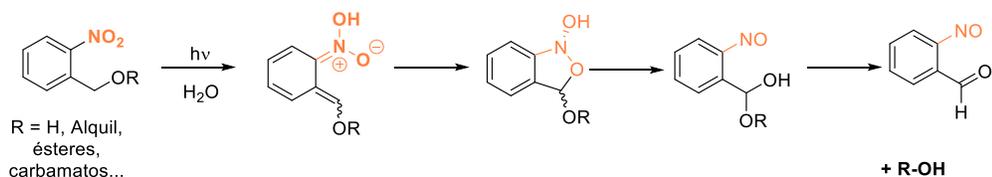
controlada de fármacos utilizando fotossensibilizadores através de tratamento com raios-X. Os nanomateriais propostos devem ter alta estabilidade coloidal em líquidos fisiológicos e baixa citotoxicidade.

4.2. Objetivos específicos

A proposta consiste em sintetizar nanodiamantes funcionalizados através de ligações covalentes com grupos fotossensíveis, imobilizados à superfície. Nanodiamantes ricos em grupos hidroxila e carboxilas serão preparados. A estratégia consiste na imobilização covalente de componentes bioativos na superfície de nanodiamantes através de ligantes (*linkers*) fotocliváveis, e assim garantir a liberação de controlada de fármacos adsorvidos na superfície.

5. Resultados e discussão

Para a funcionalização dos nanodiamantes, a molécula chave responsável para a liberação controlada de fármaco em questão deverá ser fotorremovível (PPGs) para posteriormente fazer o *link* entre a superfície do ND à molécula bioativa desejada. Entre as porções fotocliváveis mais populares através das quais se ligam biomoléculas consiste em um grupo contendo uma porção *o*-nitrobenzila, devido às propriedades únicas da função nitro na posição *orto* incluindo sua estabilidade sob luz ambiente, sua clivagem limpa após exposição à irradiação UV, e as reações de fragmentação de nanossegundos que sofre na fotoexcitação.²⁹

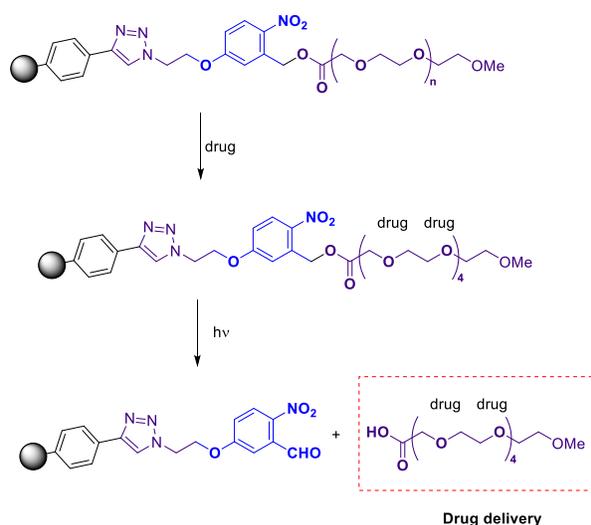


Esquema 3 – Mecanismo proposto da fotoclivagem de grupos *o*-nitrobenzila

Desta forma, propomos a preparação de dois derivados de um álcool benzílico (**1**), sendo o primeiro a partir da incorporação de um grupo funcional alcino (**2**) a um grupo hidroxila e incorporando um grupo azida (**3**), para duas estratégias distintas de imobilização à superfície de NDs.

A porção em azul consiste no grupo fotoclivável, a porção roxa é referente à cadeia oxialquílica cuja função é aumentar a solubilidade dos NDs em meios biológicos, adsorver o medicamento através de interações de hidrogênio e diminuir a hidrofobicidade e consequentemente evitar com que os NDs se agreguem.

O primeiro fragmento pode ser ancorado à superfície de ND, através de uma reação de esterificação entre um grupo OH livre presente no ND e um fragmento contendo grupo azida e uma função ácido carboxílico, na presença de um ativador de ácido carboxílico como EDC e DCC e DMAP como base, obtendo como produto o ND-N₃. As moléculas orgânicas sintetizadas serão caracterizadas por RMN de ¹H, RMN de ¹³C e infravermelho.



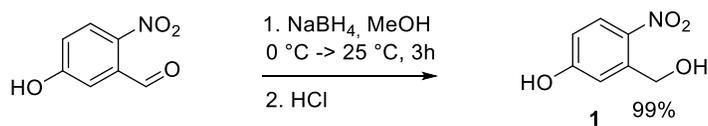
Esquema 4 – Esquema geral para a preparação de nanodiamantes funcionalizados com grupo fotorremovível para *drug delivery*

Deste modo, o grupo fotorremovível contendo um grupo alcino pode ser ancorado ao ND-N₃ através de uma reação de *click chemistry*, metodologia já descrita na literatura para obtenção de 1,2,4-triazóis, compostos conhecidos por suas aplicações biológicas. Assim, a preparação dos *linkers* fotorremovíveis será descrita a seguir.

5.1. Preparação dos linkers fotorremovíveis

O composto de partida tanto para o alcino quanto para a azida fotorremovíveis foi o 5-hidroxi-

2-nitrobenzaldeído, comercialmente disponível, e em seguida sintetizou-se o álcool 5-hidroxi-2-nitrobenzílico através de uma reação de redução (Esquema 5)



Esquema 5 – Preparação do álcool 5-hidroxi-2-nitrobenzílico, precursor para os demais grupos fotorremovíveis

A obtenção do álcool (1) se deu a partir da redução do aldeído 5-hidroxi-2-nitrobenzaldeído (1,0 equivalente), em metanol (0,15 M) na presença de boridreto de sódio (4,0 equivalentes) em metanol como solvente a 0 °C. Em seguida, a mistura reacional ficou sob agitação à temperatura ambiente por 3 horas até que todo material de partida pudesse ser convertido no produto (acompanhando-se o curso da reação por CCD, eluente: hexano/AcOEt 8:2). Evaporou-se o solvente em um rotaevaporador sob pressão reduzida e em seguida, adicionou-se uma solução de HCl 1,0 M até atingir o pH 6. Extraiu-se a solução com AcOEt (3 vezes) e a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro. Por fim, o solvente foi removido em um rotaevaporador e o produto final consistiu em um sólido amarelo (rendimento quantitativo).

Pela análise do espectro de RMN de ^1H , pôde-se observar a evidência reacional a partir do desaparecimento do sinal característico do H de aldeído em torno de 10,0 ppm e o aparecimento de um sinal em 4,82 ppm referente aos hidrogênios benzílicos, além de um sinal largo em 6,54 ppm característico de hidrogênio da hidroxila (Figura 2).

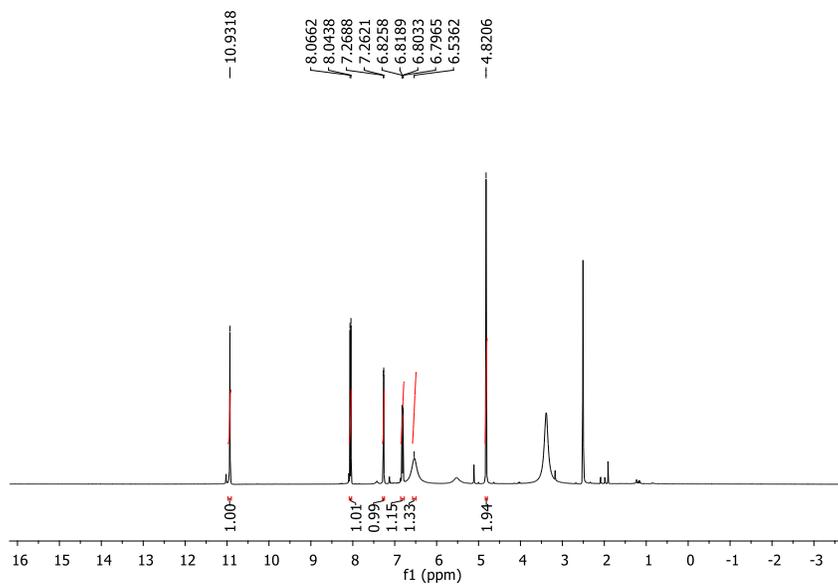


Figura 2 – Espectro de RMN de ^1H do álcool 5-hidroxi-2-nitrobenzílico **1** (DMSO- d_6 , 400 MHz)

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C , pôde-se observar sinais entre 163-114,3 ppm referentes aos carbonos aromáticos e um sinal em 60,8 referente ao carbono benzílico.

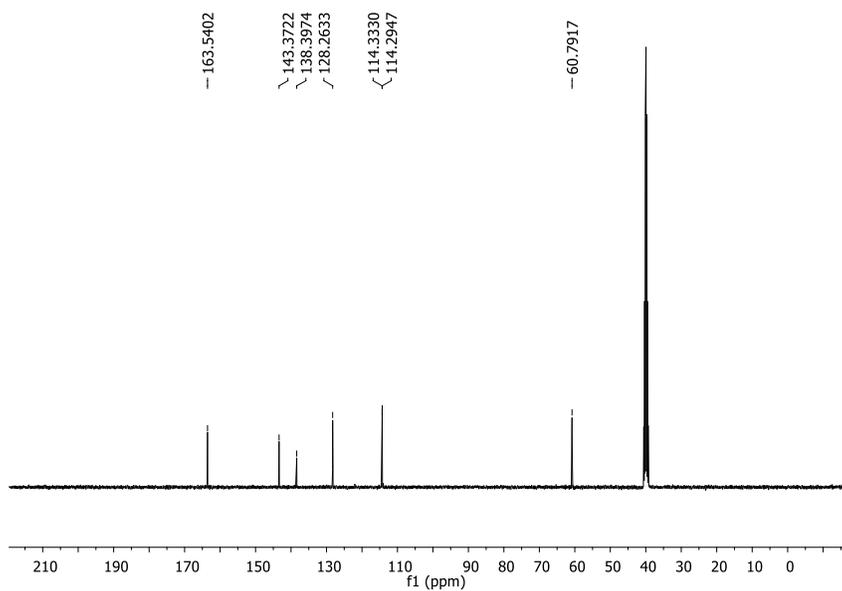


Figura 3 – Espectro de RMN de ^{13}C do álcool 5-hidroxi-2-nitrobenzílico (DMSO- d_6 , 100 MHz)

Pela análise do espectro na região do infravermelho, pôde-se observar uma banda em 3293 referente à presença de grupos hidroxila, em 1600 cm^{-1} referente ao estiramento C=C na região de aromáticos, em 1313 cm^{-1} referente ao grupo nitro. Além disso, não se observou banda característica de aldeídos (estiramento C=O na região de 1700 cm^{-1})

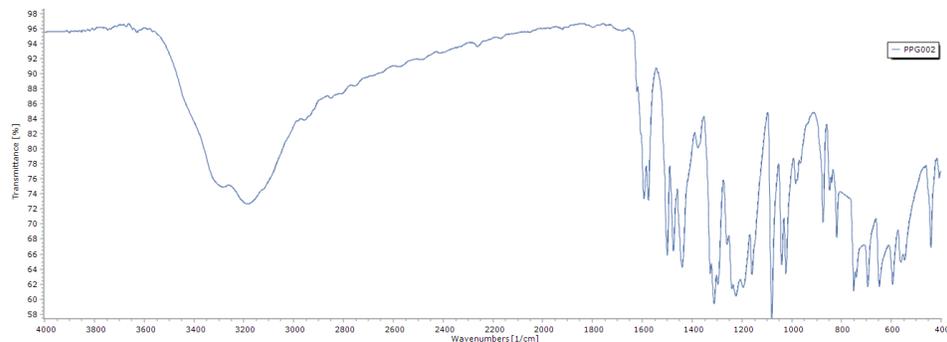
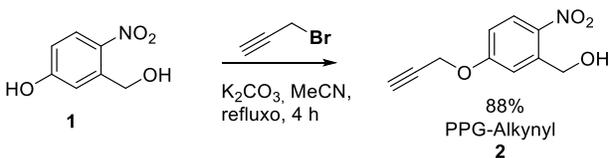


Figura 4 – Espectro de Infravermelho do álcool **1**

5.1.1. Preparação do alcino

Tendo o álcool em mãos, previamente caracterizados, prosseguiu-se com a obtenção do éter propargílico **2** (PPG-Alkynyl) a partir da alquilação do mesmo com brometo de propargila, como é mostrado no Esquema 6.³¹



Esquema 6 – Preparação do grupo fotorremovível contendo o grupo alcino **2** (PPG-Alkynyl)

A metodologia consistiu na preparação da solução do álcool **1** (1,0 equivalente) em acetonitrila (0,5 M) sob agitação vigorosa. Em seguida adicionou-se bicarbonato de potássio (1,5 equivalente), éter de coroa (0,15 equivalente), agitando por meia hora. Adicionou-se o brometo de propargila (1,2 equivalente) e a reação ficou em refluxo por 4 horas. Após o fim da reação (acompanhada por CCD, eluente Hex/AcOEt 8:2), evaporou-se o solvente sob pressão reduzida e em seguida o produto foi solubilizado em uma pequena quantidade de diclorometano e purificado através de uma coluna filtrante, obtendo-se um sólido amarelo com 88% de rendimento.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H , pôde-se observar um simpleto em 5,03 ppm referente aos hidrogênios benzílicos; um duplete centralizado em 4,83 ppm ($J = 2,32$ Hz) referente aos hidrogênios metoxílicos, e por fim, o aparecimento de um tripleto centralizado em 2,61 ppm ($J = 2,28$ Hz) referente ao H metínico.

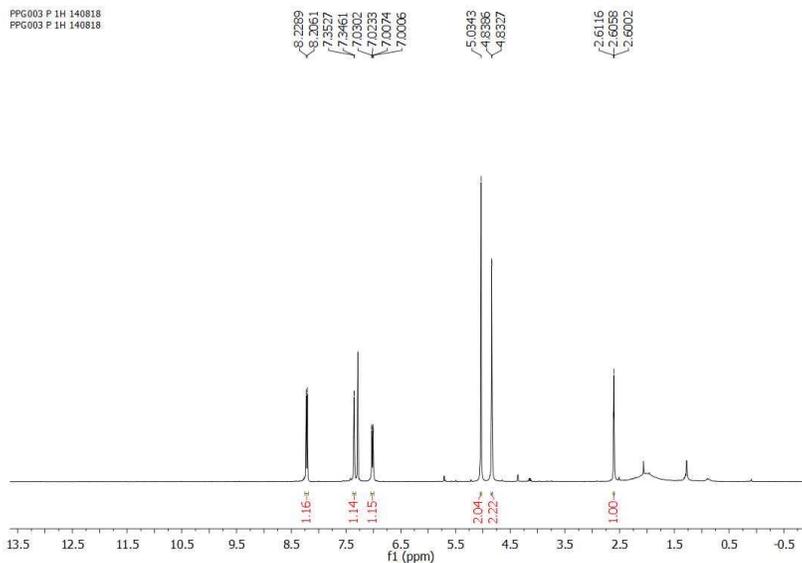


Figura 5 – Espectro de RMN de ^1H do grupo fotorremovível-alquinil (PPG-Alkynyl) (CDCl_3 , 400 MHz)

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C , pôde-se observar sinais entre 161,9-114,0 ppm referentes aos carbonos aromáticos; dois sinais em 77,2 e 77,1 ppm referente aos carbonos alquínicos; um sinal em 62,9 ppm referente ao carbono benzílico; e um sinal em 56,3 ppm referente ao carbono sp^3 do grupo propargila.

Pela análise do espectro de infravermelho, pôde-se observar uma banda em 2125 cm^{-1} , característica de grupos alcinos.

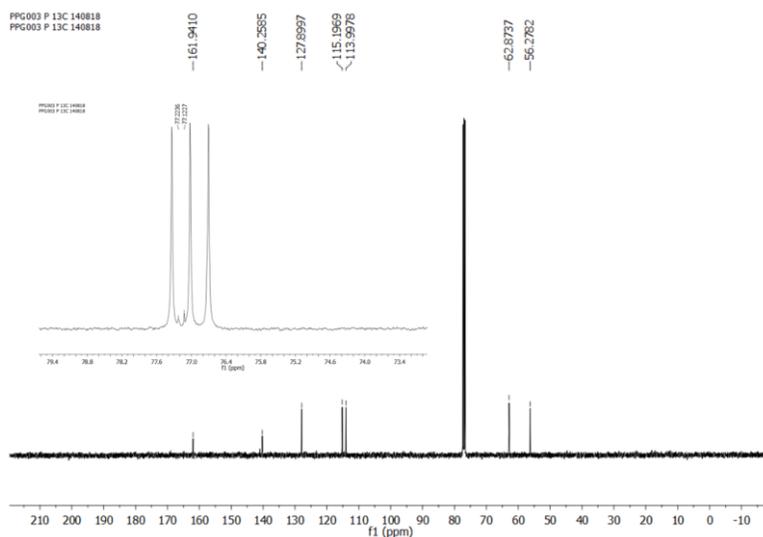


Figura 6 – Espectro de RMN de ^{13}C do grupo fotorremovível-alkinil (PPG-Alkynyl) (CDCl_3 , 100 MHz)

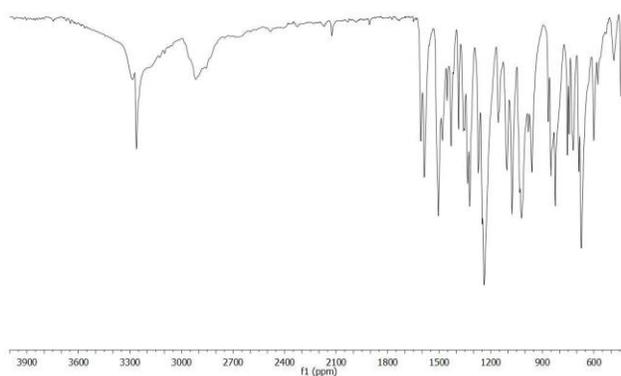


Figura 7 – Espectro de Infravermelho do composto **2** (PPG-Alkynyl)

O segundo *linker* fotorremovível consiste em uma azida terminal para ancorar em superfícies de nanodiamantes contendo um alcino terminal (ND-Alkynyl). A estratégia utilizada consistiu em uma reação de alquilação do fenol utilizando 1,3-dihaleto, que por sua vez, ao reagir com um grupo azida, obtém-se a azida fotorremovível (PPG-N₃).

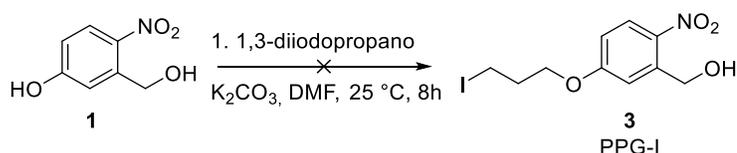
5.1.2. Preparação do grupo azida

A obtenção da azida foi realizada a partir de duas etapas: a primeira consistiu na alquilação do

aldeído com um haleto terminal e a segunda a reação de obtenção da azida. Para a obtenção do haleto a reação foi otimizada.

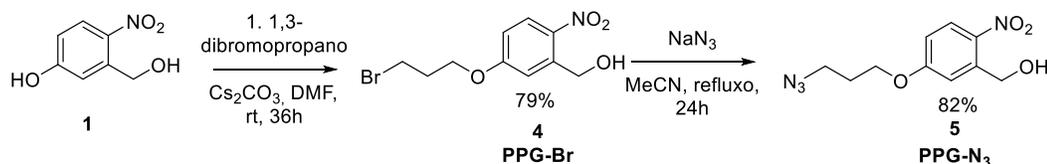
Em um primeiro momento, utilizou-se uma metodologia já descrita na literatura partindo-se de 1,3-diiodopropano, uma vez que o iodo é um bom grupo abandonador e desta forma, obter-se-ia o composto **3** almejado.

Baseado na metodologia descrita por Yan e colaboradores, utilizou-se 1,3-diiodopropano como agente alquilante (eletrófilo), uma vez que o iodo é um bom grupo abandonador.³² As condições reacionais da literatura consistiu no uso de um pequeno excesso (1,2 equivalente) do eletrófilo e base (1,5 equivalente) em DMF (0,67 M) como solvente a 25 °C. A reação foi acompanhada por CCD e após 4 horas de reação, todo o material de partida havia sido consumido. A caracterização do composto obtido foi feita por RMN de ¹H e para a surpresa, o produto obtido era de dimerização, ou seja, o haleto intermediário sofreu ataque intermolecular pelo fenóxido. Outras tentativas foram realizadas na tentativa de diminuir a reatividade do sistema, como a diminuição da concentração e temperatura, variando as bases (como o uso de carbonato e bicarbonato de potássio), e mesmo assim os resultados não foram almejados.



Esquema 7 – Tentativa de obtenção do álcool 5-(3-Iodopropóxi)-2-nitro benzílico, intermediário para a obtenção da azida

Uma outra alternativa consistiu no uso de um eletrófilo menos reativo. Desta forma, utilizou-se o 1,3-dibromopropano, uma vez que o bromo é menos reativo que o iodo. Após diversas tentativas modificando temperatura, concentração e as bases, a condição ideal consistiu-se no uso de 4 equivalentes do eletrófilo, pequeno excesso (1,2 equivalente) de Cs₂CO₃, em DMF (0,13 M em relação ao reagente limitante), e após 36 horas, todo o material de partida havia sido consumido (acompanhamento da reação por CCD).



Esquema 8 – Preparação do álcool 5-(3-azidopropóxi)-2-nitro benzílico (PPG-N₃)

Após a caracterização do composto por RMN de ¹H e ¹³C, a evidência de obtenção do produto se deu através do desaparecimento do sinal largo em 10 ppm característico de hidrogênio fenólico; o aparecimento de hidrogênios alquílicos: um tripleto centralizado em 4,26 ppm referente aos hidrogênios metoxílicos (H₁₀), *J* = 6,10 Hz, um tripleto centralizado em 3,63 ppm referente aos hidrogênios metilênicos vicinais ao bromo (H₁₂), *J* = 6,10 Hz, um quinteto em 2,38 ppm referente aos hidrogênios metilênicos centrais (H₁₁), *J* = 6,10 Hz.

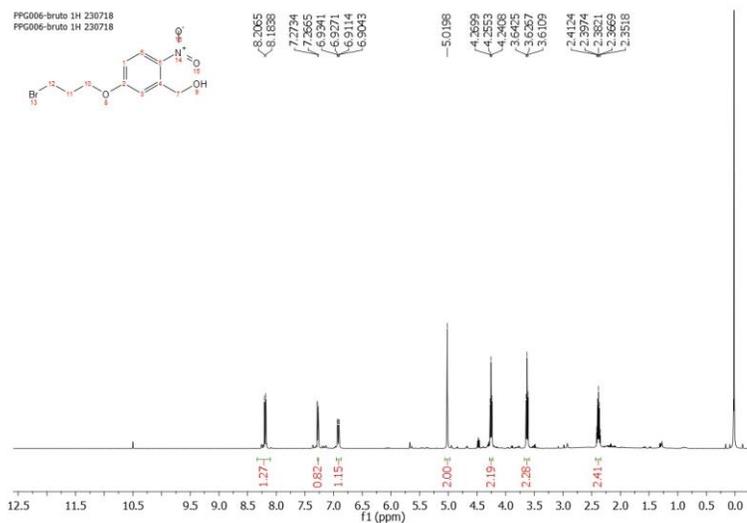


Figura 8 – Espectro de RMN de ¹H do composto **4** (PPG-Br) (CDCl₃, 400 MHz)

Pela análise do espectro de RMN de ¹³C pôde-se observar os carbonos alquílicos: 29,4 ppm referente ao C₁₁; 31,9 ppm referente ao C₁₂ e 62,9 ppm referente ao carbono metoxílico.

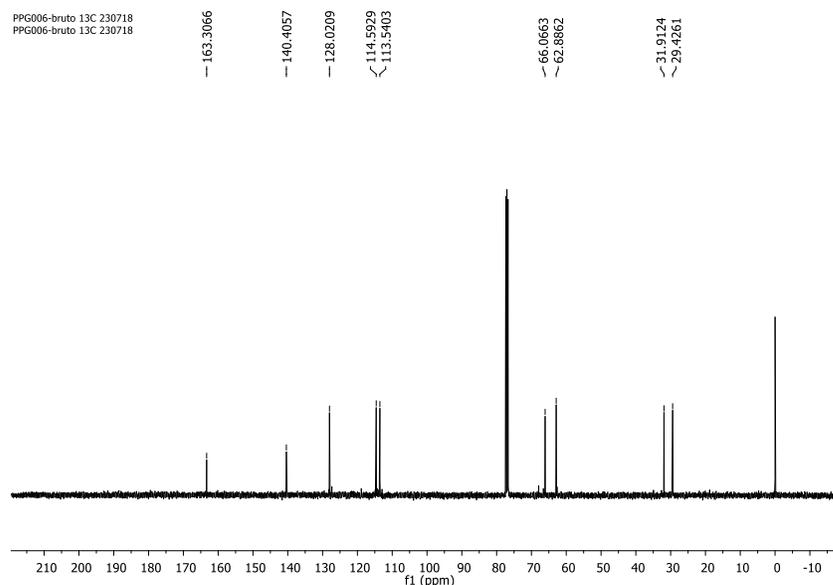


Figura 9 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **4** (PPG-Br)

Tendo em mãos o intermediário **4** (PPG-Br), a próxima etapa consistiu na obtenção da azida (PPG- N_3) utilizando-se uma metodologia da literatura desenvolvida por Shakiba e colaboradores³³. Em uma solução contendo o intermediário **4** em MeCN, na presença de 5,0 equivalentes de azida de sódio, a mistura foi mantida em agitação e sob refluxo por 24 horas (a reação foi acompanhada por CCD). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido obtido extraído com água para remover o excesso de azida de sódio e o produto obtido foi então caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C .

Pela análise do espectro de RMN de ^1H , pôde-se observar a sutil mudança na região alquílica, onde o bromo foi substituído pela azida (Figura 10). Pôde-se observar tripleto em 4,20 ppm, $J = 6,0$ ppm; referente aos hidrogênios metoxílicos, um tripleto em 3,57 ppm, $J = 6,2$ Hz referente aos hidrogênios vicinais ao grupo azida; um quinteto centralizado em 2,12 ppm, $J = 6,2$ Hz, referente aos hidrogênios metilênicos, $J = 6,2$ Hz.

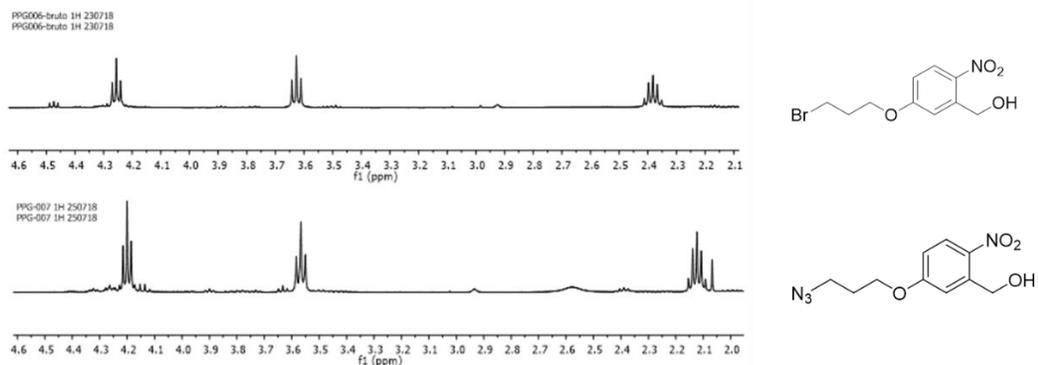


Figura 10 – Expansão da região alquílica do intermediário PPG-Br e PPG-N₃

Pelo espectro na região do infravermelho, a evidência reacional pôde ser observada através da banda em 2101 cm⁻¹, característico do grupo azida.

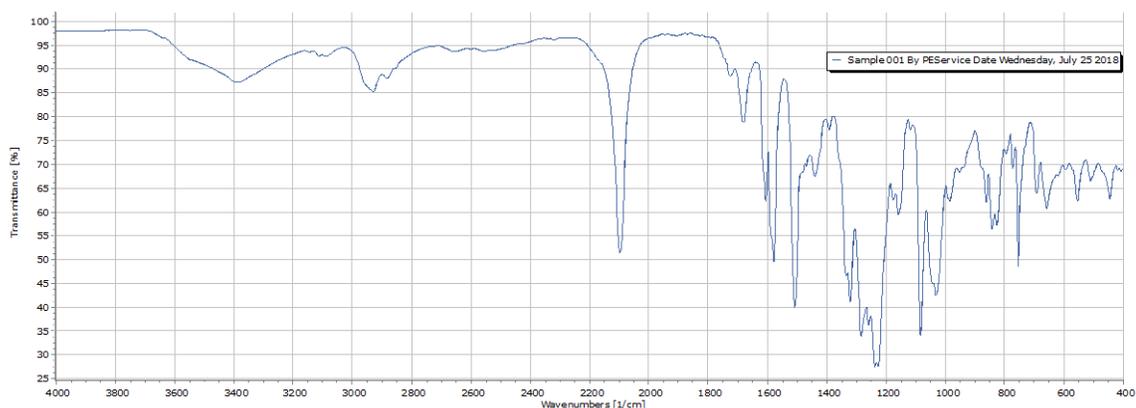
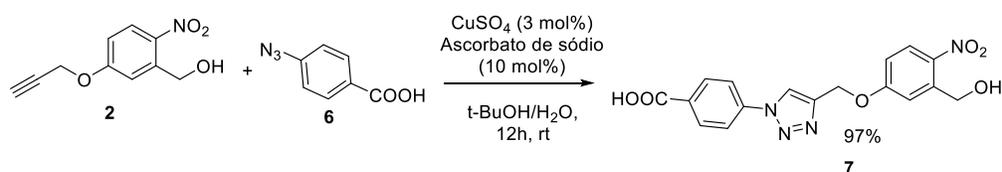


Figura 13 – Espectro de infravermelho do composto PPG-N₃

5.1.3. Preparação de um 1,2,4-triazol fotorremovível

Tendo em mãos os grupos fotorremovíveis para serem imobilizados nos NDs, testou-se uma reação de *click chemistry* entre o composto **2** (PPG-Alkynyl) e o ácido 4-azidobenzóico (Esquema X) para primeiro testar a reatividade dos grupos fotorremovíveis neste tipo de reação e em segundo para tentar ancorar ao ND pela porção ácida através de reações de esterificação.



Esquema 9 – Reação *click chemistry* entre o composto **2** (PPG-Alkynyl) e ácido azido benzóico: obtenção do 1,2,4-triazol fotorremovível **7**

A metodologia utilizada consistiu no uso de sulfato de cobre e ascorbato de sódio como catalisadores, uma vez que o Cu²⁺ é reduzido a Cu⁺ pelo ascorbato *in situ* e desta forma se complexa

ao grupo alcino diminuindo a energia do sistema para posteriormente formar o triazol frente ao grupo azida.

A reação ficou sob agitação por 12 horas e o sólido formado foi filtrado e lavado com água gelada e diclorometano, para eliminar as impurezas inorgânicas e orgânicas respectivamente. O sólido marrom isolado foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C .

A evidência reacional se deu através da análise do espectro de RMN de ^1H com o aparecimento de um simpleto em 9,09 ppm, referente ao hidrogênio da porção triazólica. O tripleto centralizado em 2,61 ppm, referente ao alcino desapareceu; os hidrogênios metoxílicos e benzílicos apareceram como simpletos em 5,44 e 4,86 ppm respectivamente.

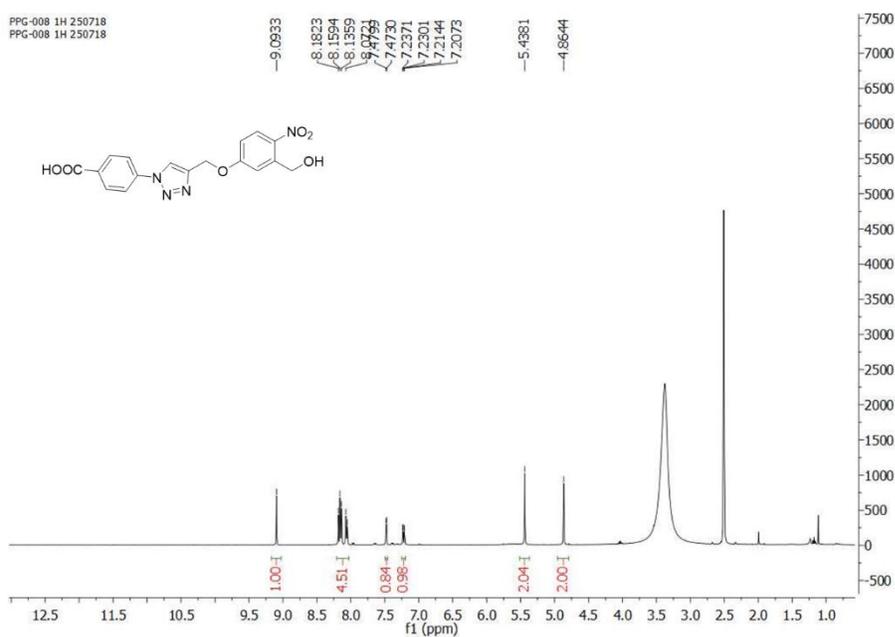


Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H do 1,2,4-triazol fotorremovível (X) (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

5.2. Preparação dos Nanodiamantes (ND)

Os nanodiamantes foram obtidos comercialmente (Alitex e Israel) e em sua forma pura, estes materiais apresentam baixa quantidade de grupos funcionais reativos frente a compostos orgânicos. Assim, diversos grupos de pesquisa desenvolveram metodologias para aumentar a quantidades de grupos funcionais, como grupos amino (ND-NH_2), ácidos carboxílicos (ND-COOH) e hidroxilas (ND-OH) em suas superfícies.

Pelo espectro de infravermelho do ND-puro, pôde-se observar uma banda em 3424 cm^{-1} característico de hidroxilas; uma banda em 1627 referente à grupos cetônicos; uma banda em 1095 , característica de ligações C-O *bending* (Figura 16).

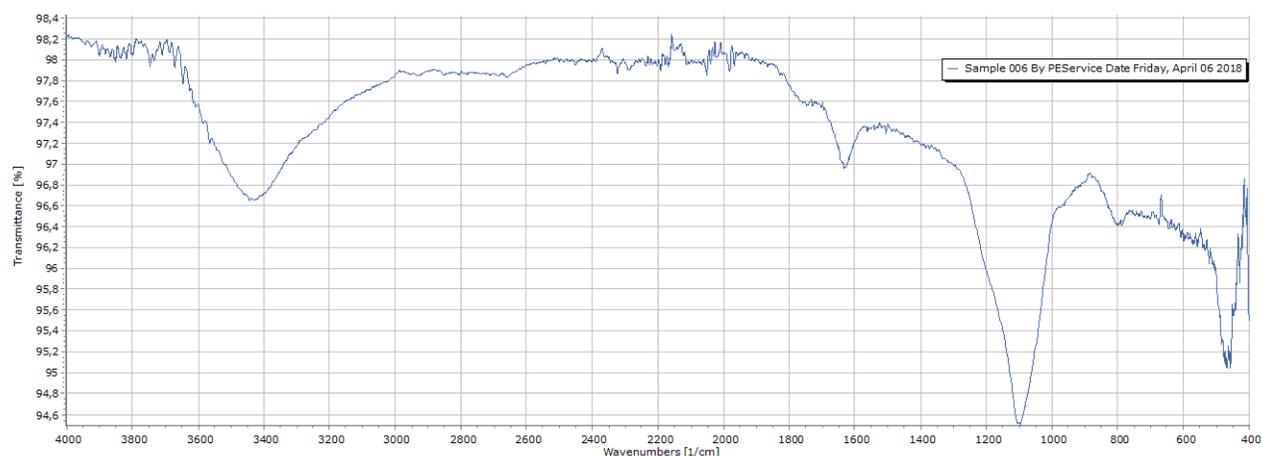


Figura 16 – Espectro de infravermelho do ND comercial

Desta forma, propõe-se neste tópico, sintetizar NDs ricos em grupos carboxílicos (ND-COOH) e ricos em hidroxilas (ND-OH) para serem ancorados a compostos orgânicos (linkers).

5.2.1. Preparação dos ND-COOH

Os nanodiamantes são sólidos insolúveis na maioria dos solventes. Desta forma, para escolher um procedimento experimental para a oxidação de sua superfície requer alguns cuidados, pois o uso de agentes oxidantes (como permanganato de potássio, reagente de Jones, entre outros) se torna inviável devido a problemas de purificação. Sendo assim, decidiu-se buscar por duas alternativas: uso de *Plasma Cleaner*, que gera oxigênio nascente e assim poderia oxidar a superfície dos NDs. A segunda consiste na oxidação térmica, onde os NDs, na presença de oxigênio e temperaturas elevadas podem ser oxidados.

a) Oxidação com *Plasma Cleaner*

O uso de plasma de oxigênio é explorado na área de química de materiais. Devido ao seu comportamento de não-equilíbrio e não-isotérmico, esses gases ionizados podem levar a novos

resultados quando usados como uma alternativa para o tratamento de superfícies de materiais. Alguns trabalhos relataram seu uso em grafites, microesferas de carbono e carbonos vítreos. Como fonte de plasma, utilizou-se o equipamento *Plasma Cleaner*, uma câmara que sob vácuo e na presença de radiofrequência, emite plasma.

Assim, decidiu-se primeiramente utilizar esta estratégia para os NDs, uma vez que estes consistem em materiais de carbono. Preparou-se uma suspensão de ND em água, sonicada por 30 minutos, e então dispersou-se em uma placa de Petri para a obtenção de um filme. Deixou-se no dessecador por 24 horas e então colocado em uma câmara geradora de plasma de oxigênio, *Plasma Cleaner*.

O filme foi deixado de 10 em 10 minutos, sob uma frequência específica, até completar uma hora. As amostras foram coletadas para posterior caracterização por infravermelho.

Pela análise do espectro de infravermelho das amostras, pôde-se observar que apenas a banda na região de 1025 cm^{-1} diminuiu, mas bandas características de grupos carboxílicos não foram detectados (Figura 17).

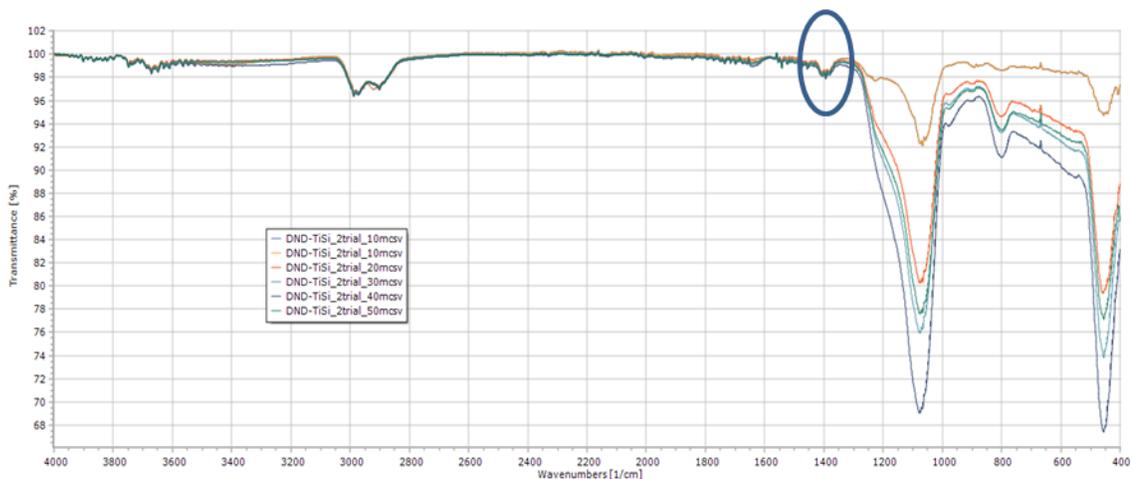


Figura 17 – Monitoramento do tratamento com *Plasma Cleaner* por infravermelho (ATR)

Uma outra alternativa consistiu da oxidação térmica, seguindo o protocolo experimental descrito por Ryan e colaboradores.³⁵

b) Oxidação térmica de NDs

A oxidação térmica foi realizada através do aquecimento destes materiais na presença de O_2 .^{34,35}

A metodologia consistiu no aquecimento dos NDs, comercialmente disponíveis, em uma mufla a 475 °C (Figura 18).



Figura 18 – Protocolo descrito por Simpson e colaboradores para a oxidação térmica de NDs (Fonte: Adaptado de Ryan *et al.* 2018)

Após esfriar a 25 °C, uma amostra foi caracterizada por infravermelho (Figura 19). A principal mudança observada foi a formação de uma banda característica de ácido carboxílico (estiramento da carbonila em 1800 cm^{-1}).

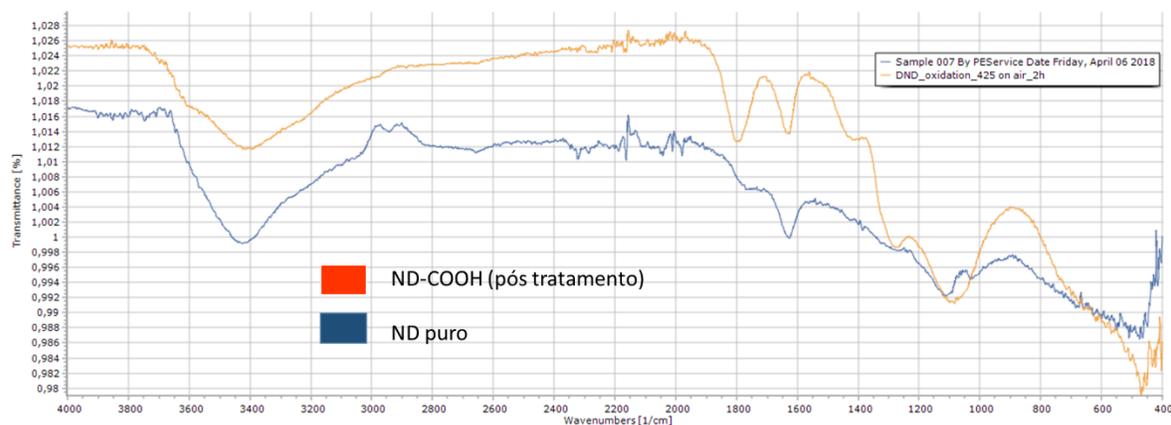


Figura 19 – Espectro de infravermelho do ND-puro comercialmente disponível (azul) e do ND-COOH (laranja) pós tratamento de oxidação

A etapa seguinte consistiu no tratamento dos ND-COOH em meio ácido. Assim, preparou-se uma suspensão em uma solução de HCl (0,001 M) e sonificou-se por 40 minutos, para garantir a protonação de quaisquer grupos carboxilatos presentes na superfície. Centrifugou-se numa rotação de

12 mil rpm e lavou-se o sólido por cinco vezes com água Miliq, até a condutividade da suspensão chegar a zero.



Figura 20 – Suspensão de ND-COOH em pH 3

Posteriormente mediu-se a estabilidade desta suspensão pela análise de potencial Zeta, potencial eletrocinético utilizado para medir a estabilidade de suspensões, ou seja, potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária de fluido preso à partícula dispersa. A magnitude do potencial zeta indica o grau de repulsão eletrostática entre partículas adjacentes de carga similar em uma dispersão. Em partículas pequenas, um elevado potencial zeta conferirá estabilidade, isto é, a solução ou dispersão resistirá à agregação (referência 3 e 4 wiki). Pela Tabela 1, pôde-se observar o aumento da magnitude do potencial zeta, tanto os ND-COOH dispersos sem tratamento ácido, quanto em condições pós tratamento ácido.

Tabela 1 – Potencial Zeta para os NDs e ND-COOH

<i>Potencial Zeta</i>	ND puro	ND-COOH	ND-COOH (pós tratamento ácido)
Medida 1	0,8 mV	-55,6,mV	-71,9 mV
Medida 2	-0,3 mV	-60,4, mV	-73,7 mV
Medida 3	-0,5 mV	-56,5, mV	-68,6 mV

Medida 4

0,2 mV

-44,5, mV

-67,6 mV

As medidas para os ND puros próximos de zero, nos mostra a baixa estabilidade coloidal, isto é, possuem uma maior tendência em coagular³⁶.

Por fim, realizou-se a dispersão dinâmica de luz (DLS), uma técnica física amplamente utilizada para medir o tamanho de partículas em solução ou suspensão. Os diâmetros encontrados obtidos foram próximos, tanto para os NDs puros quanto ND-COOH no valor de 48 nm.

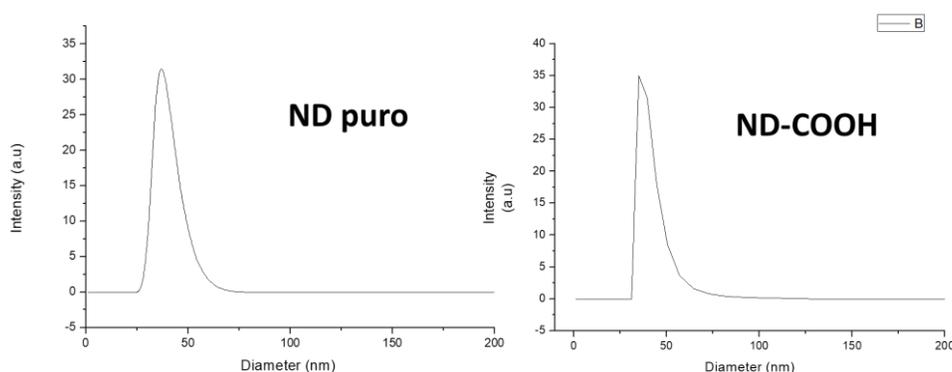


Figura 21 – DLS dos ND puro e ND-COOH

5.2.2. Preparação dos ND-OH

A preparação dos ND-OH se deu a partir da redução dos NDs ricos em grupos ácidos carboxílicos, os ND-COOH obtidos anteriormente na presença de um agente redutor. Para este procedimento, optou-se pelo uso de hidreto de lítio e alumínio (LiAlH_4), uma vez que este redutor é mais reativo³⁷.

Uma suspensão de ND-COOH em THF foi sonificada por 40 minutos e em seguida adicionou-se o redutor, numa razão de 1:1 (m/m). A mistura reacional ficou em agitação e sob refluxo por 24 horas, e posteriormente, o sobrenadante foi removido por centrifugação (12 mil rpm). O sólido obtido foi lavado três vezes, separado por centrifugação e o sólido foi tratado com NaOH 6,0 M, sob agitação a 90 °C *overnight*, tratada com HCl 0,1 M e lavada com água até atingir o pH neutro, e por fim, a suspensão obtida foi purificada através de lavagem com uma membrana semipermeável, permitindo

a troca iônica. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido obtido secado em alto vácuo por 24 h. Em seguida, caracterizou-se por infravermelho (Figura 22). Pôde-se observar a diminuição da banda característica de ácidos carboxílicos, além das demais bandas em 3400 referente ao estiramento OH, bandas nas regiões de 2900 cm^{-1} referente a C-H presentes.

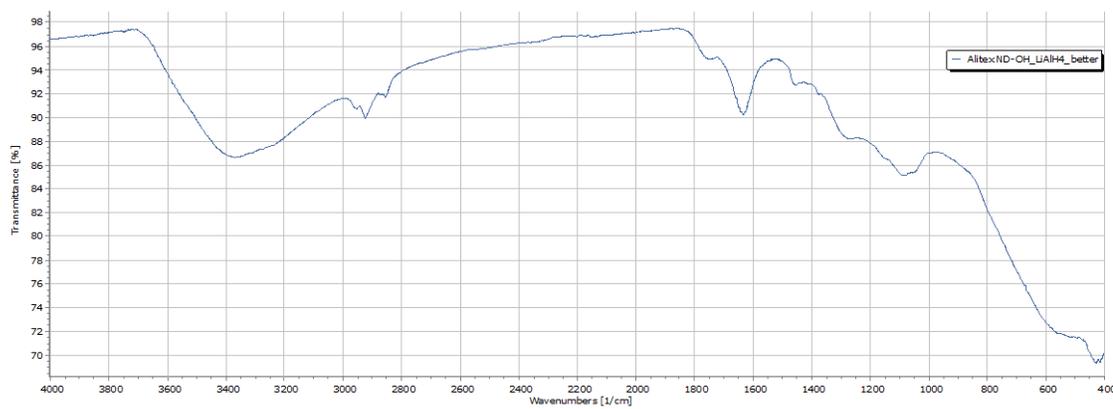


Figura 22 – Espectro de infravermelho do ND-OH

Tabela 2 – Potencial Zeta medidos para ND-OH

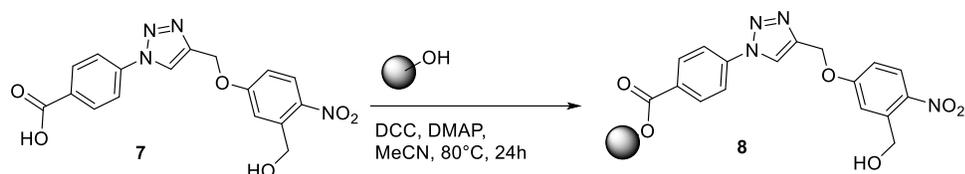
<i>Potencial Zeta</i>	ND-OH
1	-44,9 mV
2	-46,0 mV
3	-44,7 mV
4	-47,3 mV

A medida de DLS também foi realizada, entretanto observou-se um aumento significativo do diâmetro da nanopartícula para 270 nm.

5.2.3. Funcionalização do ND-OH

A primeira estratégia consistiu na imobilização do 1,2,4-triazol (discutido na seção 5.1.3) através de uma reação de esterificação. Desta forma, o ácido carboxílico presente no triazol pode ser

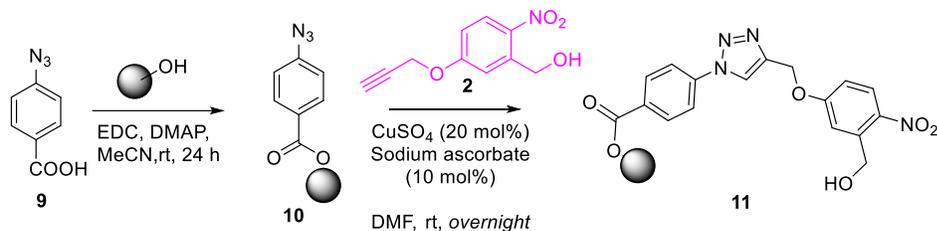
ativado por uma carbodiimida e ser reativa frente a nucleófilos. Preparou-se uma suspensão de ND-OH em DMF e sonificou-se por 40 minutos, em seguida, uma solução do composto **7**, na presença de EDC e DMAP em DMF foi adicionada e mantida sob agitação a 80 °C por 24 horas (Esquema 10).¹⁶



Esquema 10 – Tentativa de imobilização do 1,2,4-triazol em ND-OH

O solvente da suspensão foi removido sob pressão reduzida e o sólido obtido foi lavado em um *Soxhlet* por 5 dias utilizando metanol como solvente e posteriormente, acetato de etila para remover as impurezas orgânicas. O sólido foi então secado em alto vácuo e analisado por infravermelho e pôde-se observar uma quantidade muito grande de resíduos que não foram possíveis de serem removidos, além da baixa solubilidade do triazol na maioria dos solventes orgânicos ser um problema para a implementação desta metodologia.

A segunda estratégia consistiu em imobilizar a azida na superfície do ND-OH e em seguida, prosseguir com a reação de *click chemistry* (Esquema 11).¹⁶



Esquema 11 – Imobilização do grupo fotorremovível em duas etapas: obtenção da azida seguida de *click chemistry*

Em ambas as etapas, a suspensão foi centrifugada a 12 mil rpm e lavada exaustivamente com água, para remover as impurezas inorgânicas, metanol e acetonitrila para remover as impurezas orgânicas e novamente foram centrifugadas. O sólido obtido foi secado em alto vácuo e caracterizado por infravermelho (Figura 23).

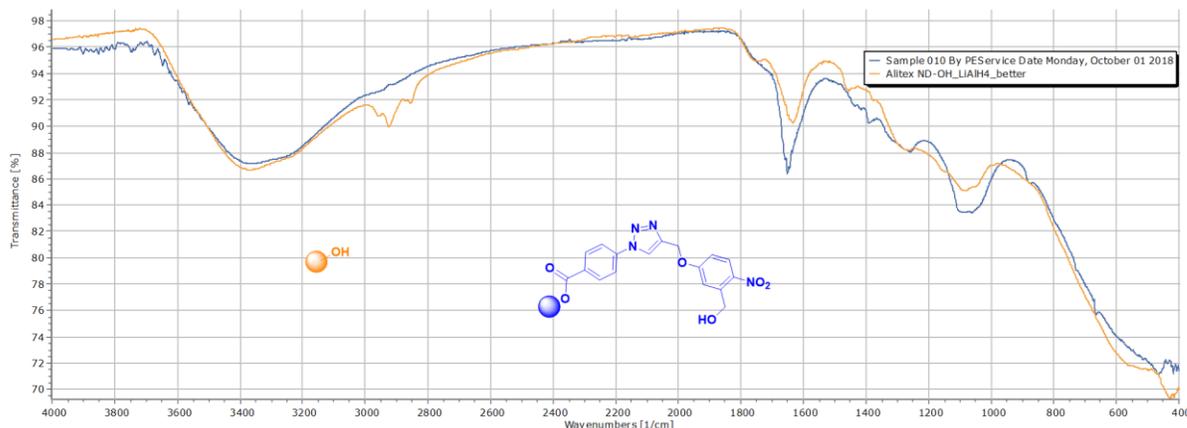


Figura 23 – Espectro de infravermelho comparativo entre ND-OH (laranja) e ND-PPG

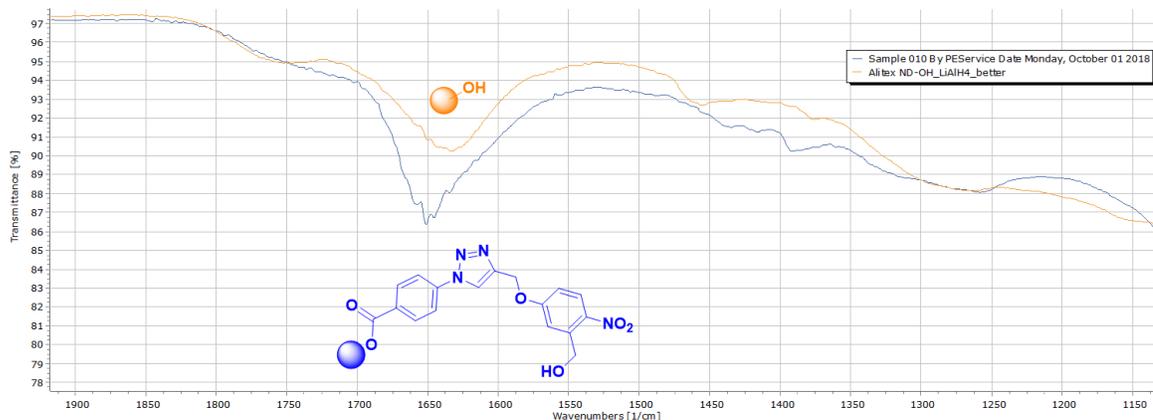
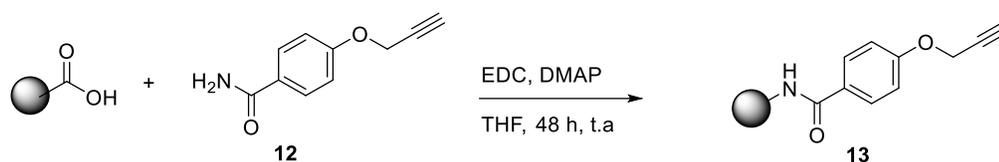


Figura 24 – Expansão da região entre 1900 e 1150 cm^{-1}

Pela análise das bandas apresentaram, pôde-se observar um aumento na região entre 1700 a 1600 cm^{-1} , o que indica o aparecimento de uma banda C=N, presente no triazol.

5.2.4. Funcionalização do ND-COOH

A primeira etapa consistiu na reação de amidação entre o ND-COOH e a *p*-propargil anilina. A metodologia consistiu na preparação de uma suspensão de 15 mg de ND-COOH em THF (3 mg/mL, previamente sonificado por 40 minutos). Em seguida, adicionou-se uma solução de THF contendo EDC (0,22 mmol) como ativador de ácido carboxílico, DMAP (0,066 mmol) como base. A mistura reacional foi mantida sob agitação vigorosa por 48 h à temperatura ambiente).



Esquema 12 – Imobilização da anilina através da reação de amidação com ND-COOH

Pela análise do espectro de infravermelho, pôde-se observar o aparecimento de uma banda característica de alcino na região de 2100 cm^{-1} , um deslocamento sutil na região de estiramento de carbonilas, 1781 cm^{-1} referente à $\text{C}=\text{O}$ da amida formada.

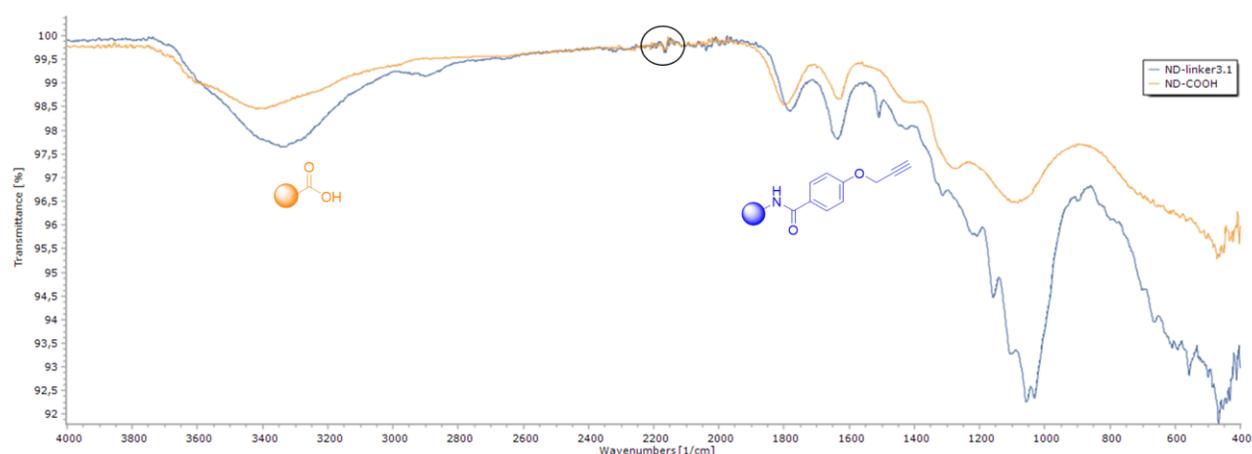


Figura 25 – Espectro de infravermelho comparativo entre ND-Alkynyl (azul) e ND-COOH (laranja)

O alcino imobilizado na superfície dos NDs podem ser imobilizados utilizando grupos fotorremovíveis contendo azida (PPG-N₃).

6. Conclusões e perspectivas futuras

Até o presente momento, foi possível sintetizar diversos grupos fotorremovíveis com bons rendimentos variando entre 72 e 97%. Preparou-se também nanodiamantes ricos em grupos carboxílicos (ND-COOH) e ricos em hidroxilas (ND-OH). Os nanodiamantes foram caracterizados inicialmente por espectroscopia na região do infravermelho. As suspensões de ND-COOH e ND-COOH foram medidas por zeta potencial e os tamanhos foram medidos pela técnica de Espalhamento Dinâmica de Luz (DLS) para estimar a distribuição das NPs em meio coloidal.

Como perspectivas futuras, pretende-se imobilizar grupos oxialquílicos como polietileno glicol à superfície de NDs com objetivos de aumentar a solubilidade destas partículas como adsorver o fármaco de interesse. Pretende-se ainda fazer as demais caracterizações: microscopia de varredura eletrônica, microscopia Eletrônica de transmissão para estudo da morfologia superficial e estrutural das NPs; estudos de fotoluminescência; difração de raios-X; avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade das NPs e ensaios biológicos.

7. Parte Experimental

7.1. Materiais e métodos

Cromatografia de adsorção em coluna (cromatografia flash) foi realizada utilizando-se sílica-gel Aldrich (200–400 mesh). Os eluentes empregados estão descritos nas respectivas preparações.

Cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando-se placas obtidas a partir de cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica-gel 60 F254 (Merck). A visualização se deu através de luz ultravioleta (254 nm) e/ou através de revelação com solução etanólica de ácido fosfomolibdico, seguido de aquecimento.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C) foram obtidos nos aparelhos DPX400 (400 MHz para RMN de ^1H e 100 MHz para RMN de ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) tendo como referência interna o clorofórmio deuterado (CDCl_3) (7,26 ppm para RMN ^1H ; 77,0 ppm para RMN ^{13}C), dimetilsulfóxido deuterado (2,49 ppm para RMN de ^1H e 39,50 ppm para RMN de ^{13}C). A multiplicidade dos sinais de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN ^1H foi indicada segundo a convenção: s (singlete), d (duplete), t (triplete), q (quarteto), qui (quinteto)

8. Referências

- 1 Azevedo M. M. M. Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas. TESE DE DOUTORADO. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. Departamento de Físico-Química, 2005.
- 2 CF van Nostrum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004, **56**, 9.
- 3 X. Chen and W. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 734–760.
- 4 K. T. and V. Mochalin, *Nanotechnology*, , DOI:10.1088/1361-6528/aa6ae4.
- 5 K. Tanaka and Y. Chujo, *Adv. Powder Technol.*, 2014, **25**, 101.

- 6 P. Namdari, B. Negahdari and A. Eatemadi, *Biomed. Pharmacother.*, 2017, **87**, 209.
- 7 V. N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi. *Nature Nanotechnology*, 2011, **7**, 11.
- 8 V.V. Danilenko *Phys. Solid State*, 2004, **46**, 595.
- 9 S. Nazir, T. Hussain, A. Ayub, U. Rashid and A. J. MacRobert, *Nanomedicine*, 2014, **10**, 19.
- 10 D. Ho, *ACS Nano*, 2009, **3**, 3825.
- 11 H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa and D. Ho, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 3305.
- 12 R. A. Shimkunas, E. Robinson, R. Lam, S. Lu, X. Xu, X.-Q. Zhang, H. Huang, E. Osawa and D. Ho, *Biomaterials*, 2009, **30**, 5720–5728.
- 13 K. Turcheniuk, M. Khanal, A. Motorina, P. Subramanian, A. Barras, V. Zaitsev, V. Kuncser, A. Leca, A. Martoriati, K. Cailliau, J.-F. Bodart, R. Boukherroub and S. Szunerits, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 865–875.
- 14 M. Khanal, V. Turcheniuk, A. Barras, E. Rosay, O. Bande, A. Siriwardena, V. Zaitsev, G.-H. Pan, R. Boukherroub and S. Szunerits, *Langmuir*, 2015, **31**, 3926.
- 15 V.S. Pore, S. G. Agave, S. R. Maujan. *Chem. Asian. J.* 2011, **6**, 2696.
- 16 M. Khanal, F. Larssonneur, V. Raks, A. Barras, J.-S. Baumann, F. A. Martin, R. Boukherroub, J.-M. Ghigo, C. Ortiz Mellet, V. Zaitsev, J. M. Garcia Fernandez, C. Beloin, A. Siriwardena and S. Szunerits, *Nanoscale*, 2015, **7**, 2325.
- 17 V. Turcheniuk, K. Turcheniuk, J. Boukaert, A. Barras, T. Dumych, R. Bilyy, V. Zaitsev, A. Siriwardena, Q. Wang, R. Boukherroub and S. Szunerits, *ChemNanoMat*, 2016, 1.
- 18 K. Tanaka and Y. Chujo, *Adv. Powder Technol.*, 2014, **25**, 101.
- 19 S. Y. Lim, W. Shen and Z. Gao, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 362.
- 20 D. Li, X. Chen, H. Wang, J. Liu, M. Zheng, Y. Fu, Y. Yu and J. Zhi, *J. Biophotonics*, 2017, **11**, 1.
- 21 A. Bacteria, C. A. Strassert, M. Otter, R. Q. Albuquerque, A. Höne, Y. Vida, B. Maier and L. De Cola, 2009, 7928.
- 22 P. Rai, S. Mallidi, X. Zheng, R. Rahmanzadeh, Y. Mir, S. Elrington, A. Khurshid and T. Hasan, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**, 1094.
- 23 Y. Liu, S. Zhou, L. Fan and H. Fan, *Microchim. Acta*, 2016, **183**, 2605.
- 24 C. a. Strassert, M. Otter, R. Q. Albuquerque, A. Hone, Y. Vida, B. Maier and L. De Cola, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2009, **48**, 7928–7931.
- 25 W. Shang, X. Zhang, M. Zhang, Z. Fan, Y. Sun, M. Han and L. Fan, *Nanoscale*, 2014, **6**, 5799.
- 26 D. Wang, L. Zhu, J.-F. Chen and L. Dai, *Nanoscale*, 2015, **7**, 9894.
- 27 P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *J. Chem. Rev.* 2013, **113**, 119.
- 28 Skwarczynski, M.; Noguchi, M.; Hirota, S.; Sohma, Y.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 4492.
- 29 Y. V. Il'ichev, J.J. Wirz. *Phys. Chem. A.* 2000, **104**, 7856.
- 30 M. Kang and B. Moon, *Macromolecules*, 2009, **42**, 455.
- 31 I. Kurylo, M. Dupré, S. Cantel, C. Enjalbal, C., H. Drobecq, S. Szunerits, O. Melnyk, R. Boukherroub, Y. Coffinier, Y. *The Analyst.* 2017, **142(6)**, 969.
- 32 K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. DeRoose. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119(2)**, 449.
- 33 A. Shakiba, A. C. Jamison, and T. R. Lee, *Langmuir*, 2015, **31**, 6154.
- 34 K. Turcheniuk, C. Trecazzi, C. Deelepojananan, V. N. Mochalin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, **8**, 25461.
- 35 R. G. Ryan, A. Stacey, K. M. O'Donnell, T. Ohshima, B. C. Johnson, L. C. L. Hollenberg, P. Mulvaney and David A. Simpson. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, **10(15)**, 13143.
- 36 D. A. H. Hanaor, M. Michelazzi, C. Leonelli, C.C. Sorrell, (2012). *J. Eur. Ceramic Soc.* **32**, 235.

