

CNPq Bolsa de Produtividade em Pesquisa



PROJETO E PLANO DE TRABALHO

Compósitos com nanodiamantes e quantum pontos de carbono como novos candidatos para tratamento fotodinâmico e psicodinâmico invasivo de tumores e portadores de entrega de drogas

Nanodiamonds and quantum carbon dots composites as new candidates for invasive photodynamic and sonodynamic treatment of tumors and carriers for drug delivery

Professor Volodymyr Zaitsev, PhD, D.Sc., Acad. NAS da Ucrânia

Departamento de Química, PUC-Rio

R. Marquês de São Vicente, 225 – Gávea, 22453-900 - Rio de Janeiro – RJ

Julho 2018

SUMÁRIO

1. Resumo	2
2. Abstract	3
3. Introdução	4
3.1. Entrega de drogas	4
3.2. Invasiva terapia de câncer.	5
4. Justificativa para escolha do tema	6
4.1. Partículas nanodiamantes	7
4.2. Derivados de grafeno	8
5. O objetivo do projeto	9
5.1. Objetivo geral	9
5.2. Objetivos específico	9
6. Relevância científica e tecnológica	10
7. As metas (como os objetivos serão alcançados)	10
8. Os métodos	12
9. Os resultados esperados (Milestones)	16
10. Bibliografia relacionada ao projeto	17
11. Plano do trabalho	20

1. Resumo

Nanopartículas têm sido utilizados em vastas aplicações, desde o armazenamento de energia até a biotecnologia. No entanto, sua aplicação biotecnológica é bastante limitada. Devido à eventual citotoxicidade e baixa estabilidade coloidal, a importância do desenvolvimento de novas nanopartículas é geralmente reconhecida. 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. Entre eles, os nanodiamantes (**NDs**) e pontos quânticos de carbono (ou óxido de grafeno) (**GOQDs**) são reconhecidos como uns novos candidatos a aplicações nanobiotecnológicas.

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. Duas abordagens relacionadas serão investigadas. Um enfocará a preparação de nanocompósitos de **NDs/TiO₂** com GOQDs imobilizados (**NDs/TiO₂@GONDs**). O outro é nanocompósito poroso à base de sílica com nanocristais de TiO₂ e GOQDs imobilizados (**SiO₂/TiO₂@GOQDs**). A ideia do projeto é baseada na capacidade do TiO₂ de produzir espécies bioativas sob tratamento com ultrassom. A integração de TiO₂ em nanocompósitos pode melhorar a estabilidade coloidal (NDs), estrutura cristalina necessária (SiO₂) e biocompatibilidade (GOQDs, NDs); garantir alta área de superfície e nanotamanho de partícula (SiO₂, NDS), fornece fotoluminescência das partículas (GOQDs). Adicionalmente, 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 and nanostructured materials have been used in vast of applications ranging from energy storage to biotechnology. However, their biotechnological application is quite limited. Due to eventual cytotoxicity and low colloidal stability, the importance of development of novel nanoparticles is generally recognized. Among the new, carbon-based structures attract a lot of attention because of their biocompatibility, high surface area and stability. Among them nanodiamonds (NDs) and carbon (or graphene oxide) quantum dots (GOQDs) is recognized as a new candidate for nanobiotechnological applications.

Among the non-penetrating strategies of anticancer treatment, photodynamic (PDT) and photothermal (PTT) therapies are considered as the most effective for the future. Till now the development of PDT and PTT is limited by the ability of light to penetrate the tissue.

This research is focused on the elaboration and investigation of new hybrid nanomaterials that can be used in most recently established invasive therapy, based on ultrasound (sonodynamic) and soft X-ray (photodynamic) treatment of cancer. Two related approach will be investigated. One will be focusing on preparation of NDs/TiO₂ nanocomposite with surface immobilized GOQDs (NDs/TiO₂@GONDs). The other one is silica-based porous nanocomposite with nanocrystals of TiO₂ and surface immobilized GOQDs (SiO₂/TiO₂@GOQDs). The project idea is based on ability of TiO₂ to produce bioactive species under ultrasound treatment. Integration of TiO₂ into nanocomposites can improve it colloidal stability (NDs), necessary crystal structure (SiO₂) and biocompatibility (GOQDs, NDs); ensure high surface area and small particle size (SiO₂, NDs), provide photoluminescence of the particles (GOQDs). Additionally, covalent immobilization of photosensitizer and bioactive components on the surface of nanocomposites via photo-cleavable linker is planned to ensure their controlled release.

3. Introdução

Nanopartículas e materiais nanoestruturados têm sido usados em aplicações difundidas em diversas áreas que vão desde a catálise de armazenamento de energia até a biotecnologia. A natureza versátil desses materiais está ligada à possibilidade de se adaptar de forma controlada as propriedades físicas e químicas dos materiais. Nanocompósitos à base de óxidos metálicos são os mais utilizados em química analítica, catálise e em aplicações médicas [1]. Nos últimos anos, vários estudos sobre a toxicidade de nanomateriais e nanopartículas revelam suas propriedades específicas, tornando esses objetos muito mais reativos do que os maiores [2,3]. Particularmente demonstrou-se que as partículas à base de silicone e sílica têm alta citotoxicidade e baixa estabilidade coloidal em líquidos fisiológicos e se devem ser protegidas e estabilizadas [4]. Tal estabilização comumente inclui a preparação de nanocompósitos híbridos contendo diferentes nano-objetos e superfície modificada [5]. Devido à eventual citotoxicidade de nanopartículas de ouro [2] e efeito pirogênico da sílica [3], a importância de outras nanopartículas em aplicações biológicas geralmente reconhecidas se faz necessário [6]. A preparação das novas nanopartículas com menos citotoxicidade é o foco para o desenvolvimento de novos sistemas aplicáveis à biotecnologia [7]. Entre os novos nanocompósitos híbridos, as estruturas à base de carbono atraem muita atenção devido à sua biocompatibilidade, alta área de superfície e propriedades úteis, como a fotoluminescência [8–11]. Entre os materiais de carbono à base de nanodiamantes (NDs) e pontos quânticos de carbono (ou de óxido de grafeno, GOQDs) começaram a surgir como novos candidatos para aplicações promissoras no campo da nano-biotecnologia [9,12–14]. NDs e GOQDs não mostram toxicidade quando comparadas a nanopartículas de ouro, em especial, tornando-os ideais plataformas de entrega de droga em nano-escala [15,16]. Além disso, os GOQDs e NDs podem apresentar fluorescência intrínseca de defeitos pontuais tornando-os candidatos para aplicações de imagens biomédicas. Devido à presença de grupos funcionais em sua superfície, todas estas partículas podem ser funcionalizadas. Assim, nanopartículas híbridas com nanodiamantes e pontos quânticos de óxido de grafeno podem ser objetos promissores para aplicações nanobiotecnológicas e particularmente para entrega de drogas e terapia fotodinâmica de câncer [10,17].

3.1. Entrega de fármacos

Sistemas de distribuição de drogas se servem para melhorar a baixa solubilidade, aumentar estabilidade *in vivo*, e aperfeiçoar a biodistribuição, e farmacocinética dos medicamentos. Existem duas categorias principais de sistemas de distribuição de drogas, que foram desenvolvidos ao longo dos anos. O primeiro grupo consiste em veículos semelhantes às cápsulas, incluindo micelas e lipossomas. Estes sistemas têm a capacidade de encapsular uma quantidade relativamente grande de medicamento dentro das suas estruturas automontadas.[18] A segunda família de agentes veiculares são aqueles para os quais os fármacos são acrescentadas no lado de fora. Entre esta categoria, os materiais à base de carbono, como fulerenos, nanotubos de carbono, NDs e GOQDs foram investigadas como veículos e para tratamento anticâncer e antimicrobiano. Acredita-se que os ND e GOQDs sejam mais promissores que os fulerenos e os nanotubos de carbono a aplicação biomédica [8,9,13,19–24].

Partículas de nanodiamantes surgiram como candidatos especialmente promissores na nano-biotecnologia [25]. Além disso, estudos recentes demonstraram que os NDs não apresentam a toxicidade frequentemente observada com outras nanopartículas, e especialmente de Au NPs reforçando ainda mais a sua adequação em entrega de drogas e nanoplateformas de imagem [10,12,24,26–29].

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 [30]. Diabetes e câncer são apenas dois exemplos em que o tratamento com o fármaco funcionalizado com NDs podem ter um potencial terapêutico real [31]. 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 [32,33].

3.2. Invasiva terapia de câncer.

O câncer é um problema de saúde pública relevante no mundo, sendo responsável por cerca de 8,2 milhões de mortes anuais [34]. Segundo a estimativa de GLOBOCAN, em 2030 vamos ser alcançados 21,7 milhões de novos casos, e 31 milhões de mortes ao ano por esta doença [34].

Já há algum tempo, métodos não invasivos de tratamento contra diversos tipos de cânceres estão sob investigação ativa. Entre as estratégias não-penetrantes, destaca-se terapia fotodinâmica (TFD) e fototérmica (PTT) [35–37] e tratamento ultrassonográfico (a Terapia Sonodinâmica, TSD) [38–41] são considerados os mais fáceis e com maior eficácia. Com um enfoque minimamente invasivo, baseados na administração (sistêmica ou tópica,) de um agente fotossensibilizador (FSS) ou de um sonossensibilizador (SSS), em geral, não tóxico quando utilizado nas concentrações adequadas, que gera moléculas em estado excitado ou ativado, tornando-as mais reativas, Fig. 1. [14,27,38,42–44].

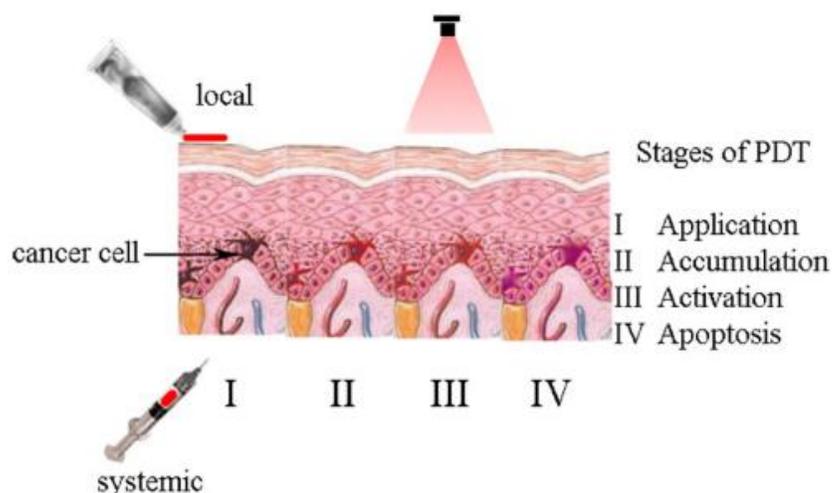


Fig. 1 As etapas principais da terapia fotodinâmica [45]. O fotossensibilizador (em seringa ou tubo) é aplicado localmente ou sistemicamente (Fase I), acumula-se em tumores (Fase II) e é ativado por iluminação externa (Fase III). Isso provoca os danos e morte celular.

O efeito fotodinâmico na TFD, na maioria dos casos, deve-se à transferência de energia (de comprimento de onda específico, geralmente entre 600 a 750 nm) do FSS excitado para uma molécula, que funciona como um substrato (oxigênio molecular) [46]. Assim, dentro de um sistema biológico e em condições ideais, pode levar a efeitos citotóxicos de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) pela produção local e controlada. Do mesmo modo, na TSD, o dano tecidual esperado pelos efeitos citotóxicos se deve à geração de ROS; porém, os mecanismos ainda não são esclarecidos. Uma teoria proposta é a possibilidade do acúmulo de energia nas moléculas SSS a uma frequência com potência de Ultrassom (UTS) específica.

Como pode ser visto acima, a terapia fotodinâmica e sonodinâmica no tratamento do câncer e outras doenças são muito promissora, particularmente, devido ao mais recente desenvolvimento em nano-química. Para futuros desenvolvimentos, os próximos problemas precisam ser resolvidos:

- I. O problema da entrega de luz ao SSS tem que ser resolvido
- II. O problema de baixa energia da luz que comumente usada para geração de ROS (600 - 800 nm) tem que ser resolvido.
- III. Alta toxicidade e baixa estabilidade do SSS e do FSS deve ser reduzida

- IV. Uns transportadores de SSS ou FSS com baixa citotoxicidade têm que ser desenvolvidos
- V. Os transportadores devem ter alta estabilidade de suspensão em soluções fisiológicas
- VI. Os transportadores devem libertar o SSS ou o FSS apenas sob determinado tratamento físico
- VII. O transportador deve desempenhar papel ativo no processo de TFD/TSD
- VIII. O transportador deve ser metabolizado

O problema I

A fim de superar essas limitações, vários grupos desenvolveram recentemente uma nova abordagem onde nanopartículas produzem luz sob estimulação por radiação de raios X.[47] Os nanocintiladores podem absorver os raios X e gerar luz visível localmente. Os raios X têm grande capacidade de penetração, atingindo regiões inacessíveis a luzes visíveis, como o cérebro ou regiões profundas. Também é muito fácil concentrar-se em tumores.

O problema II

O sucesso da TFD requer condições específicas visando a alta produção de ROS, uma vez que numerosos estudos demonstraram que essa espécie química é a principal responsável pelos efeitos citotóxicos da TFD [45].

Problema III

Mais de 1450 moléculas mostrando potenciais aplicações em TFD foram catalogadas [48]. No entanto, apenas algumas delas podem ser usadas, uma vez que os custos para sua introdução na prática clínica relacionada a testes clínicos são bastante elevados. Para limitar a toxicidade de SSS/FSS e aumentar sua estabilidade, as nanopartículas são usadas como transportadores. Em relação às aplicações de PDT nos tumores, os compostos mais estudados são o azul de metileno (**MB**). A utilização dos portadores ativos MB pode melhorar a situação.

O problema V

Como foi publicado anteriormente, a estabilidade dos portadores na solução fisiológica depende da hidrofiliabilidade e do tamanho das partículas. Por exemplo, as partículas de TiO_2 formam uma suspensão muito instável e, portanto, não podem usar diretamente para sistemático TFD/TSD. A imobilização de grupos funcionais, como o PEG, pode melhorar a estabilidade coloidal das partículas [49,50]. Ideia semelhante é usada para melhorar a biocompatibilidade das nanopartículas (**o problema IV**).

O problema VIII

Para melhorar as propriedades metabólicas do veículo, não deve conter metais pesados (Ag, Au, Pt, etc). É demonstrado que os transportadores à base de sílica (SiO_2) e titânia (TiO_2) podem ser metabolizados [3,51]

4. Justificativa para escolha do tema

A terapia fotodinâmica emergiu como uma das importantes opções terapêuticas no tratamento do câncer e outras doenças. Por causa dos meus 20 anos de experiência em modificação de superfícies e imobilização de moléculas orgânicas em suporte inorgânico, tive uma colaboração frutífera nesse campo com cientistas da França, Espanha, EUA (FP7 e OTAN bolsas). Quando cheguei ao Brasil em 2014, busquei colaboração com cientistas brasileiros no campo da aplicação biomédica de Nanocompósitos híbridos. Em 2014 tive sorte de receber bolsa Pesquisador Visitante Especial (CNPQ) e em 2015 Bolsas de Produtividade em Pesquisa (CNPQ), que me permite finalizar o que foi começado na Europa e estabelecer meu grupo de pesquisa aqui no Brasil. Em 2017, em colaboração com a FioCruz (Dr. Luiz Anastácio Alves), nós começamos um novo projeto comum no âmbito de apoio do Programa Nacional De Apoio À Atenção Oncológica (PRONON). No projeto, partículas híbridas serão usadas para terapia fotodinâmica e sonodinâmica.

Aqui alguns resultados são apresentados, que demonstram a experiência do meu grupo de

pesquisas na aplicação bioanalítica de nanopartículas híbridos com NDs/GOQDs.

4.1. Partículas nanodiamantes

O grande problema das nanodiamantes é a pequena área de superfície e dificuldades na modificação da superfície. Nós desenvolvemos uma estratégia simples para a imobilização simultânea de moléculas de direcionamento, medicamentos e agentes de imagiologia na nanoestrutura NDS para a conveniência de detecção e tratamento alvejado [52]. Para validar o conceito, um material modelo contendo âncoras de dopamina trietilenoglicol (EG) e azida (N3) modificada (dop-EG e dop-N3) foi fabricada. A presença de funcionalidades de EG presta solubilidade de NDs em água e meios biológicos, enquanto o grupo-N3 permite modificação pós-sintética do NDs usando o "clique" química, Fig. 2. Foi demonstrado que a estabilidade coloidal das partículas EG modificado de ND foi altamente melhorada.

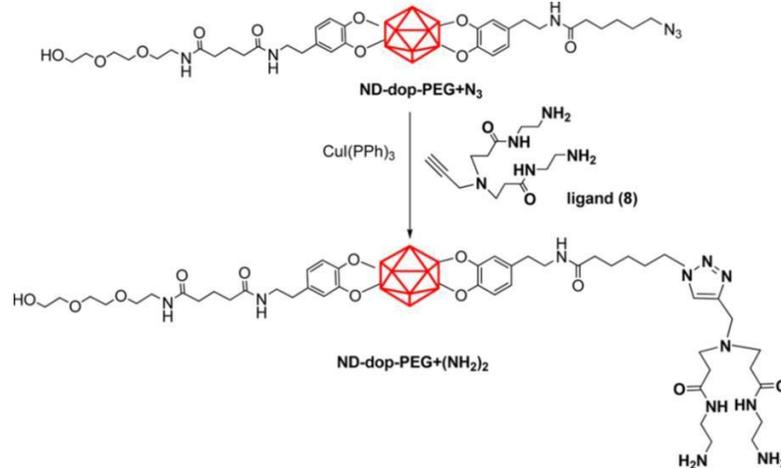


Fig. 2 Imobilização de trietilenoglicol (EG) e azida (N3) na superfície de NDs

O conceito foi utilizado para desenvolver materiais NDs multifuncionais. Por exemplo, foi demonstrado que NDs com carboidratos imobilizados (ND-Man₃) têm uma interação específica com proteínas de membrana bacterianas [22,23,53], Fig. 3.

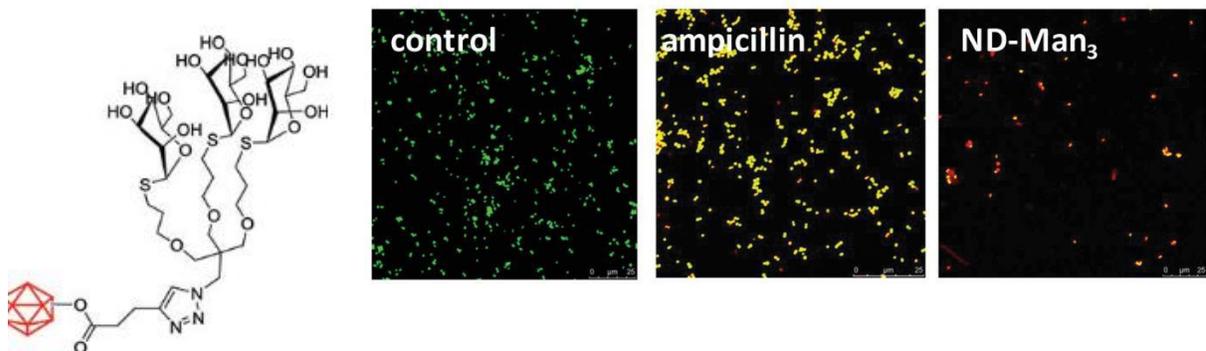


Fig. 3 Imagens da fluorescência do crescimento de *S. aureus* na ausência (controle) e presença de ND-Man₃ ao serem coradas com as colorações VIVO (verde)/ MORTO (vermelho).

Outra aplicação importante de materiais à base de NDs é o desenvolvimento de nanoestruturas para a imobilização específica de sítio de peptídeos marcado com histidina [54], Fig. 4.

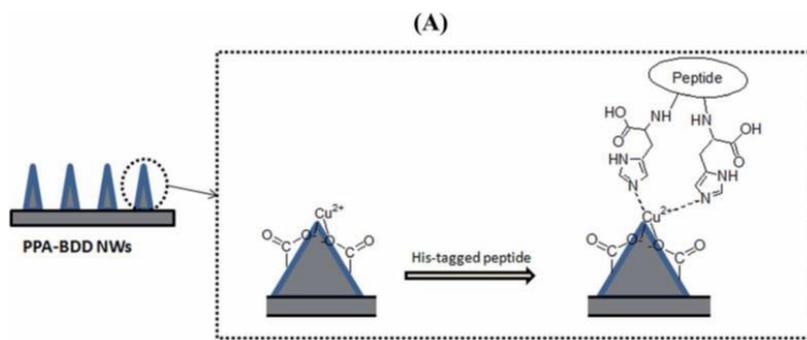


Fig. 4 Esquema de interação de péptido marcado com His com o Cu^{2+} sob interface de PPA-BDD NW.

4.2. Derivados de grafeno

Uma das principais limitações de óxido de grafeno (GO) é a sua baixa estabilidade de suspensões aquosas. Foi demonstrado que a integração de rGO (reduzido óxido de grafeno) com PEG aumenta drasticamente a solubilidade rGO sob condições fisiológicas - observada nenhuma agregação mesmo após 6 meses de armazenamento,[19] Fig. 5.

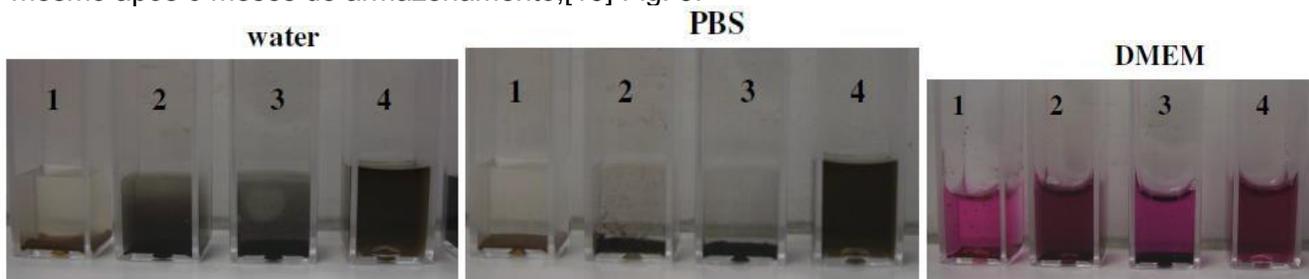


Fig. 5 Estabilidade de GO (1), GO-COOH (2), GO-PEG (3) e rGO-PEG (4) em água, PBS e meio biológico (DMEM).

Esta pesquisa abriu o portão para a aplicação de rGO em nanotecnologia. Por exemplo, as propriedades únicas de rGO foram revelados em sua aplicação para a detecção de mutagen importante - peroxinitrito [19]. Descobrimos também que rGO estabilizados podem ser decorados com metais (Au, AuPd) nanopartículas que, essencialmente, o aumento da sua eficiência no tratamento de câncer, [43] Fig. 6.

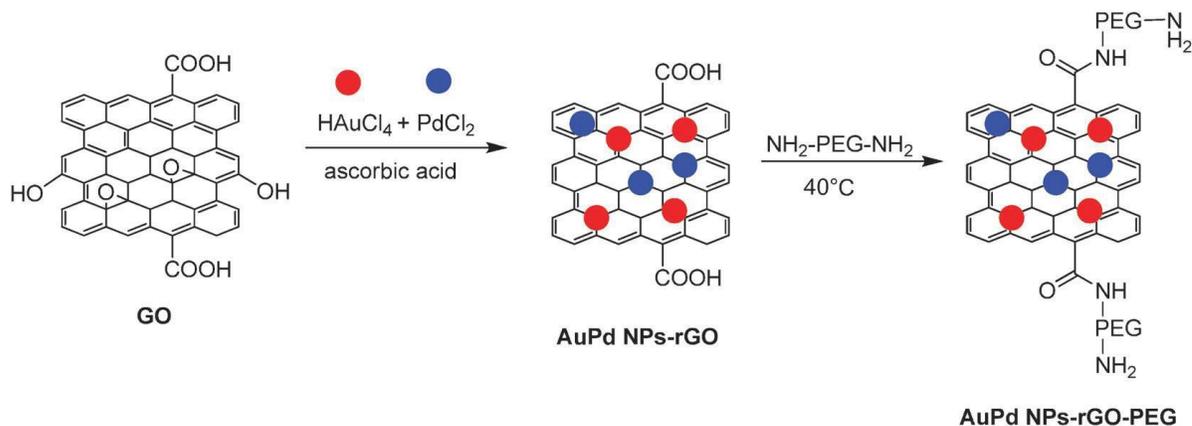


Fig. 6 Representação esquemática da síntese do agente fototérmico dos nanocompósitos AuPd NPs-rGO-PEG

Um dos assuntos em entrega de insulina é o desenvolvimento de formulações que a protejam

de degradação do pH ácido do estômago. Foi demonstrado, pela primeira vez, que matriz à base de óxido de grafeno pode garantir a estabilidade da insulina em pH baixo. Matrizes de GO e GO modificado com partículas magnéticas revestidas com 2-nitro dopamina (GO-MP_{dop}) foram preparados e carregadas com insulina (Fig. 7) e pH da liberação da insulina foi estudada. As matrizes de GO que contém insulina ficaram estáveis em pH ácido, enquanto a insulina foi lançada sob expostos a soluções básicas (pH = 9,2). Estes resultados sugerem que as matrizes à base de GO são sistemas promissores para o tratamento de pacientes com deficiência de insulina [33].



Fig. 7 Carregamento de insulina no GO e GO – MP_{dop}.

5. O objetivo do projeto

5.1. Objetivo geral

Este projeto de pesquisa tem como foco a elaboração e investigação de novos nanomateriais híbridos que podem ser utilizados na terapia fotodinâmica e sonodinâmica de câncer como transportadores ativos para entrega de medicamentos, foto-sensibilizadores e sonosensibilizadores, que poderão liberar componentes ativos do tratamento na terapia de raio-X ou sonodinâmica. Os nanomateriais propostos devem ter alta estabilidade coloidal em líquidos fisiológicos e baixa citotoxicidade.

5.2. Objetivos específicos

Para alcançar os objetivos do projeto, propõe-se usar duas abordagens: 1) tradicional e 2) alternativa

1. Nanocompósitos porosos híbridos à base de sílica com nanocristais de TiO₂ e GOQDs imobilizados à superfície serão preparados e estudados como portadores de SSS e FSS.
 - a. A área superficial elevada da sílica fornecerá a capacidade necessária para SSS /FSS e estabilizará nanopartículas de TiO₂ em certas formas cristalinas;
 - b. A estrutura porosa do transportador assegurará a proteção de componentes ativos;
 - c. Nanopartículas de TiO₂ gerarão componentes ativos sob raios-X e tratamento sonodinâmica, assim terão função de sonosensibilizadores.
 - d. Os GOQDs melhorarão a estabilidade coloidal dos nanocompósitos híbridos, reduzirão sua citotoxicidade, e podem funcionar como fotosensibilizadores.
2. Nanocompósitos híbridos à base de NDs e nanocristais de TiO₂ com GOQDs covalente imobilizados serão preparados e estudados como portadores de SSS e FSS.
 - a. Os NDs fornecerão alta capacidade do portador para componentes ativos, estabilizarão nanopartículas de TiO₂ e aumentarão sua biocompatibilidade
 - b. GOQDs imobilizados melhoram a estabilidade do nanocompósito em meios biológicos e podem funcionar como fotossensibilizador
 - c. Nanopartículas de TiO₂ gerarão componentes ativos sob raios-X e tratamento sonodinâmica, assim terão função de sono-sensibilizadores
 - d. Imobilização covalente de componentes bioativos na superfície de nanodiamantes através de linker fotoclivável, pode garantir a liberação de controle do SSS ou FSS.

6. Relevância científica e tecnológica

O câncer é um problema de saúde pública relevante no mundo, sendo responsável por cerca de 8,2 milhões de mortes anuais [55]. Segundo a GLOBOCAN a estimativa é que em 2030 tenhamos alcançado 21,7 milhões de novos casos, e 31 milhões de mortes ao ano por esta doença [56]. A Terapia Fotodinâmica (TFD) e a Terapia Sonodinâmica (TSD) surgem como tratamentos alternativos ou coadjuvantes ao tratamento do câncer, com um enfoque minimamente invasivo, baseados na administração (sistêmica ou tópica) de um agente fotossensibilizador (FSS) ou de um sonossensibilizador, que gera moléculas em estado excitado ou ativado, tornando-as mais reativas [38,57]. Entre as estratégias não penetrantes do tratamento antineoplásico, as terapias TFD e TSD são consideradas as mais eficazes para o futuro. Mas, até agora, o desenvolvimento de TFD e PTT é muito limitado. Entre vários problemas que precisam ser resolvidos para uma aplicação clínica do TFD, são mais importantes os próximos: 1) O efeito fotodinâmico na TFD, na maioria dos casos, deve-se à transferência de energia (geralmente entre 600 a 750 nm) do FSS. Esta energia é muito baixa para geração de ROS; 2) FSS tem baixa estabilidade para administração sistêmica por isso precisa uns transportadores; 3) nano-transportadores na base de sílica tem alta estabilidade de suspensão em soluções fisiológicas e citotoxicidade; 4) os transportadores devem libertar o SSS ou o FSS apenas sob determinado tratamento físico; 5) o transportador deve ser metabolizado.

O princípio do projeto é baseado na hipótese que nanomateriais híbridos com nanodiamantes e pontos quânticos de óxido de grafeno podem melhorar as propriedades dos materiais que são usados como transportadores ativos para entrega de medicamentos, foto-sensibilizadores e sonossensibilizadores, que poderão liberar componentes ativos do tratamento na terapia de raio-X ou sonodinâmica, porque superam algumas limitações, postuladas. O projeto desenvolve estratégia para melhorar as propriedades de nanomateriais e metodologia que pode garantir essa melhoria.

Duas abordagens relacionadas serão investigadas. Um enfocará a preparação de nanocompósitos de NDs/TiO₂ com GOQDs imobilizados (NDs/TiO₂@GONDs). O outro é nanocompósito poroso à base de sílica com nanocristais de TiO₂ e GOQDs imobilizados (SiO₂/TiO₂@GOQDs). A ideia do projeto é baseada na capacidade do TiO₂ de produzir espécies bioativas sob tratamento com ultrassom. A integração de TiO₂ em nanocompósitos pode: a) melhorar a estabilidade coloidal (NDs), estrutura cristalina necessária (SiO₂) e biocompatibilidade (GOQDs, NDs); b) garantir alta área de superfície e nanotamanho das partículas (SiO₂, NDS), fornece fotoluminescência das partículas (GOQDs); 3) a imobilização covalente de foto-sensibilizadores e componentes bioativos na superfície de nanocompósitos via linker foto-clivável é planejada para garantir sua liberação controlada.

7. As metas (como os objetivos serão alcançados)

O princípio do projeto é baseado na hipótese que nanomateriais híbridos com nanodiamantes e pontos quânticos de óxido de grafeno podem melhorar as propriedades dos materiais que são usados como transportadores ativos para entrega de medicamentos, foto-sensibilizadores e sonossensibilizadores, que poderão liberar componentes ativos do tratamento na terapia de raio-X ou sonodinâmica, porque superam algumas limitações, postuladas aqui como problema I-VIII.

O projeto desenvolve estratégia para melhorar as propriedades de nanomateriais e metodologia que possa garantir essa melhoria. Acredita-se que essas abordagens possam essencialmente melhorar as propriedades dos portadores para TFD e TSD e resolver algumas limitações postuladas anteriormente (problema I-VIII). Aqui eu explico brevemente a razão para tal suposição.

Problema I. Entrega de luz ao SSS

O problema pode ser resolvido se a luz vai ser produzido localmente. Neste caso limite de 600-800 nm não é crítico. Ultrassom e raio-X são usados no projeto como fontes de energia. Para transformar essa energia em luz, nano-sensibilizadores serão utilizados.

a) Nanocristais de TiO₂ será sonossensibilizadores [39].

b) Complexos de Eu com GOQDs ou outros ligantes serão utilizados como fotossensibilizadores

Nanocristais de TiO_2 não são estáveis. Eles rapidamente se aglomeram e precipitam. Portanto, eles precisam ser imobilizados em alguma matriz inerte. Silica porosa pode ser tal matriz, onde eles são estabilizados em forma de anatase com tamanho das partículas de 5 nm.[58]

Foi demonstrado recentemente que complexos metálicos de GOQs possuem atividade de fotoluminescência, gerando luz vermelha [28,59].

Devido à estrutura porosa do nanocompósito, esperamos que o FSS/SSS seja adsorvido muito próximo dos componentes ativos anticâncer, portanto espera-se alta eficiência de interação.

Problema II. O problema de baixa energia da luz que comumente usados.

Este problema pode ser resolvido usando o TiO_2 como um componente ativo da portadora. Entre semicondutores cristalinos, titânia (anatase, TiO_2) tem sido provado fotoativa, podendo gerar um singlete de oxigênio mediante tratamento fotoquímico [60,61]. O singlete de oxigênio pode ser gerado em TiO_2 sob UV (mecanismo de Nosaka), bem como a irradiação NIR.

Problema III. Alta toxicidade e baixa estabilidade do SSS e do FSS.

No projeto azul de metileno (MB) será usado como componente anticancerígeno-ativo na terapia fotodinâmica. Para limitar a toxicidade de MB e aumentar sua estabilidade, as nanopartículas são usadas como transportadores e MB será liberado de propósito somente sob tratamento TFD/TSD. Para isso, os ligantes fotoativos serão imobilizados em superfície de sílica /nanodiamantes, se necessário. Sob tratamento pela luz, os linkers liberarão MB.

Problema IV. Transportadores tem que ser com baixa citotoxicidade.

No projeto, para reduzir a toxicidade dos transportadores, duas abordagens serão utilizadas:

- GOQDs será imobilizado na superfície de transportadores na base de sílica. Devido à baixa citotoxicidade, os GOQDs podem reduzir a toxicidade dos nanocompósitos [50].
- Abordagem alternativo também será utilizado. Nanocompósitos híbridos à base de NDs e nanocristais de TiO_2 com GOQDs covalente imobilizados serão preparados e estudados como portadores (Objetivos, parte 2).

NDs não absorvem raios-X e provavelmente não gerarão espécies ativas e tratamento com ultrassom, mas descobrimos que eles podem estabilizar nanopartículas de TiO_2 , Fig. 8. Esta observação será explorada para a preparação alternativa nanocompósito NDs/ TiO_2 .

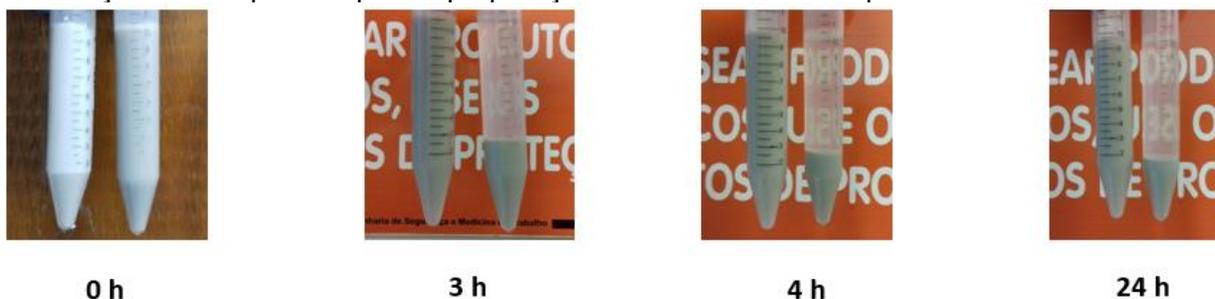


Fig. 8 Soluções salinas de NDs (1 wt.%) + TiO_2 (5 wt.%) (tubo esquerdo) e NDs (1 wt.%) (tubo direito) – as fotos foram feitas no laboratório.

Além disso, a baixa citotoxicidade dos nanocompósitos de NDs/ TiO_2 na solução salina foi observada, Fig.9. As condições dos testes de toxicidade conduzidos de acordo com o protocolo no item 9 de WP6.

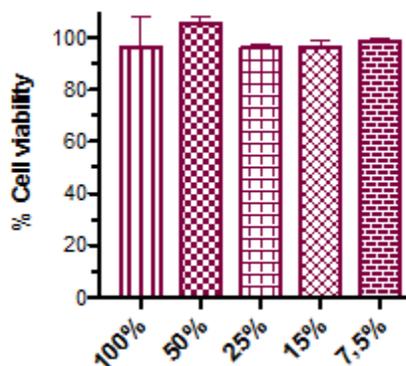


Fig. 9 Os resultados preliminares dos testes de citotoxicidade, usando as suspensões de NDs (1 wt.%) + TiO₂ (5 wt.%) na solução salina. As percentagens correspondem aos graus de diluição de NDs/TiO₂ com a solução salina.

Problema V. Instabilidade coloidal de nano-portadores em soluções fisiológicas

Devido à sua baixa área superficial (5-20 m²/g), nanocristais de TiO₂ puros são inviabilizados à aplicação biomédica além de tenderem a se aglomerarem e, conseqüentemente, formam cristais do tipo rutilo inativo. Entretanto, como uma peça de material compósito, o mesmo pode: a) estabilizar estrutura cristalina da anatase de TiO₂, b) assegurar o tamanho pequeno de partículas de TiO₂ para maior foto-eficiência (5-10 nm). Este óxido possui muitas aplicações biomédica promissoras para terapia fotodinâmica e a ultrassonográfica anticâncer. Em contraste ao TiO₂, a sílica amorfa pode formar partículas não porosas com superfície até 300 m²/g. A combinação de TiO₂ e SiO₂ pode contribuir para um material híbrido que possui as vantagens dos dois óxidos: grande área superficial da sílica e atividade da Titânia.

Por causa da carga altamente negativa de GOQDs em solução fisiológica, a imobilização desses objetos na superfície das nanopartículas (SiO₂, NDs) também pode aumentar a estabilidade da suspensão.

Problema VI. Os transportadores devem liberar o SSS ou o FSS apenas sob determinado tratamento.

A liberação do fármaco desencadeada a partir da superfície das partículas pode ser realizada por imobilização de grupos de ligação (tais como fotoativos derivados o-nitrofenol) que se ligarão ao fármaco-alvo com a superfície da partícula. Por causa da alta foto-atividade das partículas NDs, tais ligantes podem ser ativados no estado imobilizado que vai conduzir à libertação da SSS ou FSS.

Problema VII. O transportador deve desempenhar papel ativo no processo de TFD/TSD

Neste caso, as nanopartículas desempenham um papel ativo no processo de TFD e funcionam como materiais cintilantes e mediadores de energia [62].

Recentemente, foi demonstrado que o tratamento com ultrassom de materiais compósitos contendo TiO₂ pode gerar ROS em solução [63]. Ademais, a sonicação da solução pode também gerar ¹O₂ em água [64].

8. Os métodos

De acordo com os objetivos do projeto, a atividade de pesquisa será organizada nas próximas partes de trabalho (WP).

WP1. Desenvolvimento de procedimento adequado e preparação de nanopartículas híbridos à base de sílica com nanocristais de TiO₂ com GOQD ligados covalentemente na superfície

(SiO₂/TiO₂@GOQDs) para imobilização de SSS e SFS.

WP1.1. Preparação de nanopartículas híbridos à base de sílica com tamanho 40-80 nm, com nanocristais de TiO₂ (5-10 nm) no forme de anatasse.

WP1.2. Desenvolvimento do procedimento para imobilização covalente de GOQS na superfície de SiO₂/TiO₂

WP2. Desenvolvimento de procedimento adequado e preparação de nanopartículas híbridos à base de NDs e nanocristais de TiO₂ com GOQD ligados covalentemente na superfície (NDs/TiO₂@GOQDs) para imobilização de SSS e SFS.

WP2.1. Desenvolvimento do procedimento para preparação de nanopartículas híbridos à base de NDs (3-10 nm) e nanocristais de TiO₂ (10-60 nm)

WP2.2. Desenvolvimento do procedimento para imobilização covalente de GOQS na superfície de NDs.

WP3. Imobilização de componentes bioativos através de linker foto-clivável e outros ligantes (quelantes de metais) na superfície de NDs e SiO₂.

WP3.1. Imobilização de componentes bioativos na superfície de NDs/TiO₂@GOQDs

WP3.2. Imobilização de componentes bioativos na superfície de SiO₂/TiO₂@GOQDs

WP3.2. Preparação e investigação de complexos imobilizados de Eu (e outros metais) com fluorescência vermelha

WP4. Investigação de nanocompósitos híbridos.

WP4.1. Composição química

WP4.2. Tamanho de partícula e estrutura porosa.

WP4.3. Estabilidade da suspensão da água/ solução fisiológica.

WP4.4. Propriedades foto- e sonoluminescentes

WP4.5. Investigação de quimissorção e dessorção de componentes bioativos sem tratamentos de raios-X e ultrassom

WP5. Investigação da biocompatibilidade de partículas novas.

WP6. Investigação da capacidade das partículas do projeto geram espécies biologicamente ativas ou liberam SSS/FSS sob tratamento com raios X e ultrassom.

Abaixo o plano detalhado da pesquisa é apresentado.

1. Preparação dos transportadores ativos baseados em SiO₂/TiO₂ e otimização da síntese versus sua atividade sob irradiação TFD e TSD

A maior atividade fotocatalítica do composto SiO₂/TiO₂ foi detectada na proporção Ti/Si de 70/30. Estrutura porosa resultante do composto SiO₂/TiO₂ permite uma maior imobilização de compostos fotodinâmicos orgânicos e inorgânicos, para aumentar a eficiência de SiO₂/TiO₂ na geração de ROS. No processo de síntese dos seguintes reagentes serão utilizados: Na₂SiO₃, Ti(OBu)₄, Eu(NO₃)₃.

2. Otimização da síntese de GOQDs e investigação de sua imobilização em superfície de SiO₂/TiO₂ e superfície de NDs

A otimização do processo de obtenção dos pontos quânticos de grafeno (GOQDs) por pirólise de ácido cítrico será realizado afim de investigar a influência da temperatura (170 e 200°C) *versus* tempo (30 min - 24 horas) e fotoluminescência. Outra abordagem consiste na preparação de GOQDs no interior de poros de SiO₂, como um nano-reator [65].

3. Preparação dos complexos de GOQDs com metais terras raras (lantanídeos)

A preparação dos complexos de GOQDs com terras raras será realizada através da reação direta entre GOQDs com Eu^{3+} em etanol. A supressão de fluorescência na presença de Eu^{3+} na solução de GOQDs será realizada utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência.

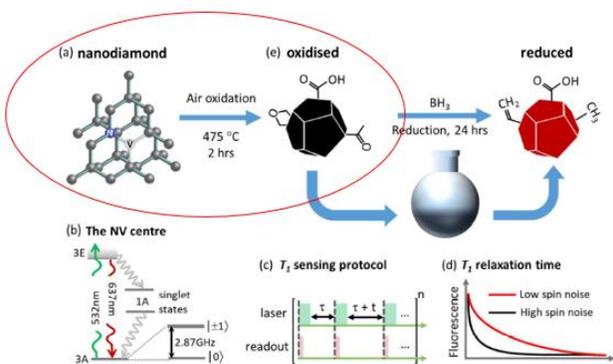
4. Imobilização GOQDs na superfície de sílica e $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ será realizada após a silanização da superfície com aminosilano, e posteriormente, a acetilação com GOQDs (com DCC ou EDC, comumente utilizados como ativadores de ácidos carboxílicos) para formar ligação covalente;

5. Ativação das nanopartículas: NDs

Reduzindo as funções na superfície de NDs a $-\text{OH}$ pode ser conseguido com borano e irá ser utilizado para a geração de uma grande quantidade de grupos hidroxilo superficiais. A outra possibilidade refere-se à hidrogenação das partículas, seguida da reação com O_2 gasoso obtendo-se terminados em grupos carboxílicos, Fig. 10.

Método para tratamentos de ND para oxidação a ND-COOH

10/04/2018



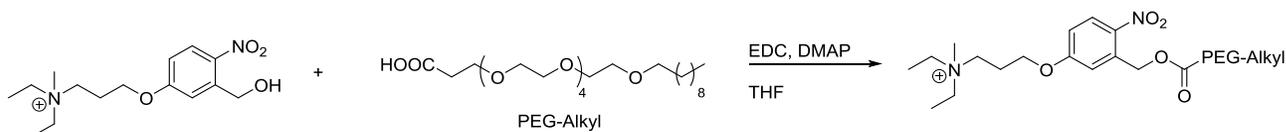
ACS Appl. Mater. Interfaces, Article ASAP

Fig. 10 Activation of ND surface to receive carboxylic fragments

6. Introdução de grupos superficiais bio-compatíveis para o NDs

o Imobilização não-covalente

Para a funcionalização das nanopartículas, as moléculas serão imobilizadas através de reações de amidação ou esterificação com os grupos carboxílicos presentes na superfície (ND-COOH), e posteriormente, o fármaco-alvo será adsorvido na superfície funcionalizada através de interações não-covalentes.



A molécula chave para a liberação controlada consiste em um fragmento contendo um grupo fotoclivável (nitrofenólico), ligado diretamente a cadeias oxialquílicas oligoméricas. Recentemente, Zaitsev e colaboradores demonstraram que tais moléculas que possuem cadeias oxialquílicas oligoméricas podem adsorver seletivamente antibióticos, quando imobilizados. Além disso, comprovou-se que a molécula utilizada foi capaz de liberar fármacos, quando imobilizados em nanopartículas de ouro. A imobilização não-covalente do medicamento pode permitir a sua liberação controlada, na sua forma nativa sem quaisquer outros compostos tóxicos, que permanece sobre a superfície da partícula após a irradiação de luz. Além disso, o método mais tarde pode dar a capacidade de droga mais elevada devido à menor complexidade de sequência de reações

químicas na superfície do transportador. (Ademais, o método poderá ser aprimorado futuramente para que medicamentos mais complexos possam ser utilizados devido à menor complexidade de sequências de reações químicas na superfície do transportador).

- Imobilização covalente

A estratégia utilizada consiste em "*Click chemistry*", a fim de para imobilizar uma molécula ligante foto-lábil aos NDs e GOQDs, através do qual medicamentos ou proteínas serão ligados, sem a necessidade da sua modificação química. Esta última característica representa uma grande vantagem: a maioria dos métodos para a integração das moléculas de fármaco à superfície das nanopartículas relatados até agora requerem a modificação química das drogas, Fig. 11.

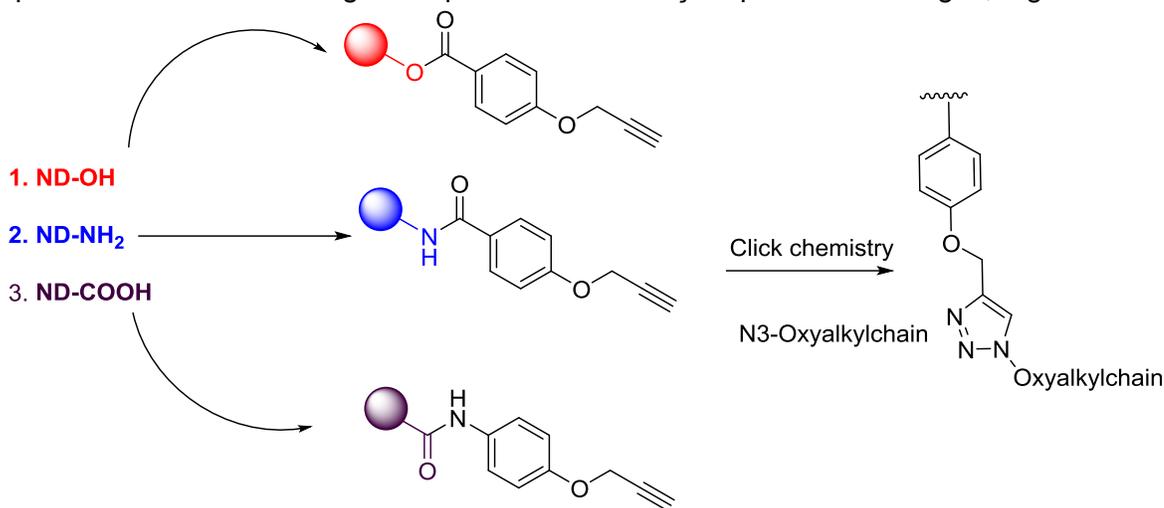


Fig. 11 Esquema da imobilização de grupos fotoativos usando "*Click chemistry*"

7. Métodos de caracterização das nanopartículas: Os seguintes métodos estão disponíveis:
 - Espalhamento Dinâmica de Luz (DLS) para estimar a distribuição das NPs em meio coloidal, (Central Analítica do Departamento de Química, PUC-Rio).
 - Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão para estudo da morfologia superficial e estrutural das NPs.
 - Estudos de fotoluminescência (espectros de emissão, excitação e decaimento de luminescência) com fluorímetro de alta resolução (Departamento de Química, PUC-Rio).
 - Difração de raios X para estudar composição de fase, cristalinidade, tamanho de cristal (PUC-Rio).
 - Adsorção-dessorção de nitrogênio de baixa temperatura validado por cálculo computacional usando a Teoria do funcional da densidade (DFT, o método Nguyen-Do modificado (MND) e o método modificado de Fowler-Guggenheim para analisar propriedades texturizadas, distribuição de tamanho dos poros, distribuição de energia de adsorção e distribuição de potencial de adsorção relativa à superfície das nanopartículas (PUC-Rio).
 - Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para uma estimativa precisa da concentração de lantanídeos em nanopartículas (PUC-Rio).
 - Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC) para investigar temperaturas características e obter informações de termoestabilidade e cristalinidade dos materiais preparados (PUC-Rio).
 - Espectroscopia de Absorção de Raios X (XANES) em modo de transmissão para estudar a valência, ambiente de coordenação e distorções geométricas dos íons Ln³⁺ (linha XAFS1 do LNLS).

- Luminescência óptica excitada por Raios X (XEOL) para obter informações do comportamento óptico do material quando irradiado por raios x, medindo-se o espectro de emissão e/ou a luminescência integrada em função da energia (linha XAFS2 do LNLS).
 - Espectroscopia de Ultravioleta da fonte de luz síncrotron UVX utilizando Monocromador de Grade Toroidal para realizar estudos de luminescência de nanocristais obtidos, investigar o comportamento da fotodegradação e fotoionização dos materiais e estudar as estruturas eletrônicas de nanocristais (linha TGM do LNLS).
8. Investigação das propriedades dos materiais obtidos (capacidade de gerar ROS, citotoxicidade, liberação de SSS/FSS) sob fotodinâmica e sonodinâmica será realizado em colaboração com a FIOCRUZ
- Avaliação de **citotoxicidade** pelo método de redução do MTT: Após cada condição analisada, será adicionado 25 μ L de sal MTT (5 mg/mL, Sigma®) e 175 μ L de DMEM. Após 3 h, o meio será removido e a ele será adicionado 100 μ L de DMSO. A absorvância será medida no leitor de placas a 570 nm (RISS et al., 2015).
 - Ensaio de **fototoxicidade**: As células serão incubadas com Calcein-AM (5 a 400 μ M) e depois expostas à luz LED vermelha (0,2 – 23 uW/ cm²) por 3, 6, 11, 15 e 30 min. A viabilidade celular será determinada pelo método MTT (PACHECO et al., 2016).
 - Avaliação da **fotodinâmica e sonodinâmica** in vivo: Desenvolvimento do modelo animal de glioblastoma: Será desenvolvido em camundongos machos C57BL/6, conforme descrito por Tamajusuku e Cols (SILVA et al., 2012).
9. Análise dos dados: descrever métodos, técnicas, testes estatísticos e/ou programas computacionais utilizados para trabalhar os dados obtidos.
- O tamanho das nanopartículas que formaram a estrutura cristalina pode ser calculado usando a equação de Scherrer,
 - O volume total de poros, V_p , é determinado no ponto de adsorção máximo, isto é, no $p/p_0 = 0,98- 0,99$.
 - A área superficial específica, S_{BET} , é calculada a partir do método BET padrão e parâmetros de porosidade textural. A distribuição incremental de tamanho de poro (IPSD) é estimada a partir de um ramo de dessorção por aplicação da regularização auto-consistente (SCR) que inclui os modelos de combinação dos três tipos de porosidade: poros cilíndricos, poros tipo fenda e espaços vazios entre as partículas, isto é, porosidade textural.
 - Todos os dados serão expressos através da média aritmética \pm DP (desvio padrão). Antes de iniciarmos os testes de inferência estatística, verificaremos se a amostra vem de uma distribuição normal para isso utilizamos o teste de D' Agostino e Pearson. Quando os dados seguirem uma distribuição normal, utilizaremos um teste paramétrico adequado e quando não seguirem, utilizaremos um teste não paramétrico. O nível de significância adotado será alfa de 5 % ($P < 0.05$) e todos os testes serão bicaudais.

9. Os resultados esperados (Milestones)

	resultados mais importantes	sucesso, %
1.	O Nanocompósitos SiO ₂ /TiO ₂ estabilizará nanocristais de TiO ₂ em anatasse	10
2.	Nanocompósitos à base de NDs com TiO ₂ demonstrarão alta estabilidade de suspensão em solução fisiológica	20
3.	Metodologia para imobilização de GOQDs em superfície de SiO ₂ /TiO ₂ ou NDs será desenvolvida	10
4.	Metodologia para imobilização de fragmentos fotoativos em superfície de NDs e GOQDs serão desenvolvidas	10
5.	Nanocompósito híbrido com NDs organicamente modificados de GOODs na forma nativa ou nos complexos com metais demonstrarão fluorescência intrínseca	20
6.	Nanocompósitos à base de NDs/TiO ₂ ou SiO ₂ /TiO ₂ mostrará atividade de TFD ou TSD	20

7.	Tratamento TFD ou TSD de NDs individuais ou GOQDs em imobilizados em formas SiO ₂ /TiO ₂ liberarão SSS ou FSS	10
----	---	----

10. Bibliografia relacionada ao projeto

1. *Nanotechnologies for the Life Sciences: 10 Volume Set*; Kumar, C. S. S. R., Ed.; Wiley-Vch, 2011.
2. *Nanoethics and Nanotoxicology*; Houdy, P., Lahmani, M., Marano, F., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011.
3. *Nanotechnologies for the Life Sciences Vol. 5. Nanomaterials – Toxicity, Health and Environmental Issues*; Kumar, C. S. S. R., Ed.; Wiley-Vch, 2006.
4. Han, G.; Ghosh, P.; Rotello, V. M. Functionalized Gold Nanoparticles for Drug Delivery. *Nanomedicine* **2007**, 2 (1), 113–123.
5. Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; et al. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett.* **2010**, 10 (9), 3223–3230.
6. *Hybrid Nanomaterials Synthesis, Characterization, and Applications*; Chauhan, B. P. S., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
7. Nazir, S.; Hussain, T.; Ayub, A.; et al. Nanomaterials in Combating Cancer: Therapeutic Applications and Developments. *Nanomedicine* **2014**, 10 (1), 19–34.
8. Chen, X.; Zhang, W. Diamond Nanostructures for Drug Delivery, Bioimaging, and Biosensing. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (3), 734–760.
9. Mochalin, K. T. and V. Biomedical Applications of Nanodiamond (Review). *Nanotechnology* **2017**.
10. Tanaka, K.; Chujo, Y. Design of Functionalized Nanoparticles for the Applications in Nanobiotechnology. *Adv. Powder Technol.* **2014**, 25 (1), 101–113.
11. Namdari, P.; Negahdari, B.; Eatemadi, A. Synthesis, Properties and Biomedical Applications of Carbon-Based Quantum Dots: An Updated Review. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 87 (88), 209–222.
12. Lim, S. Y.; Shen, W.; Gao, Z. Carbon Quantum Dots and Their Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (1), 362–381.
13. Szunerits, S.; Boukherroub, R. Antibacterial Activity of Graphene-Based Materials. *J. Mater. Chem. B* **2016**.
14. Chow, E. K.-H.; Ho, D. Cancer Nanomedicine: From Drug Delivery to Imaging. *Sci. Transl. Med.* **2013**, 5 (216), 216rv4.
15. Shang, W.; Zhang, X.; Zhang, M.; et al. The Uptake Mechanism and Biocompatibility of Graphene Quantum Dots with Human Neural Stem Cells. *Nanoscale* **2014**, 6 (11), 5799–5806.
16. Wang, D.; Zhu, L.; Chen, J.-F.; et al. Can Graphene Quantum Dots Cause DNA Damage in Cells? *Nanoscale* **2015**, 7 (21), 9894–9901.
17. Li, Y.; Dong, H.; Li, Y.; et al. Graphene-Based Nanovehicles for Photodynamic Medical Therapy. **2015**, 2451–2459.
18. van Nostrum, C. F. Polymeric Micelles to Deliver Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56 (1), 9–16.
19. Turcheniuk, V.; Raks, V.; Issa, R.; et al. Antimicrobial Activity of Menthol Modified Nanodiamond Particles. *Diam. Relat. Mater.* **2015**, 57, 2–8.
20. Khanal, M.; Raks, V.; Issa, R.; et al. Selective Antimicrobial and Antibiofilm Disrupting Properties of Functionalized Diamond Nanoparticles Against Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *Part. Part. Syst. Character.* **2015**, 32 (8), 822–830.
21. Turcheniuk, V.; Turcheniuk, K.; Boukaert, J.; et al. Affinity of Glycans-Modified Nanodiamonds towards Lectins and Uropathogenic Escherichia Coli. *ChemNanoMat* **2016**, 1–11.
22. Khanal, M.; Larssonneur, F.; Raks, V.; et al. Inhibition of Type 1 Fimbriae-Mediated Escherichia Coli Adhesion and Biofilm Formation by Trimeric Cluster Thiomannosides Conjugated to Diamond Nanoparticles. *Nanoscale* **2015**, 7 (6), 2325–2335.
23. Khanal, M.; Vausselin, T.; Barras, A.; et al. Phenylboronic-Acid-Modified Nanoparticles :

- Potential Antiviral Therapeutics. **2013**.
24. Li, D.; Chen, X.; Wang, H.; et al. Cetuximab-Conjugated Nanodiamonds Drug Delivery System for Enhanced Targeting Therapy and 3D Raman Imaging. *J. Biophotonics* **2017**, *11*, 1–12.
 25. Mochalin, V. N.; Shenderova, O.; Ho, D.; et al. The Properties and Applications of Nanodiamonds. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (1), 11–23.
 26. Bacteria, A.; Strassert, C. A.; Otter, M.; et al. Photoactive Hybrid Nanomaterial for Targeting , Labeling , and Killing. **2009**, 7928–7931.
 27. Rai, P.; Mallidi, S.; Zheng, X.; et al. Development and Applications of Photo-Triggered Theranostic Agents ☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (11), 1094–1124.
 28. Liu, Y.; Zhou, S.; Fan, L.; et al. Synthesis of Red Fluorescent Graphene Quantum Dot-Europium Complex Composites as a Viable Bioimaging Platform. *Microchim. Acta* **2016**, *183* (9), 2605–2613.
 29. Strassert, C. a.; Otter, M.; Albuquerque, R. Q.; et al. Photoactive Hybrid Nanomaterial for Targeting, Labeling, and Killing Antibiotic-Resistant Bacteria. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (42), 7928–7931.
 30. Ho, D. Beyond the Sparkle: The Impact of Nanodiamonds as Biolabeling and Therapeutic Agents. *ACS Nano* **2009**, *3* (12), 3825–3829.
 31. Huang, H.; Pierstorff, E.; Osawa, E.; et al. Active Nanodiamond Hydrogels for Chemotherapeutic Delivery. *Nano Lett.* **2007**, *7* (11), 3305–3314.
 32. Shimkunas, R. A.; Robinson, E.; Lam, R.; et al. Nanodiamond–insulin Complexes as PH-Dependent Protein Delivery Vehicles. *Biomaterials* **2009**, *30* (29), 5720–5728.
 33. Turcheniuk, K.; Khanal, M.; Motorina, A.; et al. Insulin Loaded Iron Magnetic Nanoparticle–graphene Oxide Composites: Synthesis, Characterization and Application for in Vivo Delivery of Insulin. *RSC Adv.* **2014**, *4* (2), 865–875.
 34. Cancer today IARC <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed Jun 21, 2018).
 35. Baldea, I.; Filip, a G. Photodynamic Therapy in Melanoma--an Update. *J. Physiol. Pharmacol.* **2012**, *63* (7), 109–118.
 36. Allison, R. R.; Moghissi, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin. Endosc.* **2013**, *46* (1), 24–29.
 37. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250–281.
 38. Trendowski, M. The Promise of Sonodynamic Therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **2014**, *33* (1), 143–160.
 39. You, D. G.; Deepagan, V. G.; Um, W.; et al. ROS-Generating TiO₂ Nanoparticles for Non-Invasive Sonodynamic Therapy of Cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (October 2015), 23200.
 40. Harada, A.; Ono, M.; Yuba, E.; et al. Titanium Dioxide Nanoparticle-Entrapped Polyion Complex Micelles Generate Singlet Oxygen in the Cells by Ultrasound Irradiation for Sonodynamic Therapy. *Biomater. Sci.* **2013**, *1* (1), 65.
 41. Costley, D.; Mc Ewan, C.; Fowley, C.; et al. Treating Cancer with Sonodynamic Therapy: A Review. *Int. J. Hyperth.* **2015**, *6736* (2), 1–11.
 42. Miyoshi, N.; Kundu, S. K.; Tuziuti, T.; et al. Combination of Sonodynamic and Photodynamic Therapy against Cancer Would Be Effective through Using a Regulated Size of Nanoparticles. *Nanosci. Nanoeng.* **2016**, *4* (1), 1–11.
 43. Darabdhara, G.; Das, M. R.; Turcheniuk, V.; et al. Reduced Graphene Oxide Nanosheets Decorated with AuPd Bimetallic Nanoparticles: A Multifunctional Material for Photothermal Therapy of Cancer Cells. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (42), 8366–8374.
 44. Turcheniuk, K.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. Gold–graphene Nanocomposites for Sensing and Biomedical Applications. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (21), 4301–4324.
 45. Chatterjee, D. K.; Fong, L. S.; Zhang, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy: An Emerging Paradigm. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (15), 1627–1637.
 46. Allison, R. R.; Sibata, C. H. Oncologic Photodynamic Therapy Photosensitizers: A Clinical Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2010**, *7* (2), 61–75.
 47. Chen, W.; Zhang, J. Using Nanoparticles to Enable Simultaneous Radiation and

- Photodynamic Therapies for Cancer Treatment. **2006**, 6 (4), 1159–1166.
48. Phillips, D. Toward Targeted Photodynamic Therapy. *Pure Appl. Chem.* **2011**, 83 (4), 733–748.
 49. Turcheniuk, K.; Dumych, T.; Bilyy, R.; et al. Plasmonic Photothermal Cancer Therapy with Gold Nanorods/Reduced Graphene Oxide Core/Shell Nanocomposites. *RSC Adv.* **2016**, 6 (2), 1600–1610.
 50. Turcheniuk, K.; Turcheniuk, V.; Hage, C.-H.; et al. Highly Effective Photodynamic Inactivation of E. Coli Using Gold Nanorods/SiO₂ Core-shell Nanostructures with Embedded Verteporfin. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (91), 16365–16368.
 51. Sviridov, A. P.; Osminkina, L. A.; Kharin, A. Y.; et al. Cytotoxicity Control of Silicon Nanoparticles by Biopolymer Coating and Ultrasound Irradiation for Cancer Theranostic Applications. *Nanotechnology* **2017**, 28 (10), 105102.
 52. Khanal, M.; Turcheniuk, V.; Barras, A.; et al. Toward Multifunctional “Clickable” Diamond Nanoparticles. *Langmuir* **2015**, 31 (13), 3926–3933.
 53. Turcheniuk, V.; Turcheniuk, K.; Bouckaert, J.; et al. Affinity of Glycan-Modified Nanodiamonds towards Lectins and Uropathogenic Escherichia Coli. *ChemNanoMat* **2016**, 2 (4), 307–314.
 54. Subramanian, P.; Motorina, A.; Yeap, W. S.; et al. An Impedimetric Immunosensor Based on Diamond Nanowires Decorated with Nickel Nanoparticles. *Analyst* **2014**, 139 (7), 1726.
 55. WHO. Globocan 2012 - Home. *Globocan 2012*. 2012.
 56. Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; et al. Global Cancer Statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **2015**, 65 (2), 87–108.
 57. García Fresnadillo, D. Generación Fotosensibilizada de Oxígeno Singlete. **2011**, 20 (1).
 58. Kumar, D. A.; Xavier, J. A.; Shyla, J. M.; et al. Synthesis and Structural , Optical and Electrical Properties of TiO₂ / SiO₂ Nanocomposites. **2013**, 3700–3707.
 59. Sun, Y.; Wang, X.; Wang, C.; et al. Red Emitting and Highly Stable Carbon Dots with Dual Response to PH Values and Ferric Ions. *Microchim. Acta* **2018**, 185 (1), 1–8.
 60. Buchalska, M.; Labuz, P.; Bujak, Ł.; et al. New Insight into Singlet Oxygen Generation at Surface Modified Nanocrystalline TiO₂--the Effect of near-Infrared Irradiation. *Dalton Trans.* **2013**, 42 (207890), 9468–9475.
 61. Nosaka, Y.; Daimon, T.; Nosaka, A. Y.; et al. Singlet Oxygen Formation in Photocatalytic TiO₂ Aqueous Suspension. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, 2917.
 62. Kamkaew, A.; Chen, F.; Zhan, Y.; et al. Scintillating Nanoparticles as Energy Mediators for Enhanced Photodynamic Therapy. *ACS Nano* **2016**, 10 (4), 3918–3935.
 63. Tachibana, K.; Endo, H.; Feril, L. B.; et al. Enhanced Mechanical Damage to in Vitro Cancer Cells by High-Intensity-Focused Ultrasound in the Presence of Microbubbles and Titanium Dioxide. *J. Med. Ultrason.* **2015**, 42 (4), 449–455.
 64. Matsumura, Y.; Iwasawa, A.; Kobayashi, T.; et al. Detection of High-Frequency Ultrasound-Induced Singlet Oxygen by the ESR Spin-Trapping Method. *Chem. Lett.* **2013**, 42 (10), 1291–1293.
 65. Mikhraliiyeva, A.; Motta, H.; Zaitsev, V. N. Effect of Functionalization of Porous Silica as Nanoreactor for Preparation of Fluorescent Carbon Dots. In *41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*; Foz do Iguaçu, 2018.

11. Plano do trabalho

WP No.	Tarefa	meses decorrido					
		1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36
1.	Desenvolvimento de procedimento adequado e preparação de nanopartículas híbridos à base de sílica com nanocristais de TiO ₂ com GOQD ligados covalentemente na superfície (SiO ₂ /TiO ₂ @GOQDs) para imobilização de SSS e SFS						
1.1	Preparação de nanopartículas híbridos à base de sílica com tamanho 40-80 nm, com nanocristais de TiO ₂ (5-10 nm) no forme de anatase.						
1.2	Desenvolvimento do procedimento para imobilização covalente de GOQS na superfície de SiO ₂ /TiO ₂						
2	Desenvolvimento de procedimento adequado e preparação de nanopartículas híbridos à base de NDs e nanocristais de TiO ₂ com GOQD ligados covalentemente na superfície (NDs/TiO ₂ @GOQDs) para imobilização de SSS e SFS						
2.1	Desenvolvimento do procedimento para preparação de nanopartículas híbridos à base de NDs (3-10 nm) e nanocristais de TiO ₂ (10-60 nm)						
2.2	Desenvolvimento do procedimento para imobilização covalente de GOQS na superfície de NDs.						
3	Imobilização de componentes bioativos através de linker foto-clivável e outros ligantes (quelantes de metais) na superfície de NDs e SiO ₂						
3.1	Imobilização de componentes bioativos na superfície de NDs/TiO ₂ @GOQDs						
3.2	Imobilização de componentes bioativos na superfície de SiO ₂ /TiO ₂ @GOQDs						
3.3	Preparação e investigação de complexos imobilizados de Eu (e outros metais) com fluorescência vermelha						
4	Investigação de nanocompósitos híbridos.						
4.1	Composição química						
4.2	Tamanho de partícula e estrutura porosa.						
4.3	Estabilidade da suspensão da água/ solução fisiológica						
4.4	Propriedades foto- e sono- luminescentes						
4.5	Investigação de quimissorção e dessorção de componentes bioativos sem tratamentos de raios-X e ultrassom						
5.	Investigação de biocompatibilidade de partículas novos						
6.	Investigação da capacidade das partículas do projeto geram espécies biologicamente ativas ou liberam SSS/FSS sob tratamento com raios X e ultrassom						