

# NANOMEDICINA: UN (R)EVOLUCIONARI CAMÍ PER COMBATRE EL CÀNCER

TREBALL DE RECERCA

*Pseudònim: Charles Darwin*



*“Fuera utopismos. Ni víctimas ni supervivientes. Lo que tienes que hacer para afrontar el cáncer es luchar para vivir.”*

Assumpta Tarragó, lluitadora i guanyadora de la batalla contra el càncer.

## ABSTRACT

The term nanotechnology refers to a number of disciplines intended to study materials and structures at the nanoscale. One of the most important areas of nanotechnology is nanomedicine, which is focused in great extent on the design and development of drug delivery systems. These drug delivery platforms can display very sophisticated properties and unique features, and are considered as the revolution of the conventional chemotherapies, specifically those to treat cancer.

In this work we can find a theoretical framework that explains the most important of this "Nanoscience", its applications and the way that is expected of it. Based on this basis, I have focused my experimental part on the development of two nanoparticles capable of entering tumor cells and liberating chemotherapy there, reducing side effects and improving pharmaceutical efficacy. Finally, I have deepened the current and future of cancer-applied Nanomedicine with two interviews with three great scientists.

# ÍNDEX

	PÀG.
1. Introducció	1
2. Hipòtesis i objectius	3
3. Metodologia	4
<b><u>MARC TEÒRIC</u></b>	5
4. Introducció a la nanociència: Nanotecnologia i Nanomedicina	6
4.1. L'escala nanomètrica	8
4.2. Introducció de la nanotecnologia a la societat	10
4.2.1. Beneficis i riscos de la nanotecnologia	12
4.2.1.1. Beneficis de la nanotecnologia	13
4.2.1.2. Riscos de la nanotecnologia	14
5. Nanopartícules	15
5.1. Tipus de nanopartícules contra el càncer	17
5.2. Aplicacions actuals de les nanopartícules	20
5.3. Nanopartícules dirigides	24
6. Nanomedicina aplicada al càncer	26
6.1. Nanodiagnòstic	27
6.2. Nanoteràpia i nanosistemes d'alliberació de fàrmacs	28
6.3. Nanomedicina regenerativa	30

6.4. Nanorobots	31
6.4.1. Nanorobots d'ADN per combatre el càncer	32
6.4.1.1. Per què utilitzar nanorobots contra el càncer?	32
6.4.1.2. Ús de la nanotecnologia per atacar el tumor	33
6.4.1.3. Resultats prometedors en models animals	34
6.4.2. El futur dels nanorobots a la branca de l'oncologia	35
7. Nanotoxicitat en els temps de la nanotecnologia	36
7.1. Com entrem en contacte amb les nanopartícules?	37
7.2. Com avaluem la nanotoxicitat?	39
<b><u>MARC PRÀCTIC</u></b>	41
8. Síntesi de nanopartícules, caracterització i test en models de cultius cel·lulars tumorals	42
8.1. Introducció	42
8.2. Objectius	44
8.3. Procediment de síntesi de nanopartícules: PLGA	45
8.4. Procediment de síntesi de nanopartícules: Eudragit L 100-55	51
8.5. Caracterització i test en cèl·lules tumorals	57
8.6. Discussió de resultats	60
9. Actualitat nanomèdica i nanofarmacològica	71
9.1. Entrevista Dra. Esther Vázquez i Dr. Toni Villaverde	74
9.2. Entrevista Dr. Simó Schwartz Jr.	76
10. Conclusions	79
11. Fonts documentals	82

<b>12. Glossari</b>	90
<b><u>ANNEXOS</u></b>	96
<b>13. Protocols de síntesi. Marc pràctic</b>	97
<b>13.1. Síntesi de nanopartícules de PLGA</b>	97
<b>13.2. Síntesi de nanopartícules d'Eudragit L 100-55</b>	103

## 1. INTRODUCCIÓ

La paraula càncer és una paraula que desperta a tothom sensacions de tota mena: records, pors, moments durs, moments de fortalesa... perquè, al cap i a la fi, tothom té algun conegut o familiar que ha estat víctima d'aquesta malaltia que afecta un percentatge molt gran de la població de totes les edats i regions del món.

Afortunadament, la ciència és un camp que avança a gran mesura dia rere dia en tots els seus àmbits. Però, què està fent la ciència per reduir la taxa de mortalitat de víctimes del càncer? Què ha aportat de nou? Ha trobat un nou tractament menys nociu?

És aquí on es troba el motiu d'elecció del meu treball. Considero que és important conèixer aquesta actualitat mèdica que incorpora nous mètodes de tractament i diagnòstic per tal de millorar la vida del malalt i d'aquells que l'envolten.

Des de fa uns anys la nanotecnologia s'està perfilant com una àrea emergent en ciència i tecnologia que ens està conduint a una nova revolució industrial.

El més interessant d'aquesta no és la possibilitat de treballar amb materials de reduïdes dimensions, sinó el canvi sovint radical que pateixen les propietats físiques i químiques de la matèria quan es treballa a aquesta escala: la conductivitat elèctrica, el color, la resistència o l'elasticitat, entre altres propietats.

La irrupció de la nanotecnologia en les ciències de la salut ha donat lloc a una nova disciplina denominada nanomedicina, l'objectiu principal de la qual és el desenvolupament d'eines per a diagnosticar, prevenir i tractar malalties quan estan encara en estats poc avançats o en l'inici del seu desenvolupament.

La nanomedicina estudia interaccions a la nanoescala i per a això utilitza dispositius, sistemes i tecnologies que inclouen nanoestructures capaces d'interactuar a escala molecular. Un dels grans reptes en aquest procés resideix en el desenvolupament de «nanoteràpies», dirigides específicament als teixits i òrgans malalts, evitant danyar a les cèl·lules sanes i, per tant, evitant els temuts efectes secundaris dels tractaments actuals.



Arriba un moment del període de tria del treball on a les meves ganes d'aprendre i de conèixer més sobre la medicina actual, se li suma una proposta: el Projecte Argó que ofereix la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquí, vaig trobar en l'àmbit de les biociències un tema que s'adaptava als meus gustos i que em motivava a iniciar un treball de recerca: "Què és i com funciona un nanofàrmac?"

Se'm va presentar l'oportunitat, vaig intentar-ho i ara, puc estar orgullós de la tria del treball i de, com aquest, m'ha ajudat a ampliar els meus coneixements i a obrir els meus ulls de cara a uns estudis posteriors relacionats amb aquesta branca.

Finalment, per concloure la meva introducció, vull agrair a tots aquells que d'una manera més directa o més indirecta han format part d'aquest projecte:

En primer lloc i com a màxim agraïment, agrair la meva tutora [nom] per donar-me l'oportunitat de realitzar una part pràctica en un entorn universitari amb un seguit de maquinària i estris de treball que mai hagués pensat que arribaria a utilitzar, per ajudar-me en tot moment i acompanyar-me en aquesta aventura de conèixer un petit món amb un gran ventall de beneficis per a tota la població.

A més a més, agrair també a la [nom], a en [nom] i a l' [nom] per totes les hores dedicades durant l'estiu i per compartir amb mi el seu coneixement i el seu dia a dia en un laboratori de recerca. Aquest agraïment va junt amb tot l'equip del Programa Argó i en especial, als meus companys de pràctiques, els quals també han format part d'aquesta gran i enriquidora experiència.

Tampoc puc deixar-me a tres grans científics que m'han obert els ulls i sempre han estat disposats a ajudar-me i a dedicar-me unes hores: Esther Vázquez, Toni Villaverde i Simó Schwartz Jr. Gràcies per respondre sempre i per fer-me un forat a unes agendes molt i molt ocupades.

Finalment, agrair a la meva família, que sempre ha estat allà donant-me suport i caminant al meu costat durant el meu procés d'elaboració.

## 2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Els objectius que m'he plantejat per aquest treball de recerca són els següents:

- Aprendre, conèixer i profunditzar en el món nanoscòpic i concretament en el seu vessant farmacològic.
- Profunditzar en la nanomedicina i trobar aplicacions i novetats en ella.
- Conèixer l'actualitat del món de la nanomedicina, com s'hi treballa en ella i el que s'espera en un futur d'aquesta branca científica.
- Dur a terme un marc pràctic on aplicar tots els coneixements adquirits amb la recerca bibliogràfica en un cas de cèl·lules tumorals.
- Treballar en un laboratori de recerca i aprendre tècniques bàsiques, sofisticades i innovadores relacionades amb la nanociència.
- Ser capaç d'endinsar-me en el món actual de la nanomedicina aplicada al càncer mitjançant entrevistes a científics especialitzats en el tema.
- Avaluar la meua autonomia i independència per afrontar un treball d'investigació.

I amb tot aquest seguit d'objectius, pretenc corroborar o desmentir dues hipòtesis:

- ▣ La nanomedicina millora les propietats farmacològiques utilitzant nanotecnologia: encapsulant a escala nanomètrica redueix toxicitat i aconsegueix millors resultats.
- ▣ La nanomedicina podria arribar substituir els tractaments actuals contra el càncer.

### 3. METODOLOGIA

Per tal de corroborar les meves hipòtesis primer de tot s'ha de conèixer més exhaustivament la malaltia i les possibilitats d'aquest "nanomón". Per aquest motiu, el cos del treball se centra en l'aplicació de la nanotecnologia en la societat, l'ús i característiques de nanopartícules, i finalment, de l'aplicació directa de la nanomedicina en càncer i en el seu impacte biològic.

Amb aquesta recerca bibliogràfica es busca obtenir una base teòrica sòlida per així, afrontar el tema amb la màxima evidència; seleccionant aquella informació que millor s'adaptava als objectius i que més reforçava les hipòtesis.

Pel que fa al marc pràctic, està dividit en dues parts ben diferenciades:

- En primer lloc es troba l'apartat de síntesi i caracterització de nanopartícules i el test d'aquestes en un model de cultiu de cèl·lules tumorals de neuroblastoma. Es tracta d'un seguit d'experiments realitzats al llarg de 3 setmanes a l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona. Aquestes pràctiques es troben dins del Projecte Argó, on vaig tenir la sort de ser acceptat per poder endinsar-me al món de la recerca i la investigació.
- A més a més, per acabar d'arrodonir tota la recerca, vaig posar-me en contacte amb 3 grans científics que treballen en nanomedicina avui dia i que van ajudar-me a acabar d'entendre el concepte bàsic del treball i sobretot, van fer-me canviar el punt de vista de la nanomedicina, explicant-me la veritable dificultat que té tirar endavant un projecte d'aquestes característiques i l'esperançador camí que s'espera d'aquesta en el càncer. Les transcripcions d'aquestes entrevistes es troben recollides en forma de revista.

An abstract graphic consisting of two flowing, wavy teal ribbons that intersect and loop around the central text. The ribbons have a subtle gradient and a fine, concentric-line texture, giving them a three-dimensional, liquid appearance.

# MARC TEÒRIC

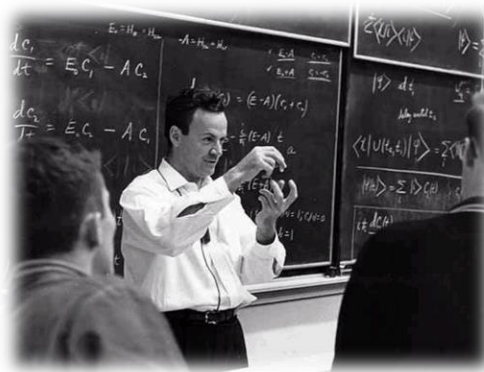
## 4. INTRODUCCIÓ A LA NANOCIÈNCIA: NANOTECNOLOGIA I NANOMEDICINA

La ciència i la tecnologia dels objectes de la nanoescala (nanopartícules, capes fines i monomoleculars, petites fibres, etc.) van ser matèria d'estudi molt temps abans de la instauració dels termes "nanociència" i "nanotecnologia", que van sorgir a mitjans de la dècada del 1970. Per ficar un exemple, el desenvolupament i manipulació de metalls i aliatges durant segles va involucrar tractaments mecànics i de calor, generant propietats especials de resistència a causa de la formació de nanoestructures. Si els artesans metal·lúrgics buscaven millorar els seus productes a base de prova i error, i certament podien reproduir els seus resultats, constituïen una veritable tecnologia. Per una altra banda, les primeres nocions de la ciència a la nanoescala es poden relacionar amb els experiments de Michael Faraday sobre les propietats òptiques de l'or col·loidal, en els quals relaciona els fenòmens observats amb la mida del material.

Avui dia, el terme *nanociència* s'utilitza per descriure els camps interdisciplinaris de la ciència que es dediquen a l'estudi de fenòmens i estructures que únicament apareixen a escala nanomètrica. La diversitat d'aplicacions i la complexitat dels problemes abordats impliquen la participació de físics, químics, biòlegs, bioquímics, farmacèutics i representants d'altres disciplines. La nanociència llavors, consisteix en l'estudi de materials i sistemes amb dimensions que es troben entre 1 i 100 nm a, com a mínim, una direcció. Les propietats dels sistemes nanoscòpics estan relacionades amb la seva composició i estructura particular. Per aquesta raó, la nanotecnologia implica el desenvolupament i fabricació d'aquests nous materials i dispositius per una gran varietat d'aplicacions com la conversió d'energia, l'emmagatzematge d'informació, el desenvolupament de dispositius electrònics avançats, la selecció de fàrmacs, i el treball amb sensors químics i biològics.

La primera menció d'alguns dels conceptes més característics de la nanotecnologia van tenir lloc a "*There's plenty of room at the bottom*" ("Hi ha molt lloc en el fons"), una xerrada donada pel físic Richard Feynman a l'American Physical Society en una trobada a Caltech el 29 de desembre de 1959.

Feynman va descriure un procés amb el qual amb l'ajuda d'habilitat per manipular àtoms i molècules individuals es podria arribar a desenvolupar. El fet de canviar d'escala variaria la magnitud de diferents fenòmens físics: la gravetat seria menys important, la tensió superficial i les forces de Van der Waals\* serien més importants, etc.



IMATGE 1. RICHARD FEYMAN A L'AMERICAN PHYSICAL SOCIETY A CALTECH EL 29 DE DESEMBRE DE 1959.

Les nanopartícules tenen capacitats molt diferents en comparació a les que tenen a escala macroscòpica i les podem distingir com a dos mons complementaris però amb una gran quantitat de diferències. Trobem un clar exemple en l'or, que és químicament inert a escales normals, però pot ser un potent catalitzador dins la nanoescala.

Però el fet de plantejar aquesta visionària proposta implica la qüestió de com arribar a aconseguir la manipulació i poder controlar l'organització dels àtoms i molècules dins la preparació de nous materials i dispositius. En aquest sentit, la biologia ha constituït una font d'inspiració: les cèl·lules i els seus components es construeixen per autoorganització i autoensamblatge\* de biomolècules com a fosfolípids\*, proteïnes, bases nitrogenades, etc. És a dir, es pot trobar un vincle entre els fenòmens estudiats a sistemes biològics i els aprofitats a la nanotecnologia, ja que la cèl·lula, la unitat fonamental de la vida, és essencialment, una col·lecció de sofisticades nanomàquines.

Al mateix temps, el desenvolupament de les noves eines nanocientífiques ha tingut un enorme impacte en el coneixement de la biologia, biotecnologia i la medicina. De la mateixa manera, la comprensió de la biologia amb l'ajuda de la nanotecnologia possibilitaria la producció de materials amb una arquitectura a nanoescala, sent aquests nanomaterials i els materials biològics, com els anticossos\* i les proteïnes, de dimensions comparables, facilitant l'ús d'aquests per aplicacions biològiques i mèdiques.

Els nanomaterials i nanodispositius s'estan desenvolupant de manera que disposin de característiques de disseny controlades a escala molecular i tinguin el potencial d'interactuar directament amb les cèl·lules i les macromolècules.

#### 4.1. L'ESCALA NANOMÈTRICA

Començaré definint l'escala nanomètrica, ja que tot al que em referiré al llarg del meu treball es troba dintre d'aquestes mesures.

La paraula *nano* té arrels gregues i significa molt, molt petit. A la ciència, nano s'utilitza com a prefix i significa la mil milionèsima part d'alguna cosa. Per exemple, un nanosegon és la mil milionèsima part d'un segon i ho definim com a  $10^{-9}$  segons o 0.000 000 001 segons, el mateix passa amb un nanogram ( $10^{-9}$  grams) i per descomptat amb el nanòmetre, el qual es defineix com a la mil milionèsima part d'un metre o  $10^{-9}$  metres i s'expressa com a 1 nm.

Per fer-nos una idea del que significa fabricar, observar i manipular objectes a escala nanomètrica, vull proposar un exercici. L'exercici tracta en suposar que teniu una tira de paper que mesura exactament un metre de llargada i que per tant, ho dividiu en deu parts iguals, les quals mesuraran aleshores un decímetre o  $10^{-1}$ m. El següent pas tracta de tallar amb unes tisores cadascuna d'aquestes deu parts d'un decímetre ( $10^{-1}$ m) repetint el procediment de tallar cada tira en deu parts iguals. Aleshores, obtenim 100 parts on cadascuna mesura un centímetre o  $10^{-2}$  metres. Repetiu aquest procediment un cop més fins a obtenir parts equivalents a un mil·límetre o  $10^{-3}$  metres.

Durant aquesta etapa, ja podem ser conscients que per arribar a l'escala nanomètrica és necessari repetir aquest procediment exactament 9 vegades. Però per continuar, ja no és suficient utilitzant unes tisores i una regla. Ara calen instruments més precisos i exactes: una lent d'augment, un micròmetre per mesurar i possiblement el suport de pinces per aguantar el petit tros de paper.

D'aquí es pot intuir que per arribar a l'escala nanomètrica es tenen una llarga quantitat de reptes científics i tecnològics molt importants, ja que per continuar amb el procediment proposat, seria indispensable obtenir les eines necessàries per fabricar, mesurar, observar i manipular els objectes a escales menors a les macroscòpiques.



IMATGE 2. VALORS DE L'ESCALA NANOMÈTRICA

Per aquesta raó, no és d'estranyar que, tot i que existeixen moltes estructures a la natura a escala nanomètrica, no ha estat fins fa pocs anys que podem observar-les i manipular-les, i així tenir una mena de control sobre elles. Per exemple, l'ADN (àcid desoxiribonucleic) dels éssers vius està format de molècules que formen ponts de mida nanomètrica. De la mateixa manera se sap que la majoria dels virus són de mida nanomètrica.

Per una altra banda, des de fa diversos segles que l'home ha estat capaç de fabricar dispositius formats per estructures a escala nanomètrica inconscientment. Un d'aquests exemples són els colorits vitralls de les catedrals europees construïdes a finals de l'Edat Mitjana i durant el Renaixement formats mitjançant l'addició de sals d'or, plata i/o coure durant la fabricació del vidre.



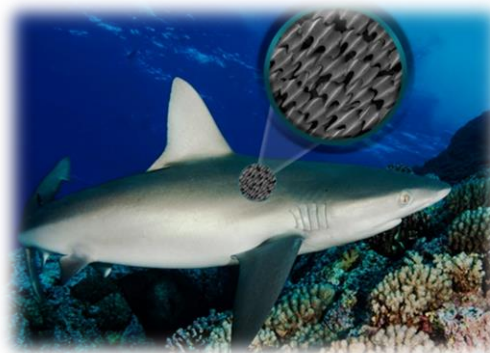
## 4.2. INTRODUCCIÓ DE LA NANOTECNOLOGIA A LA SOCIETAT

Des de sempre la raça humana ha intentat comprendre el complex funcionament de la naturalesa i aplicar-lo als seus propis problemes. Hi ha moltes limitacions tecnològiques que tenen solució en l'ecosistema. La forma en què una estructura natural les resol pot copiar-se utilitzant nanotecnologia.

Només fa aproximadament 20 anys que s'han començat a utilitzar propietats dels materials nanomètrics per a diversos motius. Segons el Dr. Andrew Parker, zoòleg i investigador:

*“Hemos detectado por primera vez en la historia que nosotros podemos, con la ingeniería convencional, no sólo reproducir las estructuras iridiscentes que se encuentran en la naturaleza, sino también podemos cultivar células para que lo hagan ellas para nosotros. Así que, en lugar de elaborar complicadas y costosas técnicas de ingeniería, podemos dejar que la naturaleza nos haga la parte más dura del trabajo.”*

Per exemple, després d'estudiar detalladament com els taurons, nedant en els oceans durant milions d'anys, no tenen cap problema amb l'acumulació d'algues i bacteris a la seva pell i en canvi, els submarins, bucs i altres infraestructures submergides artificials sofreixen d'això tret que se'ls apliqui una pel·lícula d'una substància química tòxica, s'ha descobert que la pell dels taurons està formada per un patró a escala nanomètrica que no permet que organismes com a algues o bacteris s'adhereixin a la seva pell rugosa.



IMATGE 3. PELL DE TAURÓ

Per a evitar problemes mediambientals a causa de la pel·lícula tòxica s'han començat a incorporar aquests patrons en aparells humans. Utilitzat ja pels vaixells de l'O.S. Navy\*, la companyia alemanya Lufthansa està experimentant amb un recobrint per als seus avions.

Alguna cosa semblant passa amb algunes fulles de plantes. La seva superfície està formada per patrons a escala nanomètrica. A més de tenir una superfície rugosa, conté uns nanofilaments de cera que no permeten que la gota d'aigua s'adhereixi a la fulla i pugui lliscar perfectament. No obstant això, partícules petites de brutícia queden enganxades a la fulla, però amb una superfície de contacte molt petita.

A causa d'això, quan una gota d'aigua entra en contacte amb la partícula, aquesta s'enganxarà perquè té més superfície de contacte amb la gota d'aigua que amb la mateixa fulla, generant l'acte de neteja de la planta. Aquest concepte ja ha estat aplicat en telèfons impermeables, parabrises o en la protecció de la fusta, entre altres.

Els espectaculars colors de les ales de les papallones no són per la pigmentació d'aquestes, sinó de nanoestructures distribuïdes sobre una membrana invisible, creant un efecte de polarització que només permet percebre la llum d'una longitud d'ona (color) determinada. La creació de colors de les papallones ha inspirat uns nous mètodes per a evitar la falsificació de bitllets i documents d'identitat.

Una altra possible aplicació nanotecnològica basada en la naturalesa és la reparació de vasos sanguinis per coixinets adhesius a partir del mètode d'agafar-se que utilitzen els geckos\*, entre altres rèptils, per a escalar verticalment. En la base dels seus dits tenen unes nanoestructures formades per milers de pèls microscòpics que li permeten adherir-se a les superfícies mitjançant forces de Van der Waals. Es confirma que és la geometria, no la química superficial, la qual cosa permet a un gecko aguantar tot el seu cos amb un sol dit.



IMATGE 4. GECKO I NANOESTRUCTURES DELS SEUS DITS

A part dels exemples explicats anteriorment hi ha hagut centenars de descobriments nanotecnològics basats en la naturalesa com els nous sistemes d'adhesius per a operacions ideats a partir del cap del cuc *Pomphorhynchus laevis*; la reparació de teixits humans a partir d'una proteïna, la resilina\*, treta de les puces o de les ales de les libèl·lules; el nou ciment orgànic basat en el nacre\* de mol·luscos o el que és actualment el material metàl·lic més lleuger, format el 99,9% d'aire però sent súper resistent i ideat a partir de les estructures de les dents de lleó, entre altres.

Els mètodes en què certs escarabats recullen les gotes de rosada\* també han estat imitats per a crear un adhesiu que podrà ser utilitzat en zones on l'aigua és escassa. La creació d'estructures mecàniques per a crear pròtesis a partir dels sistemes pels quals salta una llagosta, els quals no posseeixen músculs i la creació de sutures quirúrgiques a partir de les pues d'un porc espí són també tècniques que es preveuen que la nanotecnologia aconseguirà en un futur.

En l'àmbit d'aquest treball, l'ús de la nanotecnologia aplicada a la medicina es va iniciar perquè per a malalties que causen un gran nombre de morts com podrien ser el càncer, l'Alzheimer o el Parkinson no existeixen tractaments definitius i es necessiten nous mètodes de diagnòstic més ràpids, eficaços i específics i que permetin reduir els costos implicats. Actualment la nanomedicina promet tenir totes aquestes característiques, per la qual cosa és necessari invertir en ella. El punt 6 es dedicarà en exclusiva a la nanomedicina aplicada al tractament del càncer, tema central d'aquest treball.

#### **4.2.1. BENEFICIS I RISCOS DE LA NANOTECNOLOGIA**

En aquesta ciència, al moment de buscar la seva aplicació es podrà trobar infinitat d'usos, solucions a molts problemes de la societat, especialment en l'àmbit del medicinal.

Sempre trobarem aplicacions per a aquesta, no obstant això no hem d'oblidar les conseqüències que ens pot portar les mateixes:

#### 4.2.1.1. BENEFICIS DE LA NANOTECNOLOGIA

##### BENEFICIS EN LA SOCIETAT

- Nanotecnologia avançada pot arribar a resoldre molts problemes humans.
- Els ordinadors i dispositius de visualització serien increïblement econòmics i accessibles per a totes les persones.
- Els productes d'alta tecnologia poden permetre a la gent a viure amb molt menys impacte ambiental.
- Hivernacles barats per estalviar aigua, la terra i els aliments.
- La nanotecnologia fa possible l'energia solar.
- Els espais de vida podrien millorar molt.
- Els ordinadors serien prou econòmics per a tots.
- La nanotecnologia pot ajudar el medi ambient.
- Millora de la medicina àmpliament disponible.
- Eliminació de les causes d'angoixa per reduir el malestar social.

##### BENEFICIS EN L'ÀREA MÈDICA

- Les eines i el diagnòstic quirúrgic seran més sofisticades i més econòmiques.
- La recerca i el diagnòstic serà més eficient.
- Petits dispositius mèdics es podrien implantar de forma permanent.
- Més problemes mèdics es podrien prevenir.
- Les noves malalties es podrien detenir ràpidament.
- El diagnòstic i el tractament arribarien a ser semi-automàtics.
- Una millora de la salut i un augment de la vida útil.
- La fabricació molecular facilitarà la teràpia gènica

Cadascun d'aquests punts té els seus beneficis, que estan sent investigats, estudiats i desenvolupats per moltes universitats i centres de recerca a tot el món, amb una àmplia aplicació per a cada punt mostrat.

#### 4.2.1.2. RISCOS DE LA NANOTECNOLOGIA

En el cas de la nanotecnologia l'enorme impacte es notará en qüestió d'uns pocs anys, amb el perill de trobar la humanitat desprevinguda davant els riscos que tal impacte comporta.

##### IMPACTES EN LA SOCIETAT

- ◉ Importants canvis en l'estructura de la societat i el sistema polític.
- ◉ Riscos personals d'ús criminal o terrorista.
- ◉ Danys ambientals o riscos per a la salut dels productes no regulats.
- ◉ Inestable carrera d'armaments.
- ◉ Les armes nanotecnològiques serien extremadament poderoses i podrien conduir a una carrera armamentista perillosament inestable.
- ◉ La producció poc costosa i la duplicitat de dissenys podria portar a grans canvis en l'economia.
- ◉ La sobre explotació de productes barats podria causar importants danys al medi ambient.
- ◉ Danys ambientals o riscos per a la salut dels productes no regulat.
- ◉ El mercat negre en nanotecnologia.
- ◉ Les solucions senzilles no tindran èxit. És improbable trobar la resposta adequada a aquesta situació sense entrar abans en un procés de planificació meticulosa.

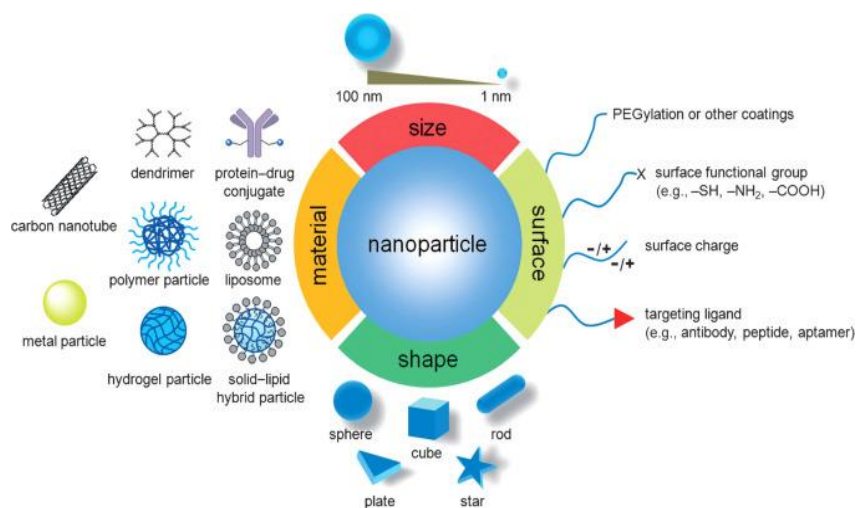
## IMPACTES A LA SALUT

- Al 1997 investigadors de la Universitat d'Oxford i la Universitat de Montreal van mostrar que el diòxid de titani i l'òxid de zinc usats com a nanopartícules en la majoria dels bloquejadors solars produeixen radicals lliures en les cèl·lules de la pell, danyant l'ADN.
- Al 2002, el Centre de Nanotecnologia Biològica i Ambiental de la Universitat de Rice, Houston, va informar que les nanopartícules s'acumulen en els òrgans d'animals de laboratori (fetge i pulmons). Això podria donar origen a tumors, igual que el mal de l'ADN. Els nanotubs, similars a finíssimes agulles, podrien clavar-se en els pulmons amb efectes semblants al qual provoca l'abscess\*.
- Al 2003 en un estudi sol·licitat pel Grup ETC, el tòxic-patòleg Vyvyan Howard va concloure que la grandària de les nanopartícules, més que el material que les constitueix, és un risc en si mateix perquè augmenta exponencialment el seu potencial catalític\* i el sistema immunològic no les detecta.
- Al 2004, Howard va informar en una conferència mundial sobre nanotoxicitat que les nanopartícules es mouen de la mare al fetus per mitjà de la placenta. Es va mostrar que les nanoesferes de carboni dissoltes en aigua, simulant un grau de contaminació ambiental comuna, danyen el cervell dels peixos i provoquen mortalitat en puces d'aigua.

## 5. NANOPARTÍCULES

Es defineix nanopartícula com a partícula que és més petita que 100 nanòmetres (mil milionèsima part d'un metre). En el camp de la medicina, es poden usar nanopartícules per a transportar anticossos, medicaments, elements per a les proves amb imatges i altres substàncies fins a certes parts del cos. Les nanopartícules estan en estudi per a la detecció, el diagnòstic i el tractament de càncer.

Les nanopartícules elaborades per a l'alliberament de fàrmacs poden estar fabricades de diferents materials: orgànics o inorgànics. La seva grandària oscil·la entre 1-100 nm i presenten una àmplia varietat de configuracions i estructures. Les característiques fisicoquímiques de les nanopartícules estan determinades per la seva grandària, forma, estructura, morfologia, propietats superficials, porositat, càrrega i la seva estabilitat en mitjans fisiològics. Davant tantes i diferents propietats les nanopartícules adquireixen una àmplia variabilitat entre elles que fa difícil la seva caracterització tant abans com després de la seva administració. Per a aconseguir monitorar-les i determinar-les són necessaris diferents mètodes analítics quantitatius. Un dels mètodes més importants i més utilitzats per a aconseguir la seva determinació és la polidispersitat\* (PD), que es tracta d'una mesura de l'heterogeneïtat\* de les nanopartícules en funció de la seva grandària, forma o massa. És important aconseguir una correcta caracterització d'aquests sistemes, ja que petits canvis en la polidispersitat o en les característiques fisicoquímiques dels mateixos poden generar una sèrie de greus canvis en propietats tan importants com la biocompatibilitat i toxicitat.



IMATGE 5. IL·LUSTRACIÓ REPRESENTATIVA DE LES CARACTERÍSTIQUES D'UNA NANOPARTÍCULA

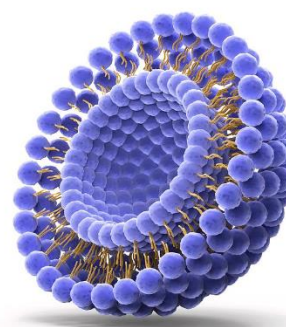


## 5.1. TIPUS DE NANOPARTÍCULES CONTRA EL CÀNCER

En 1995 la FDA va aprovar la primera nanomedicina contra el càncer: Doxil™, es tracta d'un liposoma carregat amb doxorubicina\*. A partir d'aquest any, la publicació d'articles científics relacionats amb “nanomedicina”, “nanociència” o “nanotecnologia” han anat creixent exponencialment fins als nostres dies. Els liposomes van ser els primers nanosistemes, encara que la seva ràpida degradació en el torrent sanguini va donar lloc a l'aparició de liposomes modificats, així com una altra sèrie de nanopartícules com a nanopartícules polimèriques, micel·les, dendrímers, nanotubs de carboni o partícules metàl·liques i magnètiques:

### LIPOSOMES

Els liposomes són vesícules compostes per lípids que tenen la capacitat d'acollir un fàrmac tant en el seu compartiment hidrofílic\* (interior) com en l'hidrofòbic\* (dins la bicapa lipídica). L'arribada d'aquests liposomes al tumor es realitza principalment pel que es coneix com “*Targeting Passive*”, és a dir, no consta de partícules actives en la seva composició que els faci dirigir-se d'una manera específica al tumor. El seu alliberament en el tumor està basada en l'efecte de millora de la permeabilitat i retenció, que es coneix com a efecte EPR\*, en el qual les característiques fisiològiques del tumor tenen una gran importància.



IMATGE 6. LIPOSOMA

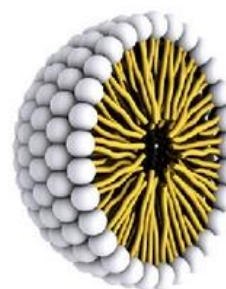
Aquests liposomes han anat evolucionant i actualment existeixen liposomes als quals se'ls uneix molècules actives com és el cas del propi Doxil™ amb mAb 2C5\* o Paclitaxel\* amb anti-HER2\*. Una altra varietat dels mateixos són els liposomes coberts amb molècules de polietilenglicol\* (PEG), els coneguts com a “liposomes silenciosos”, que fan que s'incrementi el temps de circulació.



## NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES I MICEL·LES

En el cas de les nanopartícules polimèriques, el fàrmac que transporten pot estar unit covalentment\* al polímer o bé, estar encapsulat en el seu interior. Aquests polímers poden ser tant d'origen natural com d'origen sintètic. Per a la seva fabricació, després de barrejar el polímer amb el fàrmac, pot ser que es formin càpsules espontàniament generant estructures conegudes com a micel·les\* o bé mitjançant tècniques d'emulsió\* que donaran lloc a un altre tipus de nanopartícules.

Aquests nanosistemes que formen nanoesferes tenen un nucli sòlid que permet la càrrega de fàrmacs hidrofòbics en el seu interior. Són molt estables i uniformes quant a grandària es refereix i poden ser utilitzades per a l'alliberament controlat del fàrmac



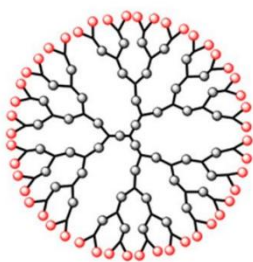
IMATGE 7. MICEL·LA

Igual que els liposomes, a aquestes micel·les també se'ls pot unir a la seva superfície molècules actives per a millorar les seves propietats farmacocinètiques\* com és la incorporació de PEG o d'àcid polilàctic (PLA) o polilàctic-glicòlic (PLGA).

Una nanopartícula de polilàctic-glicòlic (PLGA), juntament amb una d'Eudragit, forma part del conjunt de nanomolècules que vaig caracteritzar, sintetitzar i provar contra cèl·lules tumorals a l'IBB com a part pràctica del treball. A l'apartat introductori del marc pràctic focalitzaré i ampliaré la informació sobre aquestes dues nanopartícules farmacèutiques capaces d'incrementar la cura de diferents tipus de càncers.

## DENDRÍMERS

Es tracta d'estructures globulars de polímers amb nombroses ramificacions. En elles es troba un nucli ben definit i les ramificacions d'unitats que es repeteixen al llarg de tota la seva estructura globular. En l'exterior d'aquesta estructura es troba una capa de grups funcionals multivalents\*. Aquests grups externs són capaços d'interactuar electroestàticament\* amb molècules polars\*.

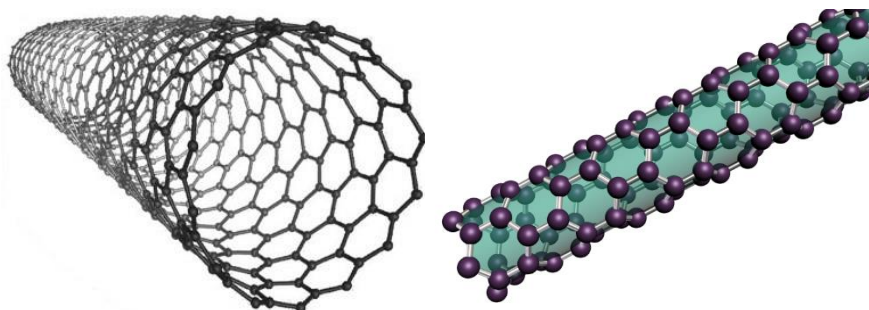


IMATGE 8. DENDRÍMER

En el seu interior es podran carregar fàrmacs de naturalesa hidrofòbica. A part d'aquestes interaccions, els grups funcionals externs també són responsables de l'alliberament controlat del fàrmac mitjançant modificacions que es produeixen en el medi, bé sigui per canvis que afectin el pH o per acció de certs enzims.

### NANOTUBS DE CARBONI

Aquestes estructures són capaces de penetrar en les cèl·lules gràcies a la seva forma de “agulla” i alliberar el fàrmac en el citoplasma. Aquestes nanopartícules tenen una àmplia superfície en la qual es poden unir un gran nombre de lligands\* actius. També posseeixen una cavitat interna on es pot carregar el fàrmac o l'agent terapèutic. Gràcies a la seva composició, els nanotubs de carboni són conductors elèctrics i tèrmics, la qual cosa els fa molt útils per a certs tractaments consistents en aplicació de calor com la variació tèrmica.

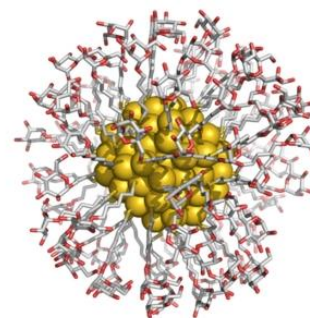


IMATGE 9. NANOTUB DE CARBONI

Un altre aspecte a tenir en compte són les seves dimensions: la longitud i el diàmetre han de ser prou petits com per a escapar de l'activació de l'efecte inflamogènic\* que li portaria a la seva biodegradació. També s'ha estudiat la seva possible aplicació com a agents de contrast en tècniques d'imatge, però no es realitzen assajos clínics amb ells pel fet que generalment produeixen toxicitat.

## NANOPARTÍCULES METÀL·LIQUES I MAGNÈTIQUES

Les nanopartícules d'or són una eina excel·lent per a conèixer les diferents interaccions biològiques que es donen entre les nanopartícules i el medi. L'ús d'aquestes molècules és degut a la seva poca o nul·la toxicitat. Posseeix una naturalesa biocompatible a causa de la seva superfície química específica i a les seves propietats elèctriques i òptiques úniques.



IMATGE 10. NANOPARTÍCULA D'OR

Els fàrmacs poden unir-se covalentment a la seva superfície o mitjançant enllaços iònics\*, igual que el PEG que també es pot adherir a aquest tipus de nanopartícules incrementant l'estabilitat i el temps de circulació d'aquesta. D'altra banda, també s'han sintetitzat nanopartícules supermagnètiques d'òxid de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Les nanopartícules amb aquesta propietat especial podran ser dirigides cap a la zona tumoral mitjançant l'aplicació d'un camp magnètic extern que es focalitzi en un lloc concret del cos i aconseguir una localització i alliberament exacte del fàrmac.

## 5.2. APLICACIONS ACTUALS DE LES NANOPARTÍCULES

Les nanopartícules formen part del nostre entorn i constantment mantenim contacte directe amb elles sense ser conscients. Entre les aplicacions més prometedores en l'actualitat destaquen:

### LLIURAMENT MÉS EFECTIU DE MEDICAMENTS

En els nanofàrmacs, els medicaments s'encapsulen en una escala microscòpica. Seguint una espècie d'algoritme\* molecular, el fàrmac es lliura en la seqüència correcta, així es redueix els efectes col·laterals i concentra les dosis a les regions malaltes.

En el tractament del càncer, la innovació garanteix la transferència dels quimioteràpics únicament a les cèl·lules malaltes, evitant que les sanes siguin danyades i eliminades de manera permanent de l'organisme.

### MILLORA DE LA QUALITAT DELS EXÀMENS D'IMATGE

Destaquen els sensors de grandària semblant al dels àtoms o molècules, capaces de “llegir” cèl·lules, enzims, anticossos i bacteris que reconeixen quan alguna cosa està malament. Els exàmens d'imatge han avançat molt, principalment en la detecció cada vegada més ràpida i eficaç de tumors.

### CIRURGIES MENYS INVASIVES

Procediments intel·ligents i molt menys invasius. Per exemple, els adhesius quirúrgics amb nanotecnologia, que són capaços d'evitar els talls tradicionals i també de proporcionar una cicatrització més efectiva de la pell.

### TRACTAMENT D'AIGÜES

En l'àrea ambiental destaca el tractament d'aigües per mitjà de la tècnica que utilitza bombolles minúscules, molt menors que les que es veuen en les gasoses.

Les anomenades nanobombes alliberen un corrent estàtic capaç d'atreure bacteris i metalls. Els radicals\* lliures també s'alliberen i ajuden a destruir els virus presents en l'ambient.

### MILLORA DE LA CAPACITAT DE CONVERSIÓ DEL CO<sub>2</sub>

Els estudis per a la producció de plantes biòniques\* també han avançat en els últims temps. A més d'expandir la capacitat de fotosíntesi dels vegetals, permetent una conversió més gran de CO<sub>2</sub> en oxigen, aquests poden ajudar a detectar la presència de gasos nocius i contaminants en l'ambient.

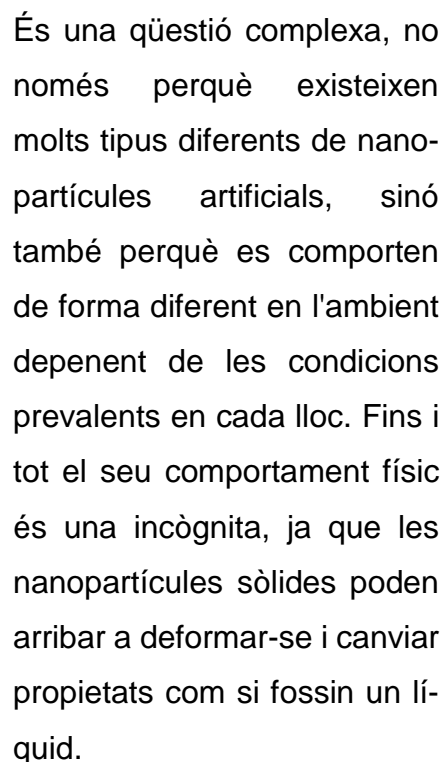
### MENOR ÚS DE PLAGUICIDES EN L'AGRICULTURA

Encapsular les pròpies pesticides en una escala nano és una cosa prometedora per a l'agricultura i per a la mateixa naturalesa.

Això perquè una quantitat diminuta de la substància garanteix la mateixa funcionalitat, reduint l'ús de l'aigua i oferint més seguretat a les persones que treballen en la seva aplicació.


Aquesta és la conclusió d'un equip de l'Escola Politècnica Federal (ETH), en alemany *Eidgenössische Technische Hochschule*, de Zuric, a Suïssa. Després de realitzar una gran revisió de la literatura científica sobre el tema, afirmen que només quan els científics adoptin un enfocament més estandarditzat serà possible comprendre els efectes que les nanopartícules tenen sobre l'ambient, incloent-hi els éssers humans.

D'acord amb l'equip, fins i tot els especialistes involucrats en els estudis científics troben difícil dir exactament el que succeeix a les nanopartícules una vegada que arribin a l'aigua o al sòl.



Treball de Recerca

## Exemples d'aplicacions de nanopartícules metàl·liques, ceràmiques i polimèriques

Medicina	<p>Gases per cremades greus o ferides cròniques, desenvolupades i creades per la companyia canadenca Weistmer. Conté nanopartícules de plata. La plata és una bactericida*, que en forma de nanopartícula incrementa la seva àrea superficial millorant aquesta eficiència antibacteriana contra 150 tipus de microbis, incloent-hi els resistents a drogues i medicaments. S'utilitza actualment en més de 100 dels 120 hospitals per a cremades de Nord Amèrica</p>
	<p>Crema per a dolors musculars i articulacions "Flex Power". Utilitza liposomes de 90 nm.</p>
	<p>Adhesiu dental de 3M. "Adper Single Bond Plus Adhesive", adhesiu amb nanopartícules de silici per formar unions més fortes amb l'esmalt i les corones* en treballs de restauració dental, endodòncies* o incrustacions de porcellana. Avui dia al mercat hi ha disponible la pasta de dents amb nanohidroxiapatita*, un material utilitzat per a la regeneració de l'ós i cirurgia periodontal*.</p>
Higiene	<p>Desinfectants militars, utilitzat als avions per tal de combatre el problema del SARS (síndrome respiratori agut sever) a base de nanoemulsions.</p>
Esports	<p>Pilotes de golf produïdes per NanoDynamics, que corregeixen vibracions canalitzant l'energia rebuda pel pal de golf, millor que les pilotes convencionals. Porten a la venta des de l'estiu de 2005.</p> <div data-bbox="1050 1507 1353 1727">  </div> <p>IMATGE 12. PILOTA DE GOLF NANODYNAMICS</p> <p>Pilotes de tennis de la famosa marca Wilson. Recobertes de nanopartícules per allargar la seva duració.</p>

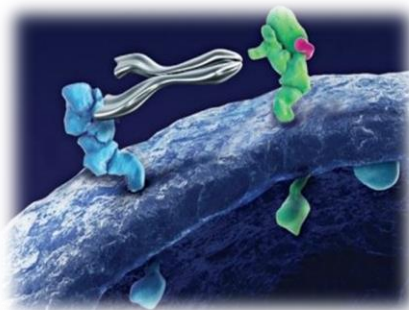


Ús domèstic	Recobriments superhidrofòbics repel·lents de brutícia, creada per BASF. S'utilitza com a recobriment de maons i guix dins la indústria tèxtil i automotriu*. És un additiu a base de nanopartícules utilitzat per reforçar l'efecte hidrofòbic en materials de construcció, reduint l'adhesió de l'aigua i partícules de terra al mínim. Les partícules de brutícia es netegen amb l'aigua de la pluja.
	Rentadores creades per Samsung. Amb nanopartícules de plata incorporades a la tina*, conegudes pel seu poder bactericida.
Cuidats personals	Great American Knitting Mills, Inc (New York City), Guoxin Hosieryn Series i Fibra Antibacterial (Hyosung de Korea del Sur). Tèxtil amb nanopartícules de plata per a l'elaboració de mitjons i altres productes de vestir. Mpan Nano-Magic Silver: 99,9% efectives per prevenir infeccions com peu d'atleta i altres causades per fongs.

### 5.3. NANOPARTÍCULES DIRIGIDES

L'avanç de la nanotecnologia en l'última dècada ha impulsat el desenvolupament de nombroses aplicacions mèdiques; però cap tan prometedora com la de l'ús de nanopartícules dirigides per a millorar el tractament del càncer, que té greus efectes secundaris.

Les nanopartícules dirigides són com un sofisticat “cavall de Troia”: aprofiten els processos físics i químics del cos humà per a arribar camuflades fins a l'interior de les cèl·lules canceroses, on alliberen el seu arsenal anticancerós. A més, amb aquesta “estratègia de guerra cel·lular” les nanopartícules eviten a les defenses de l'organisme i disminueixen els danys col·laterals en els teixits sans.



IMATGE 13. NANOPARTÍCULA DIRIGIDA

El benefici serà una quimioteràpia més efectiva i menys tòxica, si aquesta nanotècnica supera la fase d'assajos clínics.

Fins ara els resultats són esperançadors en la fase 1 dels assajos, que indiquen una regressió dels tumors encara utilitzant unes dosis de medicaments antitumorals menors que en la quimioteràpia convencional.

Investigadors del MIT (Massachusetts Institute of Technology) i del Brigham and Women's Hospital de Boston van dissenyar unes nanopartícules capaces de complir per primera vegada simultàniament amb aquests requisits:

- Circulació prolongada: gràcies a un revestiment de polietilenglicol (PEG), des de fora les nanopartícules semblen diminutes gotes d'aigua. Això despista durant un temps a les defenses del cos humà: les nanopartícules es queden molt més temps en la sang i tenen més possibilitats d'arribar a un tumor abans de ser eliminades.
- Dirigides al tumor: amb una grandària de 50 a 100 nanòmetres, són massa grans per a arribar a teixits sans a través dels seus finíssims capil·lars sanguinis. Però els tumors creixen molt ràpidament i els seus vasos sanguinis són defectuosos, amb buits pels quals sí que poden colar-se les nanopartícules. A més, les nanopartícules "reconeixen" a les cèl·lules canceroses perquè porten incrustades unes molècules específiques que s'uneixen a una proteïna (PSMA\*), abundant en la superfície de les cèl·lules de diversos tipus de tumors.
- Lliurament controlat del medicament: les nanopartícules són càpsules buides que transporten en el seu interior molècules de docetaxel, un medicament usat habitualment en quimioteràpia per a tractar el càncer de mama, el de pulmó o el de pròstata. Les nanopartícules estan "programades" per a alliberar la seva càrrega dins les cèl·lules canceroses i a una velocitat adequada.



El gran repte d'aquesta tècnica és donar amb la combinació adequada d'aquestes tres propietats. Per a superar la fase d'assajos clínics, els investigadors han d'afinar el disseny de les nanopartícules, buscant una situació ideal. I és que, en la pràctica, l'equilibri de factors és complicat. Per exemple, augmentar la grandària de les nanopartícules dificulta que afectin els teixits sans, però arriba una grandària en què són massa grans per a poder atacar a les cèl·lules canceroses o per a evitar a les defenses del cos humà.

Encara queda un llarg camí per recórrer. Encara que en les primeres proves la quimioteràpia amb nanopartícules ja s'hagi mostrat més específica que la convencional, encara succeeix que en alguns casos no arriba suficient medicament al tumor o que el medicament afecta massa a teixits sans. En la pràctica, les nanopartícules dirigides encara no distingeixen tan bé entre cèl·lules sanes i canceroses.

Per a reduir més aquests efectes secundaris en teixits sans es poden dissenyar nanopartícules més dirigides cap a cèl·lules canceroses. Tanmateix, això les fa menys viables tècnicament i més cares de produir. Controlar la toxicitat de les restes és un altre dels reptes dels assajos clínics, que es prolongaran durant aquesta dècada, abans que la gran promesa de les nanopartícules contra el càncer es converteixi en una realitat.

## 6. NANOMEDICINA APLICADA AL CÀNCER

Quan la nanotecnologia s'aplica a la salut sorgeix la nanomedicina. És a dir, la nanomedicina és la branca de la nanotecnologia que permet curar malalties des de dins del cos a escala cel·lular i molecular, aplicant tècniques que permetin el disseny de fàrmacs. L'objectiu de la nanomedicina és el diagnòstic, la teràpia i la prevenció de malalties poc avançades dirigint els tractaments al teixit malalt, evitant danyar les cèl·lules sanes i reduir els efectes secundaris; així com el desenvolupament d'una medicina més personalitzada a cada individu.

La nanomedicina pot dividir-se en tres àrees: nanodiagnòstic, que consisteix a detectar una malaltia o mal funcionament cel·lular a partir de nanodispositius, en aquest cas, la localització del càncer; la nanoteràpia, és a dir, l'alliberament controlat de fàrmacs i la nanomedicina regenerativa, la regeneració dels teixits i òrgans danyats a partir de la teràpia gènica.

## 6.1. NANODIAGNÒSTIC

Com he mencionat anteriorment, el nanodiagnòstic consisteix en la detecció de malalties des dels seus inicis.

En l'última dècada s'ha descobert que la membrana cel·lular pot ser utilitzada com un indicador de la malaltia, ja que aquesta és responsable d'una gran quantitat de funcions de regulació cel·lular i de processos metabòlics on es poden manifestar algunes de les alteracions del càncer. Una ràpida detecció permet una ràpida capacitat de resposta i aplicació del tractament adequat facilitant la seva cura. La localització del càncer es fa mitjançant nanodispositius, generalment nanopartícules.



IMATGE 14. NANODISPOSITIU CAPAÇ DE CAPTAR IMATGES DE L'INTERIOR DEL COS

Els sistemes de nanodiagnòstic es poden emprar *in vitro*\* o *in vivo*\*: el nanodiagnòstic *in vivo* requereix que els dispositius puguin entrar en el cos humà per a determinar la presència de cèl·lules canceroses. Per a això, el material ha de ser biocompatible amb l'organisme humà i tenir un detallat disseny per ser eficaç i reduir els efectes secundaris. D'altra banda, el nanodiagnòstic *in vitro* brinda una major tolerància de disseny, ja que els nanodispositius no han de ser biocompatibles i són capaços de detectar amb gran rapidesa i precisió la presència de defectes en l'ADN a partir de mostres de fluids corporals o de teixits molt reduïdes.

Actualment hi ha dues principals àrees de treball dins del nanodiagnòstic: els nanosistemes d'imatge i els nanobiosensors, encara que es preveu per a un futur la utilització de laboratoris en un xip (*Lab-on-a-chip*):

- Nanosistemes d'imatge: S'utilitzen nanopartícules metàl·liques, magnètiques o semiconductores per a marcar l'àrea identificada, és a dir actuen com a marcadors biològics permetent així augmentar la precisió i donar un major contrast en les tècniques de creació d'imatge. Els punts quàntics\*, han estat un dels primers nanosistemes que s'han utilitzat per a realitzar aquest marcatge i identificació de les zones danyades amb tumors. Com tenen característiques de fluorescència, emeten diferents longituds d'ona en funció de la seva grandària, per la qual cosa són molt efectius com a marcadors biològics. A més a més, amb un únic feix de llum es poden excitar punts quàntics de diferents grandàries, i per tant, de diferents colors, deixant així realitzar diversos marcatges en un mateix moment.

Propietats molt semblants tenen les nanopartícules metàl·liques, com l'or, i magnètiques, com el ferro, on el seu caràcter magnètic podria facilitar el seu transport a través de l'organisme mitjançant l'ajuda d'un camp magnètic extern.

Per a poder detectar la malaltia desitjada, en aquest cas càncer, les nanopartícules porten en la seva superfície anticossos davant de la proteïna de la cèl·lula que es vol localitzar i, per a evitar que el nanodispositiu sigui captat per les cèl·lules del sistema immune, es recobreixen de substàncies presents en l'organisme. En arribar a la cèl·lula desitjada, les nanopartícules s'adhereixen a la seva membrana creant mapes tridimensionals dels teixits i permetent detectar les zones en les quals s'han acumulat.

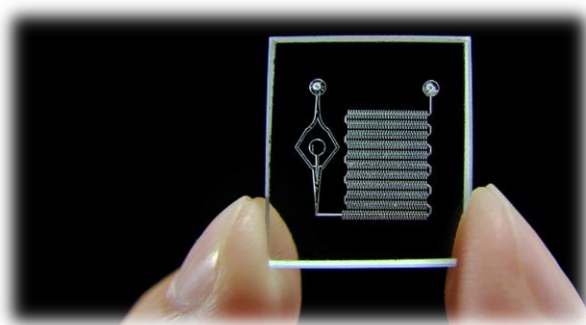
- Nanobiosensors: Dispositius que no necessiten marcadors fluorescents o radioactius que poden identificar amb molta precisió principis biològics i químics al moment.

Estan formats per un sensor que determina la reacció metabòlica d'una cèl·lula o molècula i la tradueix en informació i per un receptor biològic que detecta una substància en concret. En trobar-se unides aquestes dues estructures, els biosensors són molt més sensibles i selectius.

Els nanobiosensors poden realitzar l'anàlisi de la substància a determinar de forma directa i a temps real a més de fer-ho de manera molt precisa i detallada. Això permet que aquestes estructures analitzin qualitativa i quantitativament diverses reaccions de l'organisme a més de poder estudiar el comportament del cos humà. El fet de tenir una grandària d'escala nanomètrica possibilita la seva introducció en el cos humà oferint dades més reals de la salut del pacient i que la quantitat de mostra necessària sigui molt petita.

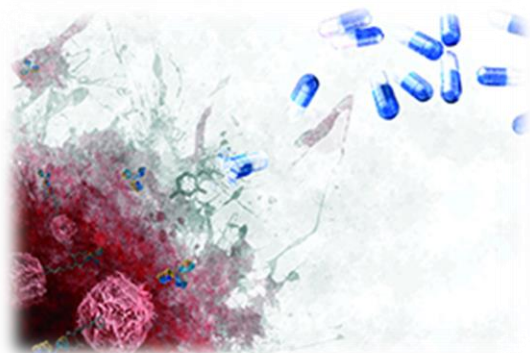
- Sistemes “laboratori-en-un-xip”: Són plataformes a escala nanomètrica que incorporen nanobiosistemes o nanocanals, entre altres, on tenen lloc complicades reaccions químiques i bioquímiques.

Aquests dispositius presenten els avantatges d'una anàlisi ràpida pel fet que la mostra és molt reduïda, són molt autònoms, poden realitzar les anàlisis sense la participació de l'humà, i a més a més són portàtils i d'un sol ús. Es creu que en el futur un simple nanosistema amb nanosensors podria, a partir de mostres de sang, realitzar un diagnòstic a través del reconeixement de l'activitat molecular permetent així poder fer aquestes anàlisis de manera ambulatoria.



IMATGE 15. MODEL DE LAB-ON-A-CHIP

## 6.2. NANOTERÀPIA I NANOSISTEMES D'ALLIBERACIÓ DE FÀRMACS



IMATGE 16. REPRESENTACIÓ DE L'ALLIBERAMENT FARMACOLÒGIC

Es basa en la utilització de nanopartícules que poden utilitzar-se com a agents terapèutics.

A l'interior de la nanopartícula es troba el fàrmac que actuarà només en les cèl·lules malaltes, les cèl·lules diana\*, permetent reduir la dosi.

Per a això és essencial la prèvia encapsulació i desactivació del fàrmac perquè no actuï durant el seu trajecte pel cos. Una vegada la nanopartícula arriba a la seva destinació gràcies a l'acció d'antígens i anticossos que dirigeixen la nanopartícula al teixit desitjat, es pot induir el seu alliberament, a una velocitat apropiada perquè sigui efectiu, com a resposta a diferents estímuls.

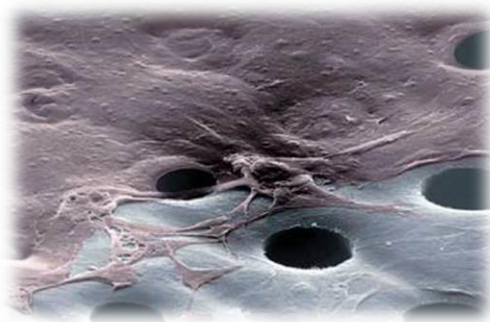
L'activació del fàrmac és deguda a la vibració de les nanopartícules mitjançant l'aplicació d'un camp magnètic de baixa intensitat o per irradiació amb llum infraroja que fa possible que la nanopartícula es desintegri deixant actiu el fàrmac. L'escalfament produït provoca la destrucció de la nanopartícula per hipertèrmia, sense afectar les cèl·lules sanes que les envolten. També es pot donar el cas que el contacte directe amb la cèl·lula tumoral permeti que la nanopartícula entri en aquesta cèl·lula per endocitosi i que a l'interior d'un lisosoma es produeixi la destrucció de la membrana de la nanopartícula.

La utilització d'aquesta tecnologia per al tractament del càncer evitaria els efectes secundaris dels actuals tractaments de quimioteràpia o radioteràpia.

## 6.3. NANOMEDICINA REGENERATIVA

S'encarrega de la reconstrucció d'òrgans i teixits danyats a partir de la teràpia gènica, de la teràpia cel·lular i de l'enginyeria de teixits per a estimular els mecanismes que té el cos humà per a reparar els errors del seu organisme i regenerar-se.

Per a poder realitzar aquest procés és indispensable crear motlles nanomètrics compatibles amb l'organisme humà, que siguin porosos per a permetre la circulació de líquids, i dotar-los de característiques que puguin afavorir el creixement de teixit en una zona en concret mitjançant la colonització per cèl·lules mare adultes del pacient i una sèrie de molècules que iniciïn la regeneració.



IMATGE 17. REGENERACIÓ DE CÈL·LULES EPITELIALS

Aquests motlles s'implanten en el pacient i, quan el teixit estigui parcialment regenerat, es reemplacen per teixit normal, amb nervis i vasos sanguinis. Es preveu que en un futur es podran desenvolupar nanoestructures capaces de detectar i reparar errors en el cos humà sense haver de ser supervisades. Actualment es pretén crear nanoestructures per a substituir l'hemoglobina (proteïna transportadora d'oxigen pels vasos sanguinis), *els respirocits*.

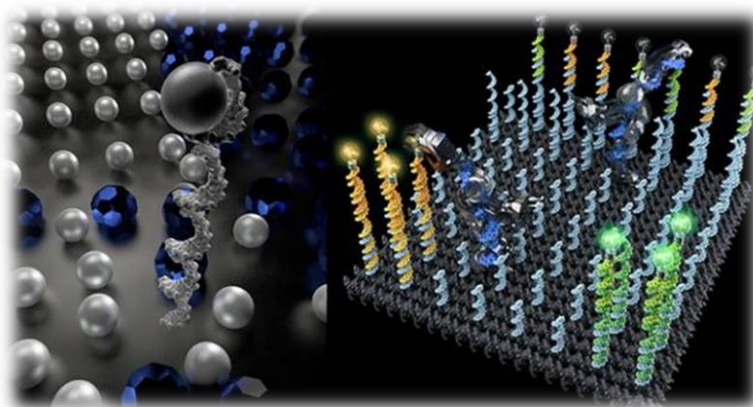
#### 6.4. NANOROBOTS

En el camp de material mèdic també s'estan fent avanços. El químic orgànic holandès Ben Feringan va rebre un Premi Nobel de Química en 2016 per crear les, actualment, màquines més petites del món. S'estan intentant crear músculs artificials i interruptors en els medicaments per a encendre'ls i apagar-los quan interessi mitjançant llum, entre altres. Convençut de la possible aplicació de nanomètodes, Feringan va dir: *“La meva predicció és que en 30 o 40 anys un metge podrà injectar-te un diminut nanosubmarí en la sang que podrà anar a buscar una cèl·lula tumoral, o reparar alguna cosa, o transportar un medicament. Jo he fet la boja afirmació que potser en 50 anys podrem injectar un cirurgià en el cos, perquè aquest cirurgià serà un nanorobot”*.



#### 6.4.1. NANOROBOTS D'ADN PER COMBATRE EL CÀNCER

Potser no són els robots que ens vénen a la ment en pensar en les lleis de la robòtica d'Isaac Asimov. Però estan dissenyats per a complir ordres: impedir l'aportació de sang als tumors per a frenar el seu creixement. Parlem dels nanorobots d'ADN desenvolupats contra el càncer per investigadors de l'Acadèmia Xinesa de Ciències i la Universitat de l'Estat d'Arizona.



IMATGE 18. NANOROBOT D'ADN

##### 6.4.1.1. PER QUÈ UTILITZAR NANOROBOTS CONTRA EL CÀNCER?

En els últims anys la nanomedicina o aplicació de la nanotecnologia a les ciències de la salut, s'ha convertit en una de les àrees més emergents de la medicina. La nanomedicina té com a objectius prevenir, diagnosticar i tractar malalties, a través de, per exemple el desenvolupament de nanopartícules programades per a detectar la presència d'una patologia o dissenyades per a transportar fàrmacs al teixit afectat.

Dins del camp de l'oncologia, des de fa un temps els investigadors s'han plantejat com desenvolupar nanopartícules que permetessin rastrejar i destruir les cèl·lules tumorals sense atacar les cèl·lules normals de l'organisme. Com en qualsevol guerra, els conceptes de “rastrejar i destruir a l'enemic” o “combatre a l'enemic” són molt amplis i per a dur a terme accions efectives pot ser més útil definir una estratègia d'acció concreta.

Els investigadors van plantejar un objectiu simple i concret per a atacar al càncer: bloquejar l'aportació de nutrients i “matar de fam” al tumor. Com? Induint la coagulació de la sang en els vasos sanguinis del tumor mitjançant nanopartícules basades en ADN que portessin agents coagulants a aquesta zona. Si la sang, encarregada entre altres funcions de transportar nutrients i oxigen a les cèl·lules, no pot accedir al tumor, aquest no rep reforços per a dur a terme el seu metabolisme. En termes militars, seria alguna cosa així com iniciar un setge a la ciutat a conquerir i evitar qualsevol arribada de reforços des de l'exterior.

#### **6.4.1.2. ÚS DE LA NANOTECNOLOGIA PER ATACAR EL TUMOR**

Per a dur a terme un “atac” a escala microscòpica els investigadors necessitaven dissenyar nanopartícules que complissin dues característiques principals. En primer lloc, havien de reconèixer els vasos sanguinis que nodreixen al tumor i diferenciar les seves cèl·lules de les cèl·lules normals. En segon lloc, les nanopartícules havien de ser capaces d'alliberar un agent coagulant\* una vegada en la seva destinació. Els nanorobots basats en ADN que han desenvolupat els investigadors reuneixen totes dues condicions.

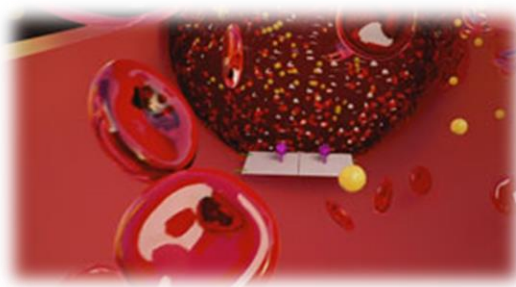
L'ADN està compost per unitats que permeten crear formes diverses amb capacitat per a plegar-se. La creació d'aquestes formes nanoscòpiques és denominada “origami d'ADN”. I les seves propietats poden ser aprofitades per a dissenyar estructures amb agents terapèutics en el seu interior que es despleguen i alliberen aquests agents quan arriben a la seva diana.

L'equip d'investigadors va desenvolupar un tipus de nanorobot constituït per una fulla rectangular d'ADN de 90 nanòmetres per 60 nanòmetres que en la seva superfície tenia unides quatre molècules de trombina\*, un enzim coagulant. Aquesta làmina d'ADN, a més, presentava la característica de poder plegar-se de forma autònoma en un tub, de manera que les molècules de trombina quedessin en el seu interior.



Per a assegurar que els nanorobots exercissin la seva funció únicament en els tumors, els investigadors van afegir a la làmina d'ADN unes molècules denominades aptàmers\* d'ADN. Aquestes molècules reconeixen a la proteïna nucleolina\* que és produïda en grans quantitats per les cèl·lules endotelials dels tumors. A més, el reconeixement entre els aptàmers d'ADN i la nucleolina serveix com a interruptor d'activació per als nanorobots.

Així, el mecanisme és el següent: en primer lloc s'injecten nanorobots d'ADN carregats amb trombina en el torrent sanguini d'animals model per al càncer; en arribar els vasos sanguinis que nodreixen al tumor, els nanorobots detecten la presència de la nucleolina gràcies als aptàmers d'ADN i s'activen, passant de la forma cilíndrica a la forma desplegada que deixa exposades les molècules de trombina; finalment, la trombina inicia un procés de coagulació que acaba bloquejant el flux de sang cap al tumor.



IMATGE 19. NANOROBOT D'ADN EN SANG

#### 6.4.1.3. RESULTATS PROMETEDORS EN MODELS ANIMALS

El tractament amb nanorobots no va mostrar signes de toxicitat en els animals model tractats. A més, l'equip va comprovar que 24 hores després de la injecció la concentració de nanorobots en l'organisme havia disminuït, la qual cosa significava que les nanopartícules podien ser degradades o eliminades per l'organisme de forma natural. Una altra dada a favor seu va ser que no es van detectar nanorobots en el cervell, la qual cosa podria ocasionar efectes inesperats. La seguretat dels nanorobots també va ser confirmada en porcs, que mostren major similitud als humans que els ratolins pel que fa a anatomia i fisiologia.

A més, per a avaluar la seva eficàcia enfront de tumors en situació *in vivo*, els investigadors van tractar diversos models animals de càncer amb els nanorobot d'ADN.

Passades 24 hores després del tractament, l'equip va observar la producció de trombosi en els vasos sanguinis tumorals i en tres dies, tots els vasos sanguinis dels tumors analitzats havien estat bloquejats.

La coagulació dels vasos sanguinis com a tractament antitumoral va mostrar major efectivitat en els tumors amb elevat grau de vascularització, com és el cas del melanoma\*. Tres dels vuit ratolins model per a aquest tipus de càncer van mostrar una regressió completa dels tumors. En aquests animals el tractament amb nanorobots també va frenar la metàstasi. També van frenar el creixement tumoral en altres tipus de càncer, com el càncer de pulmó.

#### 6.4.2. EL FUTUR DELS NANOROBOTS A LA BRANCA DE L'ONCOLOGIA

El rendiment dels nanorobots basats en ADN com a eina per a combatre el càncer mostra l'avanç del camp de la nanomedicina. A la llum dels resultats obtinguts, publicats en l'últim número de *Nature Biotechnology*, els investigadors responsables busquen en l'actualitat col·laboradors clínics amb els quals poder fer avançar la tecnologia.

*“Hem desenvolupat el primer sistema robòtic d'ADN completament autònom per a dissenyar un fàrmac molt precís i una teràpia contra el càncer dirigida”, indica Hao Yan, investigador de la Universitat de l'Estat d'Arizona i un dels directors del treball. “A més, aquesta tecnologia és una estratègia que pot ser utilitzada en molts tipus de càncer, ja que tots els vasos sanguinis que alimenten als tumors sòlids són pràcticament els mateixos.”*

Els prometedors resultats dels nanorobots d'ADN podrien inspirar el disseny de nous tractaments contra el càncer utilitzant diferents molècules modificades per a intervenir l'administració dels agents terapèutics.

La combinació de diferents nanorobots de disseny que transportin agents variats podria ajudar a eliminar els tumors sòlids i les metàstasis derivades. I fins i tot, assenyalen els investigadors, l'estratègia podria ser modificada com una plataforma d'administració de tractaments per a altres malalties.

## 7. NANOTOXICITAT EN ELS TEMPS DE LA NANOTECNOLOGIA

El començament del segle XXI va obrir les portes als productes basats en nanomaterials. Indiscutibles avantatges com la possibilitat de dissenyar eines de treball per a l'escala nanomètrica, poder modificar la superfície d'una nanopartícula amb una determinada molècula, explotar les noves propietats òptiques i magnètiques que apareixen en un material nanoestructurat o el benefici de l'elevada relació àrea superficial/volum van constituir el motor impulsor d'un mercat creixent per als productes i eines nanotecnològiques. S'espera un continu creixement global en el mercat dels nanomaterials on es veuran xifres de valor bilionari. No obstant això, l'explotació comercial de la nanotecnologia porta amb ella importants interrogants relacionats amb la seguretat en l'ús i maneig d'aquests. Els seus efectes recaurien sobre la salut tant del treballador exposat durant el procés productiu, com del consumidor amb accés a aquest producte, juntament amb les possibles conseqüències mediambientals.

Aleshores la pregunta inicial per als treballadors, consumidors o agents reguladors seria si aquests materials nanoparticulats són segurs o no, i quines serien les propietats i els mecanismes a través dels quals produeixen toxicitat. La pregunta constitueix en si un gran repte: l'estudi de la toxicitat dels nanomaterials no és possible afrontar-lo utilitzant únicament els mètodes de la toxicologia clàssica.

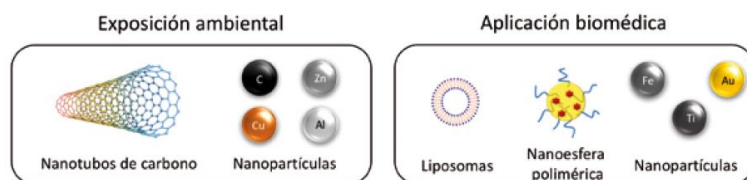
Encara queda molta recerca per realitzar, com posen de manifest les previsions del Nanosafety Cluster de la Unió Europea, que no situa fins a 2025 la consecució d'alguns objectius imprescindibles, com són la disponibilitat de mètodes per a la caracterització fisicoquímica de nanomaterials complexos, la validació i estandardització de nous models biològics per a la caracterització toxicològica i ecotoxicològica, i la disseminació del coneixement més enllà de la comunitat científica, la indústria, agents reguladors, etcètera.

La recerca en nanotoxicologia requereix un enfocament multidisciplinari (toxicologia, ciència dels materials, medicina, biologia molecular, bioinformàtica, entre altres) per a establir correlacions entre captació, transformació i impacte dels nanomaterials una vegada que entren en contacte amb cèl·lules o organismes, que permeti arribar a proposar un model genèric de nanotoxicitat.

Avui dia, l'evidència científica disponible sobre la interacció de les nanopartícules i els nanomaterials en els sistemes vius i en particular sobre la salut humana, és suficient per a adoptar el principi de precaució i considerar-los com potencialment perillosos (Savolainen 2013).

Els diferents materials nanoestructurats poden ser incorporats a l'organisme mitjançant diferents formes d'exposició:

- Nanomaterials basats en carboni en forma de nanopartícules o nanotubs així com partícules d'òxids metàl·lics com el zinc, alumini o coure poden incorporar-se per exposició ambiental.
- Nanopartícules dissenyades per a determinats tipus d'aplicacions en productes alimentaris, cosmètics o farmacèutics.



IMATGE 20. IL·LUSTRACIÓ ESQUEMÀTICA DELS DIFERENTS MATERIALS NANOESTRUCTURATS QUE PODEN SER INCORPORATS A L'ORGANISME

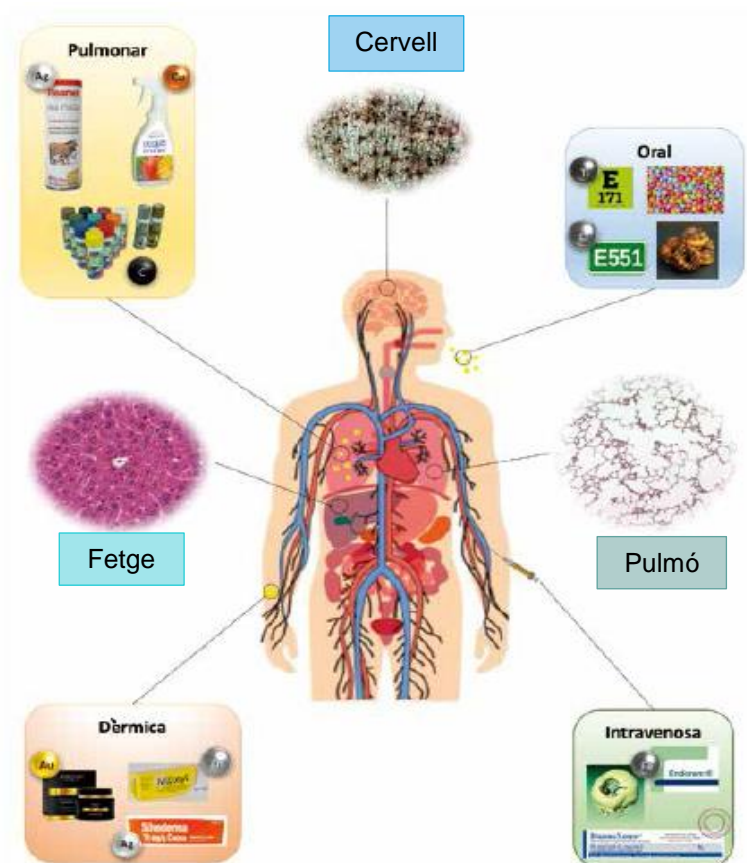
## 7.1. COM ENTREM EN CONTACTE AMB LES NANOPARTÍCULES?

Importants estudis sobre la caracterització toxicològica de diferents nanopartícules s'han dut a terme en l'última dècada, prestant especial atenció als efectes en el tracte respiratori a causa de l'historial de malalties respiratòries associades a l'exposició d'aerosols\*. nanopartícules dispersades en forma d'aerosol poden arribar fins als alvèols pulmonars i diferents publicacions han descrit com poden passar a la zona intersticial\* i, a través de la sang, aconseguir òrgans secundaris.

Exemple d'això són els nanotubs de carboni dels quals s'ha descrit que indueixen fibrosi intersticial\*, i específicament estudis amb nanotubs multilaminars han mostrat com aquests poden induir el desenvolupament del càncer. A través d'aquesta via també s'ha descrit l'acumulació de nanopartícules en el sistema nerviós central després del seu pas pel bulb olfactori\*. La inhalació es considera la principal via de penetració, ja que partícules insolubles no solen travessar la pell tret que existeixi un mal en aquesta.

No obstant això, nanopartícules liposolubles\* presents en cremes o altres productes tòpics poden transitar per l'espai intercel·lular de la capa còrnia de la pell, passar a través dels fol·licles capil·lars\* o de les glàndules sudorípares, i una vegada absorbides poden aconseguir el torrent sanguini. Una vegada en el sistema circulatori les nanopartícules es poden acumular en diferents òrgans com el fetge, melsa\*, ronyó, cor i cervell o en ganglis limfàtics. Els estudis de toxicitat també s'han centrat a avaluar possibles danys o alteracions provocats per nanopartícules administrades per via intravenosa.

Aquesta forma d'exposició és fonamental per a nanomaterials dissenyats per a aplicacions biomèdiques, com és el cas de les nanopartícules d'òxid de ferro. Aquestes nanopartícules han estat aprovades per les agències reguladores de medicaments per al seu ús en humans com a agents de contrast per a ressonància magnètica nuclear o per al tractament de determinats tipus de càncer mitjançant hipertèrmia\*. També existeixen nombroses formulacions farmacèutiques basades en nanopartícules lipídiques (ex. Liposomes) o polimèriques l'objectiu de les quals és l'alliberament controlat de fàrmacs en determinats òrgans o teixits.



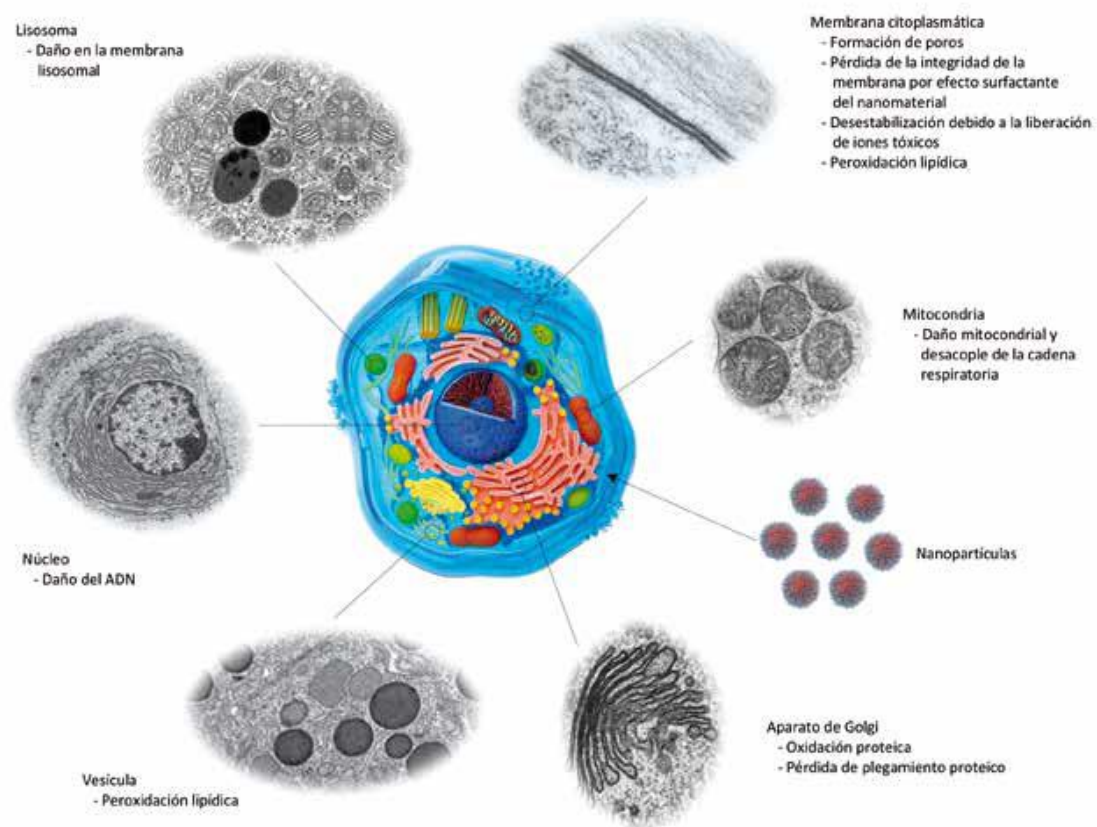
IMATGE 21. IL·LUSTRACIÓ ESQUEMÀTICA DE DIFERENTS MATERIALS NANOESTRUCTURATS QUE PODEN SER INCORPORATS A L'ORGANISME AMB DIFERENTS FORMES D'EXPOSICIÓ

## 7.2. COM AVALUEM LA NANOTOXICITAT?

Amb l'impacte de la nanotecnologia en la biomedicina, es fa cada vegada més necessària l'aprofundiment en estudis associats a la toxicitat d'aquests materials, així com l'estandardització d'aquests assajos. Una de les eines més utilitzades per a l'estudi de la toxicitat de nanopartícules, abans de la seva aplicació *in vivo*, són els cultius cel·lulars (*in vitro*). Aquests posseeixen una sèrie d'avantatges respecte als estudis *in vivo*: menor complexitat, costos i qüestions ètiques. D'altra banda presenten un major control sobre l'ambient que envolta a les cèl·lules i homogeneïtat tant a escala morfològica com de composició, permetent aprofundir més fàcilment en la comprensió dels processos biològics i bioquímics que tenen lloc durant els tractaments.

El desavantatge fonamental dels assajos *in vitro* radica que les dosis d'estudi són puntuals i elevades en comparació a una dosi crònica a baixes concentracions, més similar a la que podríem estar sotmesos de forma natural.

Les nanopartícules poden interactuar de diferents formes amb les cèl·lules depenent de les seves propietats fisicoquímiques, de manera que les tècniques que s'utilitzen per a avaluar la toxicitat estudien des de la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS, de les seves sigles en anglès), la integritat de l'estructura cel·lular tant de membranes com orgànuls, els possibles danys en el material genètic o el desencadenament de senyals bioquímics com és l'estimulació de la resposta inflamatòria.



IMATGE 22. POSSIBLES EFECTES CITOTÒXICS DERIVATS DE LA INTERACCIÓ ENTRE CÈL·LULES I NANOPARTÍCULES



An abstract graphic consisting of two flowing, wavy teal ribbons that intersect and loop around the central text. The ribbons have a subtle gradient and a fine, concentric-line texture, giving them a three-dimensional, liquid appearance.

# MARC PRÀCTIC



## 8. SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES, CARACTERITZACIÓ I TEST EN MODELS DE CULTIUS CEL·LULARS TUMORALS

### 8.1. INTRODUCCIÓ

La meva part pràctica forma part d'una de les estades a la Universitat Autònoma de Barcelona dins de la branca de l'àmbit de biociències que ofereix el Programa Argó. Es tracta d'una part experimental realitzada als laboratoris de l'IBB (Institut de Biotecnologia i de Biomedicina) al llarg de 50 hores globals distribuïdes des del 25 de juny fins al 12 de juliol.



IMATGE 23. ELABORACIÓ DE LA PART EXPERIMENTAL A L'IBB-UAB AMB EL MICROSCOPI DE FLUORESÈNCIA

Ha estat una gran experiència que m'ha permès entrar en contacte amb l'entorn universitari, treballar amb professionals del tema i sobretot conèixer més a fons el funcionament i tot el que hi ha darrere d'una elaboració de nanofàrmacs.

Per comprendre el motiu de la utilització d'aquests hem de centrar-nos en les limitacions de la medicina: biodistribució inespecífica, pics de dosi als quals es pot arribar i l'eliminació no desitjada de fàrmac. Tot aquest conjunt causa activitat terapèutica reduïda i efectes secundaris indesitjats; que, per altra banda, reben les solucions a aquestes limitacions de la nanotecnologia a la nanomedicina com podria ser l'ús de nanofàrmacs:

- L'encapsulació protegeix de l'eliminació del fetge i dels ronyons.
- L'alliberació controlada des de les càpsules estabilitza els pics de dosi.
- Les nanopartícules es poden vectorialitzar per tal que vagin a un objectiu específic.

Però, el que s'ha d'entendre bàsicament és el fet de com aquestes solucions ajuden a la cura de malalties. Una d'elles, del càncer.

Pel que fa a la metodologia, consta del procés d'elaboració de dues nanopartícules carregades de rodamina isotocianat, un anàleg de la doxorubicina (quimioteràpic), la caracterització i test d'aquestes en un cultiu de cèl·lules canceroses de neuroblastoma, per a després observar els resultats a través d'un microscopi de fluorescència i un microscopi electrònic de rastreig.

Aquestes dues nanopartícules són: PLGA i EUDRAGIT L 100-55.

El PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)) és un polímer 50% àcid làctic i 50% àcid glicòlic que destaca per la seva alta biodegradabilitat i biocompatibilitat amb qualsevol mena de càncer pràcticament tractat per via venosa.

L'Eudragit L 100-55 és un altre tipus de polímer, aquest més nou i innovador, que basant-se en els canvis de pH del medi que l'envolta i de la biodegradabilitat de la seva partícula, és capaç de millorar els resultats amb càncer de còlon i d'intestí i que per tant, no són tractats per via venosa sinó via oral.

Però aquest procés va acompanyat, a més a més, de diferents mostres control per comprovar que la presència de fluorescència a les cèl·lules en el resultat final realment era deguda a la presència de les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat.

- ▣ Nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat sinó amb aigua a la part interna (per demostrar que la presència de fluorescència no era provocada per les nanopartícules de PLGA en si).
- ▣ Cèl·lules a les quals no vam introduir nanopartícules (per demostrar que la presència de fluorescència no era provocada per les cèl·lules).

## 8.2. OBJECTIUS

Abans de començar l'Estada als laboratoris, com a tot treball d'investigació, s'han de plantejar un seguit d'objectius que, un cop amb els resultats obtinguts a partir de l'elaboració de les nanopartícules, l'encapsulació i eficàcia d'aquestes, podrem concloure si s'han complert satisfactòriament o per altra banda, no tots ells s'han assolit. Aquests objectius són els següents:

- Aprendre a treballar en un laboratori de recerca.
- Aprendre com es dissenya, fabrica i funciona un nanofàrmac.
- Comprovar si s'encapsula correctament el fàrmac.
- Observar la internalització de les nanopartícules en cèl·lules tumorals.

*Totes les imatges que apareixen a continuació són pròpies i van ser realitzades al llarg de les Estades Argó 2019: “Què és i com funciona un nanofàrmac?”*

### 8.3. PROCEDIMENT DE SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES: PLGA

#### PREPARACIÓ MATERIAL

- Vials de vidre.
- Vasos de precipitació de 100 mL.
- Gel.
- Tubs de centrífuga.
- Tub eppendorf.
- Aigua mil·li-Q.
- NaCl 2M.
- PVA 4% massa volum.
- SPAN-80 i diclorometà.
- Pipeta de desplaçament positiu.



IMATGE 24. MATERIAL SÍNTESI PLGA

#### PREPARACIÓ FASES

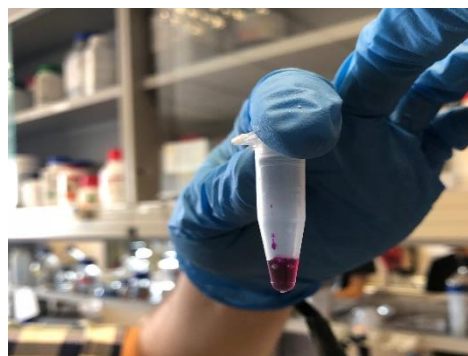
##### FASE W1

1. Afegim 75  $\mu$ L d'aigua mil·li-Q a un tub eppendorf.



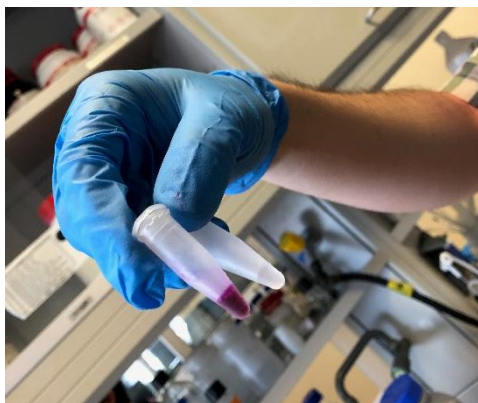
IMATGE 25. PAS 1 FASE W1 PLGA

2. Diluïm la rodamina a 100  $\mu$ L a 1mg/mL a una proporció 1:10. Guardem els 25  $\mu$ L de rodamina que no hem utilitzat per després poder efectuar el control de fluorescència.

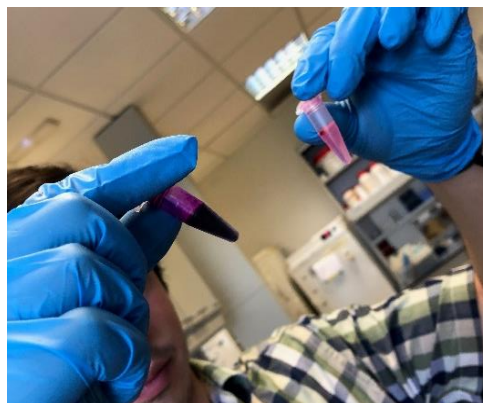


IMATGE 26. PAS 2 FASE W1 PLGA

## RESULTAT:



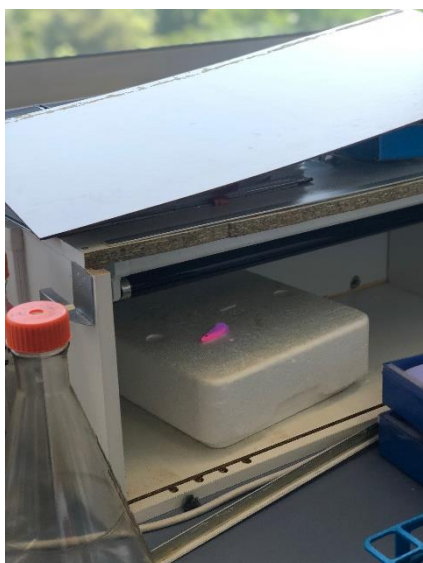
IMATGE 27. RESULTAT FASE W1 PLGA



IMATGE 28. RESULTAT FASE W1 PLGA

3. Comprovem amb un fluorescent ultraviolat la capacitat colorant de la rodamina.

4. Ho deixem en gel.



IMATGE 29. PAS 3 FASE W1 PLGA

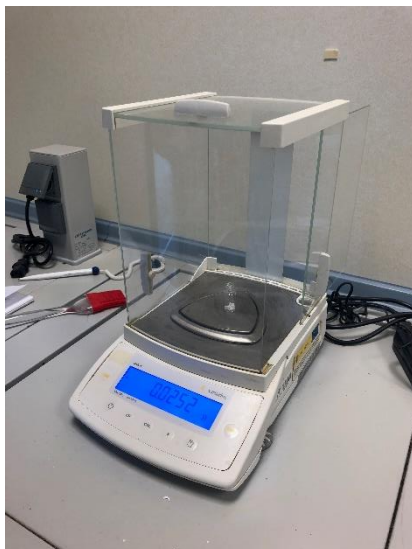


IMATGE 30. PAS 4 FASE W1 PLGA



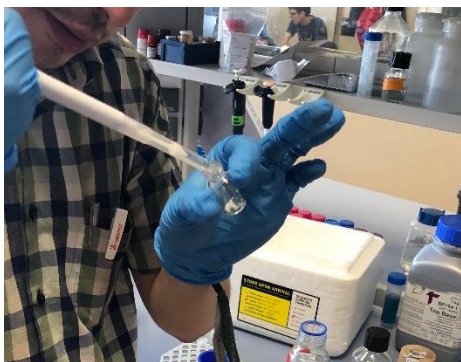
## FASE 0

1. Netejar vials de vidre amb etanol 70%.
2. Pesar 25 µg de PLGA. Hem de tenir en compte que necessitarem dues mostres per poder fer el control, amb l'objectiu de mesurar la fluorescència del compost i saber si té fluorescència pròpia i si per tant, interferirà en la imatge de la rodamina.



IMATGE 31. PAS 2 FASE 0 PLGA

3. Dissoldre el PLGA en diclorometà utilitzant una pipeta de desplaçament positiu amb una quantitat de 750 µL.
4. Afegim una mosca magnètica als vials per remenar mitjançant magnetisme a un agitador magnètic.



IMATGE 32. PAS 3 FASE 0 PLGA



IMATGE 33. PAS 4 FASE 0 PLGA

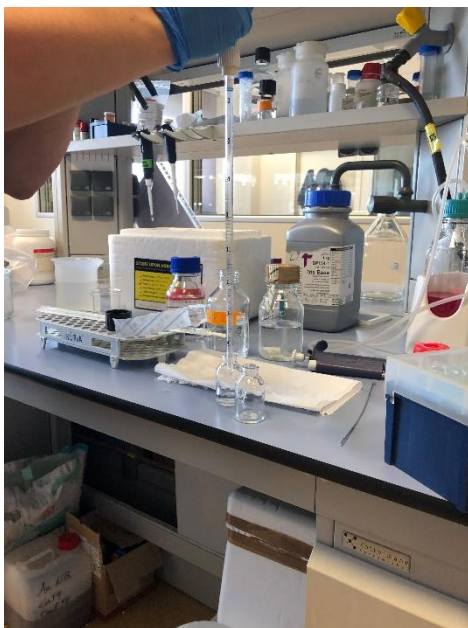
5. Finalment per acabar aquesta fase, afegim 30  $\mu$ L del surfactant SPAN-80 mentre aquests s'agiten.



IMATGE 34. PAS 5 FASE O PLGA

### FASE W2

1. Barregem dues vegades 4,7 mL de PVA 4% amb 4,7 mL de NaCl 2M per obtenir 9,4 mL finals de polivinilalcohol 1M 2%.
2. Distingir els 2 pots:
  - Rodamina.
  - Aigua mil-li-Q.



IMATGE 35. PAS 1 FASE W2 PLGA



IMATGE 36. PAS 2 FASE W2 PLGA

## EMULSIONS: SONICADOR

1. Tenim la Fase O en gel i afegim els 75  $\mu$ L d'aigua de la W1. Els deixem dins del sonicador a un 25% d'amplitud d'ona durant 90 segons.
2. Un cop passats els 90 segons, afegim l'emulsió obtinguda a la W2. Deixem el vial en gel i tornem a sonicar durant 90 segons a 25% d'amplitud d'ona.



IMATGE 37. PAS 1 EMULSIONS PLGA



IMATGE 38. PAS 2 EMULSIONS PLGA

3. Fem el mateix procés que amb l'aigua de la W1, però en aquest cas amb els 75  $\mu$ g de rodamina. Afegim aquesta a l'altre vial de la Fase O, ho deixem en gel, i ho deixem sonicant durant 90 segons a un 25% d'amplitud d'ona.
4. Per últim, afegim aquesta emulsió amb rodamina al vial restant de W2 i tornem a repetir el procés del sonicador durant 90 segons a 25% d'amplitud d'ona.



IMATGE 39. PAS 3 EMULSIONS PLGA

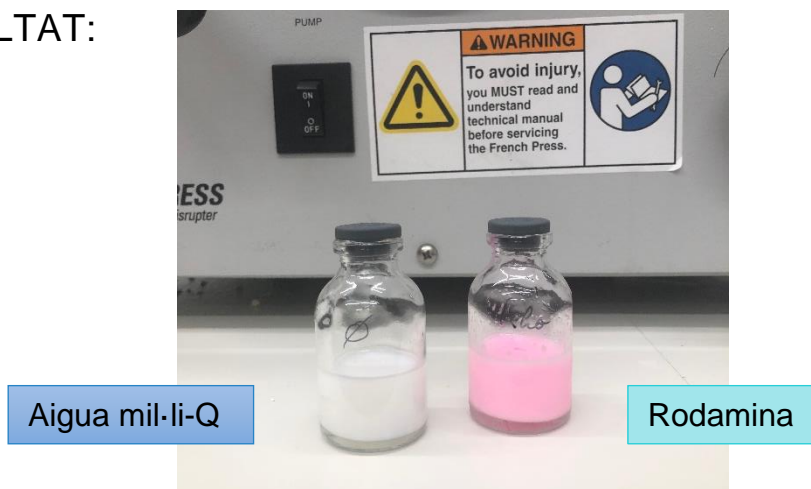


IMATGE 40. PAS 4 EMULSIONS PLGA



## 5. Nanopartícules formades.

### RESULTAT:



IMATGE 41. RESULTAT EMULSIONS

Per acabar la síntesi, cal evaporar el diclorometà.

### EVAPORACIÓ

La rodamina és fotosensible, és a dir, en contacte amb la llum perd intensitat. Per aquest fet, l'emboliquem amb paper de plata durant l'evaporació per tal que la llum no l'afecti.

Per tant, deixem les dues emulsions agitant durant 3:30h-4:00h a l'agitador magnètic fins que s'hagi evaporat tot el diclorometà de manera homogènia.



IMATGE 42. EVAPORACIÓ DEL DICLOROMETÀ



IMATGE 43. EMBOLCALL

## 8.4. PROCEDIMENT DE SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES: EUDRAGIT L 100-55

### PREPARACIÓ MATERIAL

- Bomba d'injecció.
- Agitador multiplaca o magnètic.
- Xeringues de 10 mL.
- Agulles llargues.
- Tubs de 20 mL.
- Tires de pH.
- Mosques magnètiques.
- Pipetes.
- Sonicador amb bany d'ultrasons.



IMATGE 44. MATERIAL SÍNTESI EUDRAGIT L-100-55

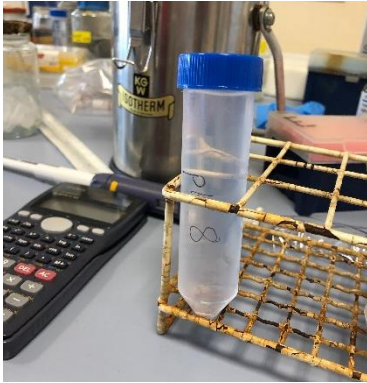
### PREPARACIÓ REACTIUS

- Eudragit L 100-55.
- PVA.
- Rodamina.
- Aigua mil-li-Q.
- McIlvaine buffer: Format per àcid cítric i hidrogen fosfat disòdic.

## 1. Preparació buffers.

Primera solució a pH 8:

- 48'62 mL de fosfat.
- 1'38 mL d'àcid cítric.



IMATGE 45. PRIMERA SOLUCIÓ PAS 1 EUDRAGIT L 100-55

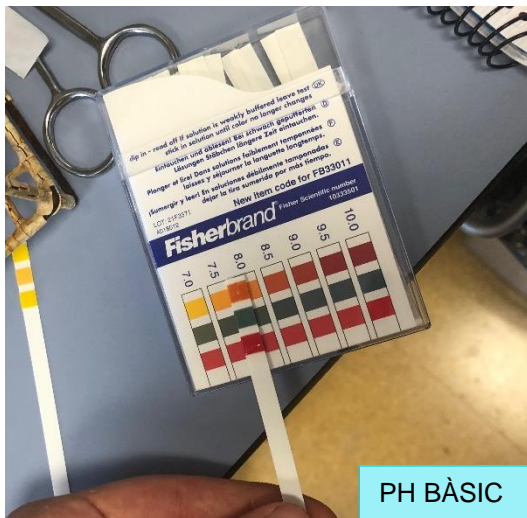
Segona solució a pH 2:

- 1 mL de fosfat.
- 49 mL d'àcid cítric.



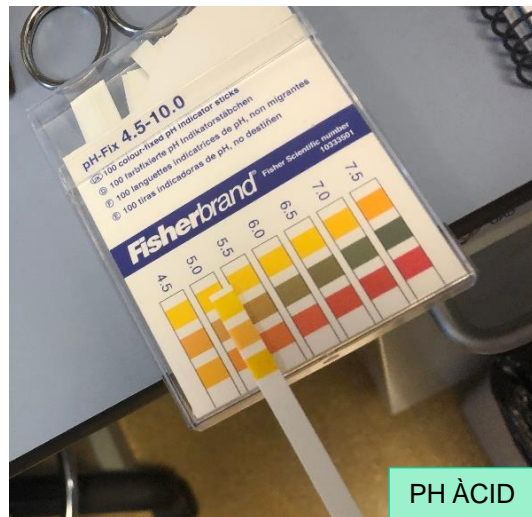
IMATGE 46. SEGONA SOLUCIÓ PAS 1 EUDRAGIT L 100-55

## 2. Comprovació pH.



PH BÀSIC

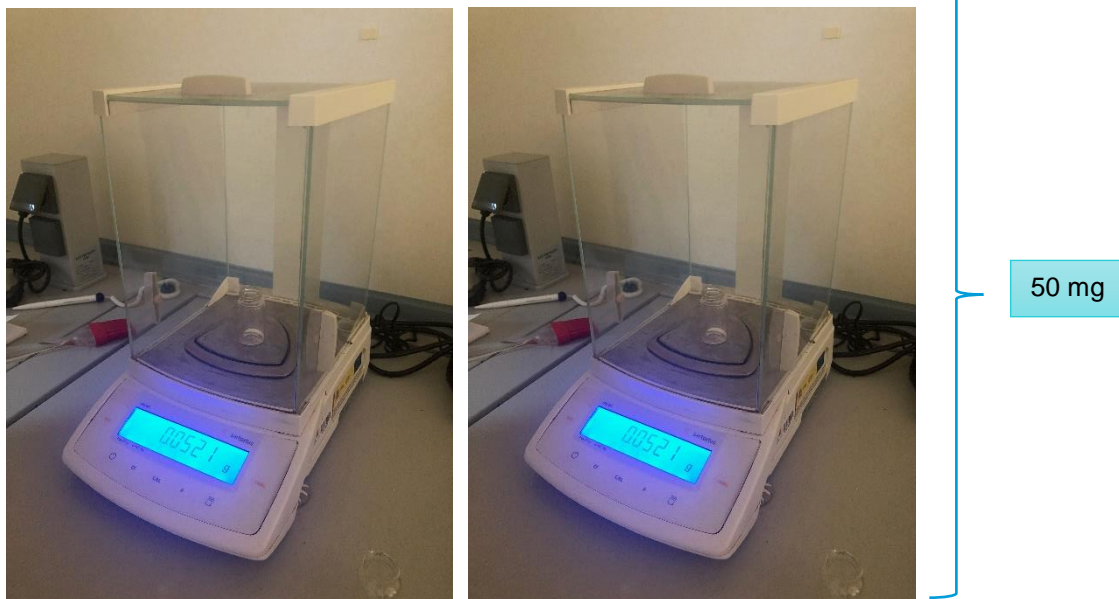
IMATGE 47. PH BÀSIC PAS 2 EUDRAGIT L 100-55



PH ÀCID

IMATGE 48. PH ÀCID PAS 2 EUDRAGIT L 100-55

### 3. Pesar l'Eudragit.



IMATGE 49. PAS 3 EUDRAGIT L 100-55

Necessitarem dues, cadascuna per treballar amb diferent pH.

### 4. Dissolem 50 mg d'Eudragit en 5 mL de buffer pH 8 i de buffer pH 2.



IMATGE 50. PAS 4 EUDRAGIT L 100-55

### 5. Sonicador amb bany d'ultrasons.

Utilitzat per tal que l'Eudragit es dissolgui i trenqui les bombolles formades a causa de l'agitació, ja que dintre d'aquestes bombolles podria quedar el polímer i causar polidispersió i agregats macroscòpics.



IMATGE 51. PAS 5 EUDRAGIT L 100-55



## RESULTAT:



IMATGE 52. EUDRAGIT TOTALMENT DISSOLT

### 6. Preparació tercera solució.

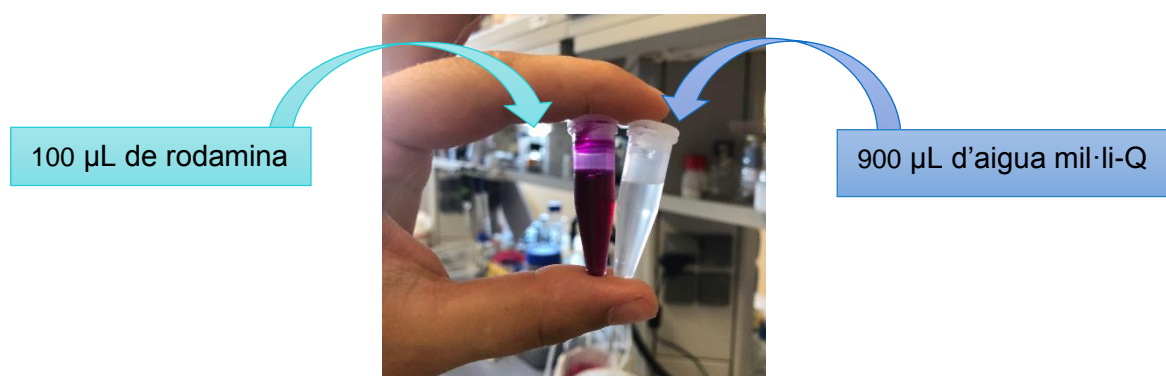
Agafem 20 mL de PVA al 0'5% i diluïm 8 vegades en el pH 2.

Acabem obtenint 17'5 mL de buffer pH 2 + 2'5 mL de PVA.



IMATGE 53. TERCERA SOLUCIÓ PAS 6  
EUDRAGIT L 100-55

### 7. Distingim l'aigua i la rodamina que afegir a l'Eudragit.



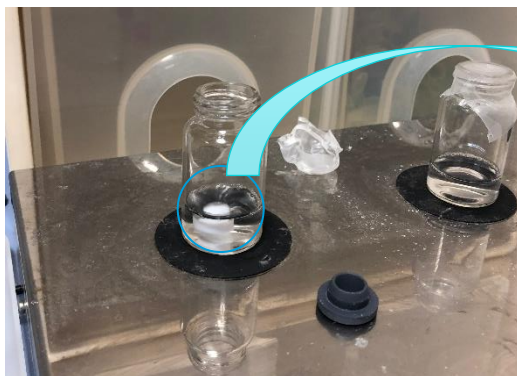
IMATGE 54. PAS 7 EUDRAGIT L 100-55

Aquests els injectarem més tard amb la pipeta a la solució d'Eudragit.

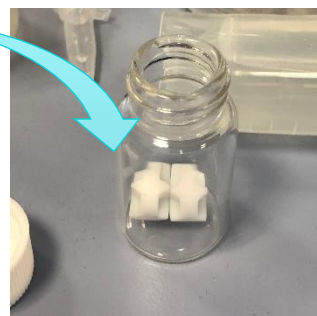
## 8. Deixem solucions amb Eudragit a l'agitador magnètic.

Per fer-ho, utilitzarem les mosques magnètiques.

S'ha de mantenir sempre en màxima agitació per tenir a l'Eudragit sempre homogeni i tenir les nanopartícules del mateix tamany.



IMATGE 55. PAS 8 EUDRAGIT L 100-55



IMATGE 56. MOSQUES MAGNÈTIQUES

## 9. Bomba d'injecció.

- **VOLUM:** 8 mL de solució 3.
- **CAUDAL:** 1 mL per minut.
- **DIÀMETRE:** 13'75 mm.

### 1. Aigua mil·li-Q

Aquesta mostra serà la control

- Agafem 8 mL de la solució 3 amb la xeringa.
- Afegim 1 mL d'aigua mil·li-Q a la solució d'Eudragit.



IMATGE 57. PAS 9: AIGUA MIL-LI-Q EUDRAGIT L 100-55

### 2. Rodamina

La rodamina actuarà com a colorant fluorescent.

- Agafem 8 mL de la solució 3 amb la xeringa.
- Afegim 1 mL de rodamina a la solució d'Eudragit.



IMATGE 58. PAS 9: RODAMINA EUDRAGIT L 100-55

## COMPARACIÓ DESPRÉS DE LA PRIMERA INJECCIÓ:



IMATGE 59. DIFERÈNCIA DE COLOR DESPRÉS DE PASSAR PER LA BOMBA D'INJECCIÓ

## RESULTAT:



IMATGE 60. NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 CREADES

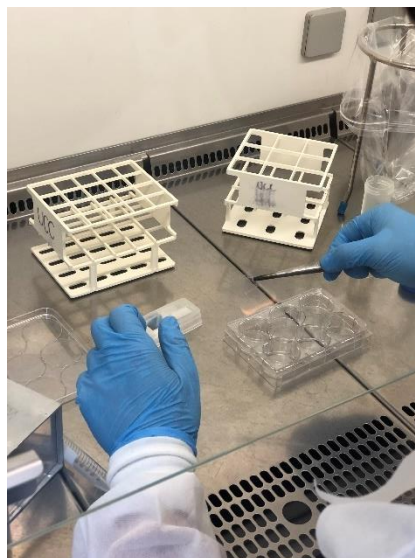
## 8.5. CARACTERITZACIÓ I TEST EN CÈL·LULES TUMORALS

Esterilització dels cobreobjectes a la flama:

1. Banyem el cobreobjectes amb alcohol.
2. Li calem foc.
3. Posem un cobreobjectes esterilitzat dins de cada pou a la placa multipou.

Després de l'esterilització:

4. Agafem les plaques de Petri que contenen les cèl·lules i eliminem/espirem el medi de cultiu amb una bomba de buit per tal que aquest no inhibeixi la tripsina.



IMATGE 61. PAS 2 CARACTERITZACIÓ DE NANOPARTÍCULES I TEST EN CÈL·LULES TUMORALS

5. Netegem les restes amb 4 mL de la solució tampó\* de PBS.

Com hem de treballar amb nanopartícules que no són estèrils, preparem un medi amb antibiòtic per tal que la mínima concentració de les nanopartícules no afecti.

6. Afegim a la placa de Petri 2 mL de tripsina, d'aquesta manera desenganxem les cèl·lules de la placa.
7. Barregem el medi habitual amb antibiòtic i antimitòtic\*. El medi conté nutrients (glucosa i piruvat), indicadors del pH (roig de fenol), sèrum fetal boví (conjugat de proteïnes i factors de creixement), antibiòtic i antimitòtic.
8. Retirem els 6 mL que hi ha a la placa de Petri (2 de tripsina i 4 de PBS) i que contenen cèl·lules. D'aquests 6 mL:
  - 1 mL el deixem a la placa per tal que les cèl·lules continuïn creixent.
  - 4,5 mL els guardem.
  - Als 0,5 mL restants, els hi afegim 9,5 mL de medi amb antibiòtic que hem preparat anteriorment. Fem una solució 1/20 en volum.

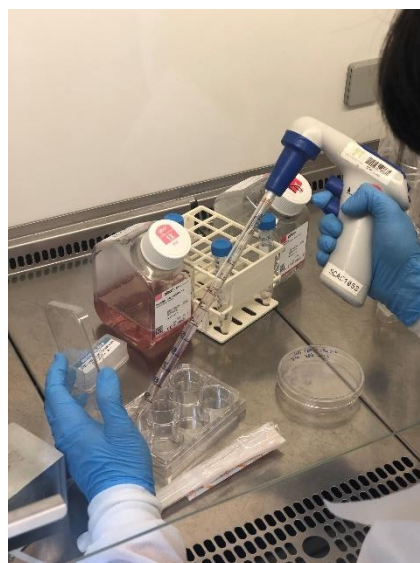


**9.** Agafem la dissolució i la posem a cada pou de la placa multipou assegurant-nos que tots els cobreobjectes queden ben coberts.

**10.** Afegim una mica més de medi.

**11.** Finalment, afegim les nanopartícules i les deixem reposant.

**12.** Traiem el medi amb una pipeta i amb el lleixiu matem les restes biològiques, és a dir, queden les cèl·lules enganxades al cobreobjectes.



IMATGE 62. PAS 9 CARACTERITZACIÓ DE NANOPARTÍCULES I TEST EN CÈL·LULES TUMORALS

**13.** Fixem les cèl·lules amb 1 mL de metanol congelat per cada pou.

**14.** Fiquem el DAPI\* al PBS i ho emboliquem per tal que no perdi fluorescència.

**15.** Agafem les cèl·lules de neuroblastoma amb metanol i les deixem al congelador durant 15 minuts amb l'objectiu de fixar les estructures.

**16.** Traiem el metanol.

**17.** Les tornem a sotmetre a un procés de 15 minuts però en aquest cas, a la campana de flux laminar, fent així que s'assequin. A més a més, les deixem amb la tapa oberta perquè s'acabi d'evaporar el metanol que hagi pogut quedar.

**18.** Afegim el DAPI+PBS (pas 14) als pous perquè vagin tenyint els nuclis.

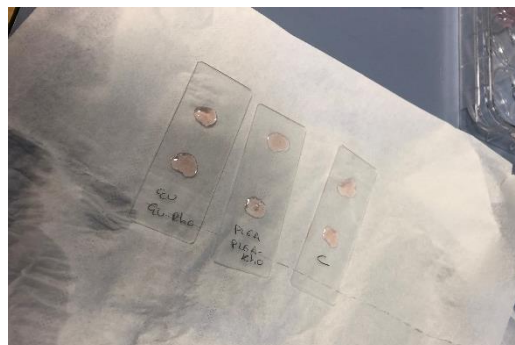
Un cop ja hem arribat a aquest punt, les cèl·lules ja estan preparades per a la següent fase: preparació per al microscopi de fluorescència.

**19.** Amb l'ajuda d'una agulla que actua com a palanca, traiem el cobreobjectes.

**20.** L'agafem amb unes petites pinces i assegurem que no hi ha excés d'humitat.

**21.** Preparem 5 portaobjectes:

- Control (C)
- PLGA
- PLGA amb rodamina (PLGA-Rho)
- Eudragit (EU)
- Eudragit amb rodamina (EU-Rho)

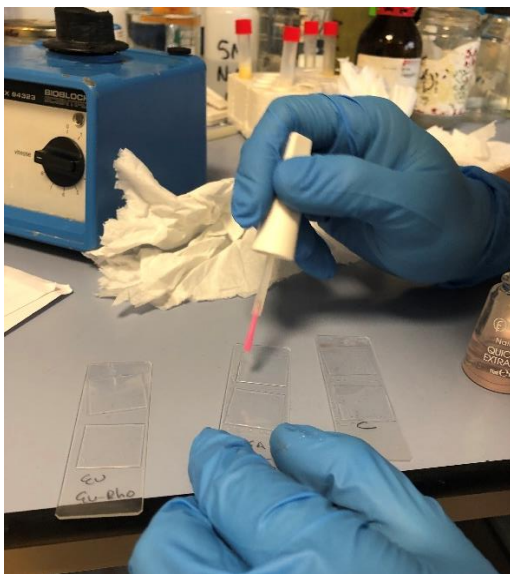


IMATGE 63. PAS 21 CARACTERITZACIÓ DE NANOPARTÍCULES I TEST EN CÈL·LULES TUMORALS

**22.** Tornem a agafar el cobreobjectes i el deixem caure de costat perquè no es facin bombolles i les cèl·lules quedin tocant el medi de muntatge, el qual farà d'espai entre el cobreobjectes i el portaobjectes.

**23.** Segellem amb laca d'ungles.

**24.** Deixem les preparacions 24 h aproximadament a les fosques perquè acabin d'assecar-se i no perdin fluorescència.



IMATGE 64. PAS 23 CARACTERITZACIÓ DE NANOPARTÍCULES I TEST EN CÈL·LULES TUMORALS



IMATGE 65. PAS 24 CARACTERITZACIÓ DE NANOPARTÍCULES I TEST EN CÈL·LULES TUMORALS

## 8.6. DISCUSSIÓ DE RESULTATS

Una vegada feta la síntesi i caracterització de nanopartícules, i un cop afegides a models de cèl·lules tumorals de neuroblastoma, hem d'interpretar tot aquest seguit de resultats obtinguts de l'experiment.

### EFICIÈNCIA D'ENCAPSULACIÓ

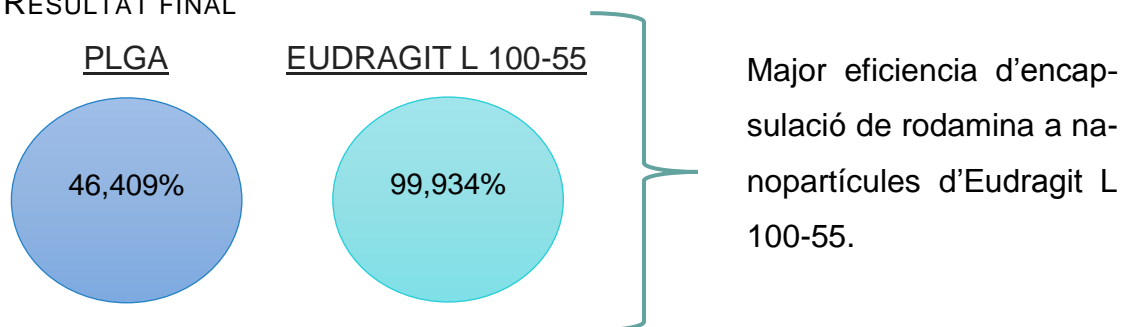
L'eficiència d'encapsulació es calcula en el cas particular de la rodamina, amb un fluorímetre, que ens permet mesurar la fluorescència d'aquesta, ja que la fluorescència és directament proporcional a la concentració del compost. Vam mesurar dues mostres:

- La rodamina abans d'encapsular, a la mateixa concentració que utilitzem en preparar les nanopartícules. Aquesta mesura ens marca el 100%.
- Un cop sintetitzades les nanopartícules, quan centrifuguem per fer el primer rentat, el líquid que ens queda (sobrenedant) conté tota la rodamina que no s'ha encapsulat. Si mesurem la fluorescència, tenim el valor de concentració del que no s'ha encapsulat; si restem del total (mesurat abans), tenim la que sí que s'ha encapsulat. La fórmula de l'eficiència d'encapsulació seria:

$$\frac{\text{Absorbància Rho total} - \text{Absorbància Rho no encapsulada}}{\text{Absorbància Rho total}} \times 100 = \% \text{ rodamina encapsulada}$$

*Rho: rodamina*

### RESULTAT FINAL



Pel que fa a les cèl·lules M17, és a dir, de neuroblastoma, el que fem és cultivar-les i exposar-les a les nanopartícules durant unes hores, amb l'objectiu de comprovar si les cèl·lules internalitzen les nanopartícules (és a dir, s'internalitzen).

Com que el compost és fluorescent, podem veure si les nanopartícules queden dins o fora de la cèl·lula segons si en mirar-ho al microscopi de fluorescència veiem pics de fluorescència vermella dins la cèl·lula. Amb el microscopi de fluorescència, per tant, mirem les nanopartícules que han entrat en contacte amb les cèl·lules i s'han internalitzat (o han quedat enganxades a la membrana depenent dels casos). Normalment, per mirar nanopartícules sense cèl·lules fem servir microscopi electrònic, DLS o microscopi de fluorescència.

### DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

El DLS és una tècnica que serveix per mesurar la mida del radi hidrodinàmic de les nanopartícules: tècnica fisicoquímica utilitzada per a la determinació de la distribució de grandàries de partícules en suspensió, o macromolècules en solució com proteïnes o polímers.

#### FUNCIONAMENT

- Un feix de llum impacta amb una mostra líquida on estan les partícules en suspensió.
- La llum rebota quan intercepta una partícula i va al detector.
- Es genera llavors, una llum que crea una imatge definida com al reflex de totes les partícules del camp.

El que fa per tant, és agafar el camp de nanopartícules i esperar que aquest canviï completament el camp de llum: quan es mouen i la imatge és totalment diferent, cap píxel es superposarà i es crearà la imatge.

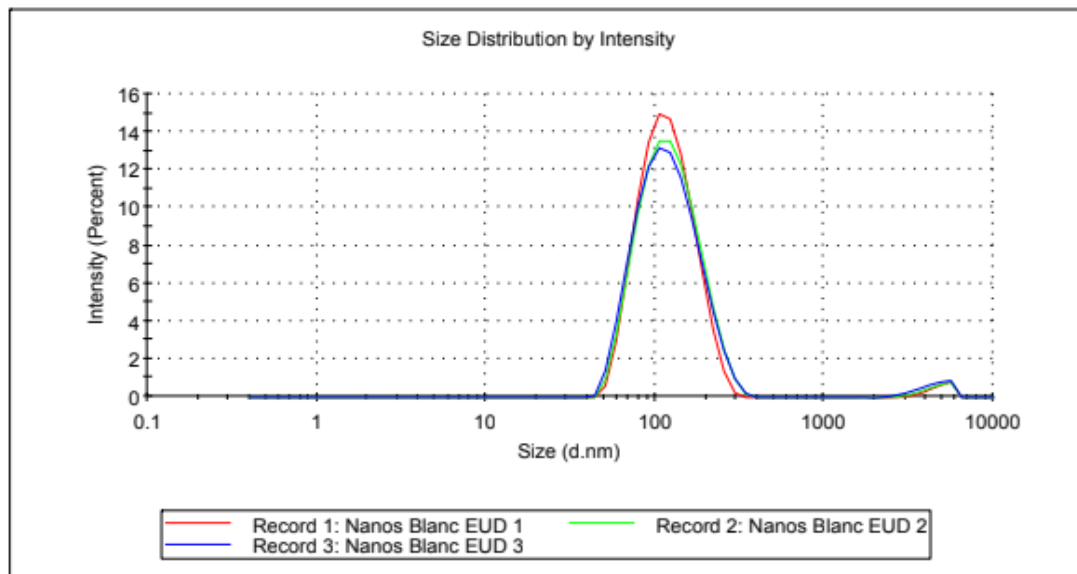
La mida dependrà de com de ràpid es moguin les partícules.

- A major mida, es redueix la velocitat i per tant, trigaran més a moure's.

#### SISTEMA

- Temperatura: 25 °C.
- Duració: 60 segons per a les d'Eudragit, 90 segons per a les de PLGA.
- Posició de mesura: 5,50 mm.
- Ritme de contada: 301,9 kcps (Eudragit) i 110,9 kcps (PLGA).

## NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES



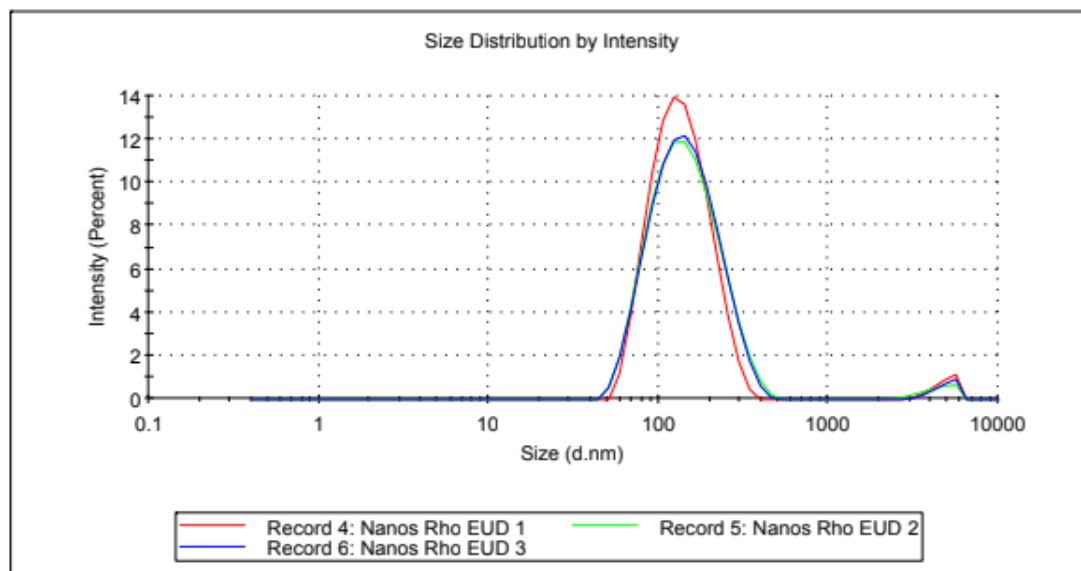
IMATGE 66. GRÀFICA DLS NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES

*Diàmetre:* 112,4 nm.

*Índex de polidispersió (Pdl):* 0,181.

*Interceptació:* 0, 945.

## NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA



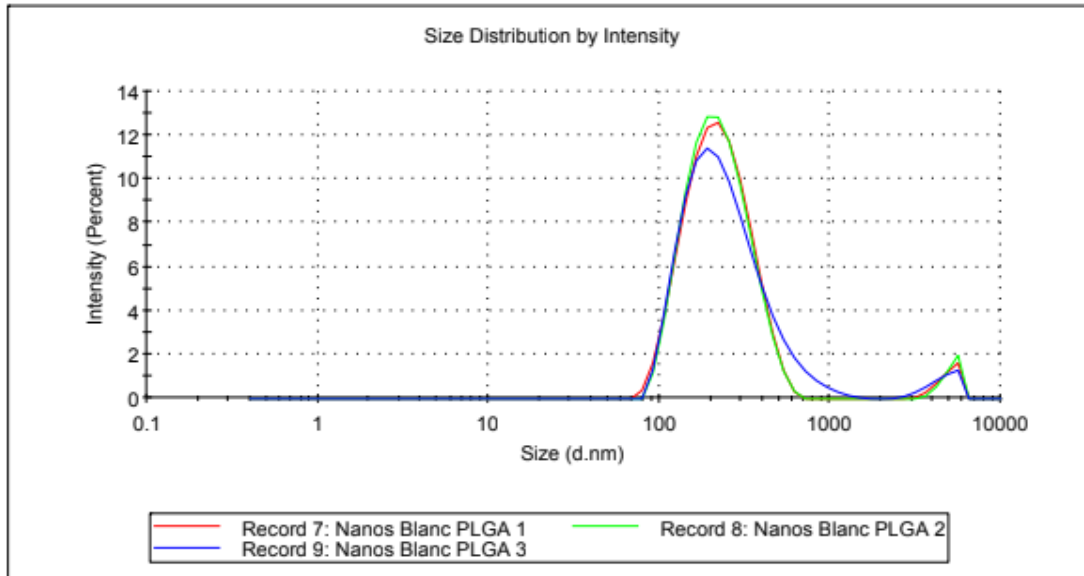
IMATGE 67. GRÀFICA DLS NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA

*Diàmetre:* 131,1 nm.

*Índex de polidispersió (Pdl):* 0,204.

*Interceptació:* 0,929.

## NANOPARTÍCULES DE PLGA BLANQUES



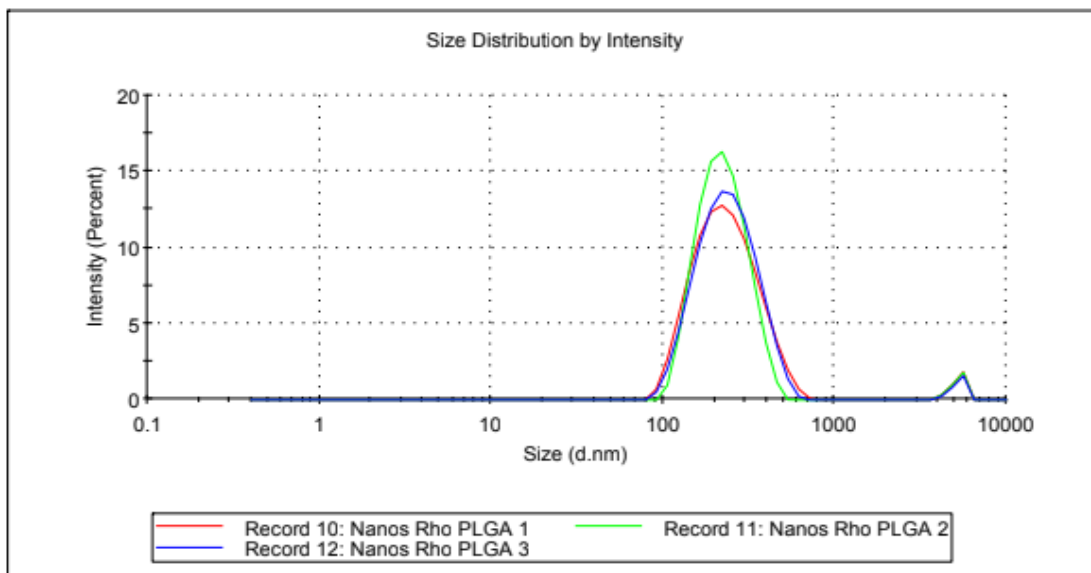
IMATGE 68. GRÀFICA DLS NANOPARTÍCULES DE PLGA BLANQUES

*Diàmetre:* 216,3 nm.

*Índex de polidispersió (Pdl):* 0,240.

*Interceptació:* 0'954.

## NANOPARTÍCULES DE PLGA AMB RODAMINA



IMATGE 69. GRÀFICA DLS NANOPARTÍCULES DE PLGA AMB RODAMINA

*Diàmetre:* 236,1 nm.

*Índex de polidispersió (Pdl):* 0,256.

*Interceptació:* 0,957.

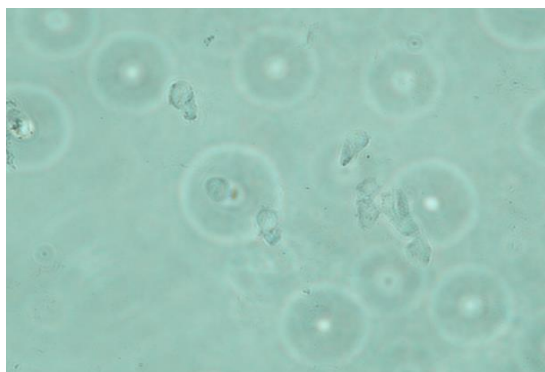
A partir de les gràfiques podem treure com a conclusió el fet de l'augment de la mida de les nanopartícules amb la presència de rodamina i com les nanopartícules de PLGA representen aproximadament 100 nm més de diàmetre que les d'Eudragit: Les d'Eudragit 112-131 nm, i les de PLGA 216-236 nm.

#### MICROSCOPÍ DE FLUORESCÈNCIA

Al microscopi de fluorescència no només vam mirar la fluorescència de les nanopartícules, també vam tenyir els nuclis amb DAPI (un compost fluorescent que tenyeix els nuclis de blau). En mirar les cèl·lules pel microscopi, vam fer una foto composta: amb llum visible blanca veiem les cèl·lules, amb fluorescència blava els nuclis i amb fluorescència vermella les nanopartícules. Amb un programa informàtic superposem els 3 canals i ens queda la foto final:

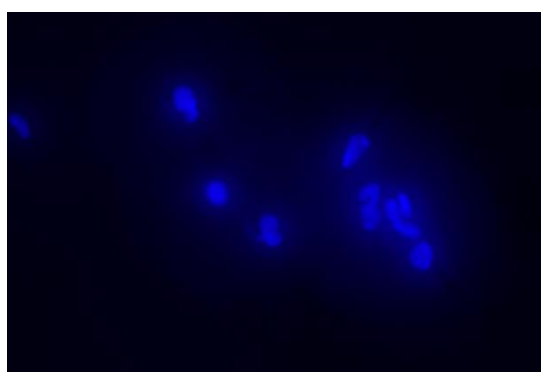
#### NANOPARTÍCULES DE CONTROL

CÈL·LULES



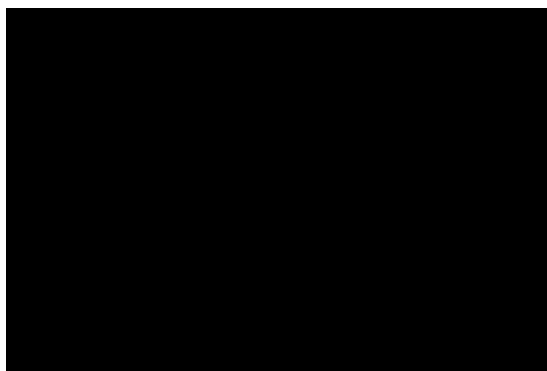
IMATGE 70. CÈL·LULES NANOPARTÍCULES DE CONTROL

NUCLIS



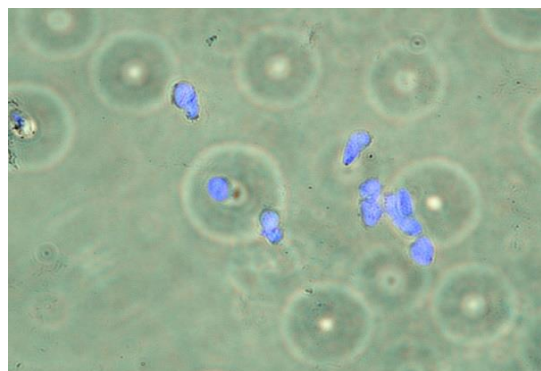
IMATGE 71. NUCLIS NANOPARTÍCULES DE CONTROL

FLUORESCÈNCIA



IMATGE 72. FLUORESCÈNCIA NANOPARTÍCULES DE CONTROL

RESULTAT FINAL

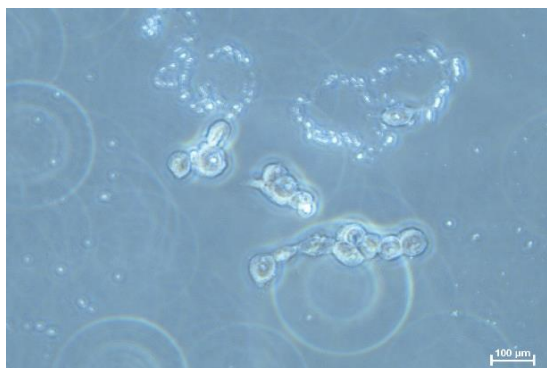


IMATGE 73. RESULTAT FINAL NANOPARTÍCULES DE CONTROL



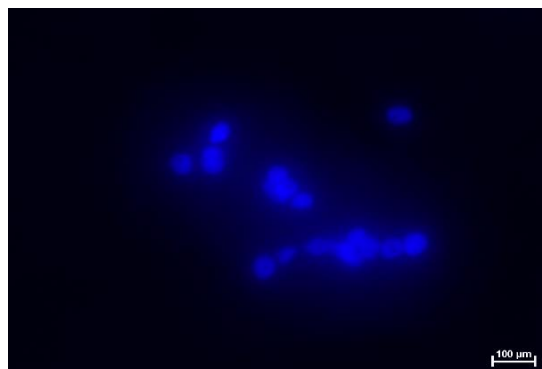
## NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES

CÈL·LULES



IMATGE 74. CÈL·LULES NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES

NUCLIS



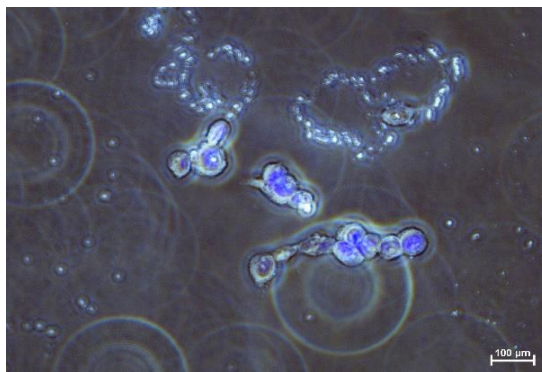
IMATGE 75. NUCLIS NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES

FLUORESCÈNCIA



IMATGE 76. FLUORESCÈNCIA NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES

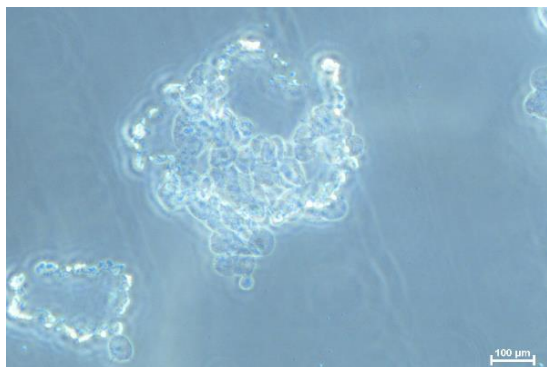
RESULTAT FINAL



IMATGE 77. RESULTAT FINAL NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES

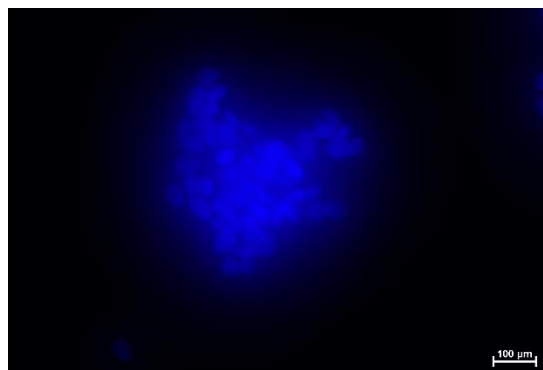
## NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA

CÈL·LULES



IMATGE 78. CÈL·LULES NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA

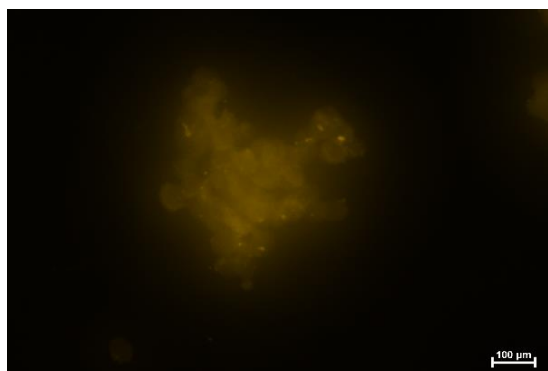
NUCLIS



IMATGE 79. NUCLIS NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA

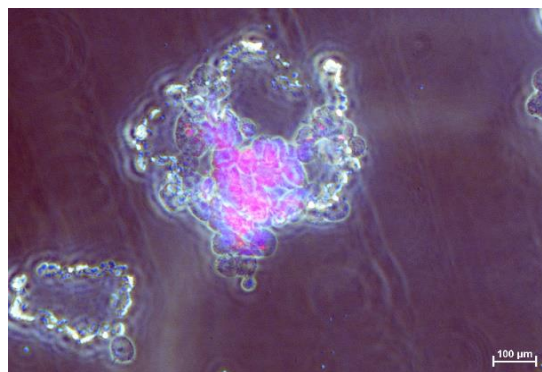


## FLUORESCÈNCIA



IMATGE 80. FLUORESCÈNCIA NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA

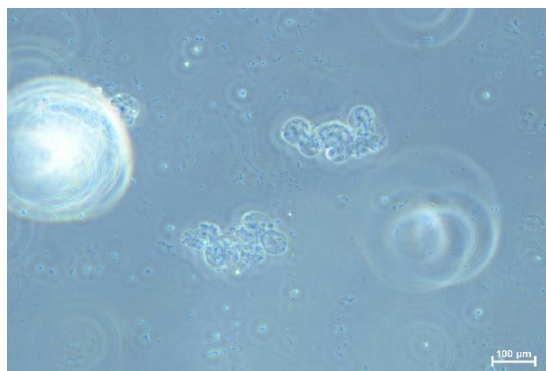
## RESULTAT FINAL



IMATGE 81. RESULTAT FINAL NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA

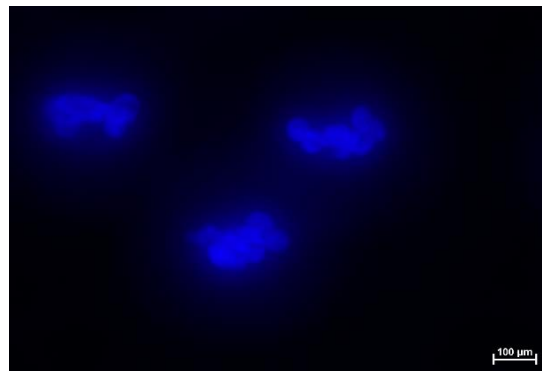
## NANOPARTÍCULES DE PLGA BLANQUES

### CÈL·LULES



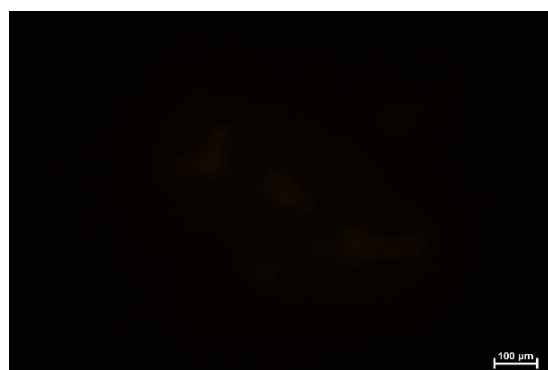
IMATGE 82. CÈL·LULES NANOPARTÍCULES DE PLGA BLANQUES

### NUCLIS



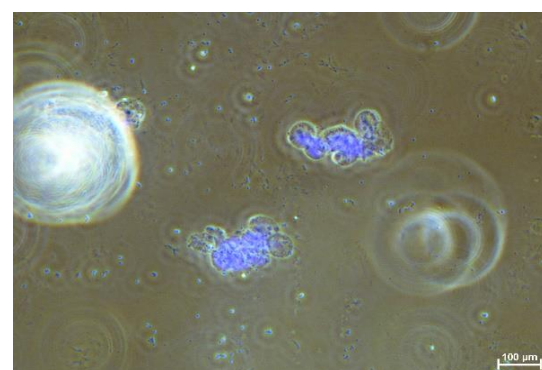
IMATGE 83. NUCLIS NANOPARTÍCULES DE PLGA BLANQUES

## FLUORESCÈNCIA



IMATGE 84. FLUORESCÈNCIA NANOPARTÍCULES DE PLGA BLANQUES

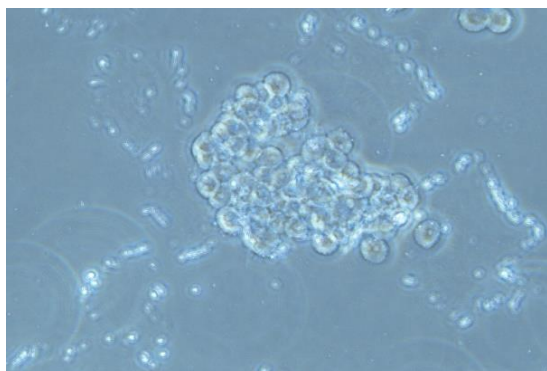
## RESULTAT FINAL



IMATGE 85. RESULTAT FINAL NANOPARTÍCULES DE PLGA BLANQUES

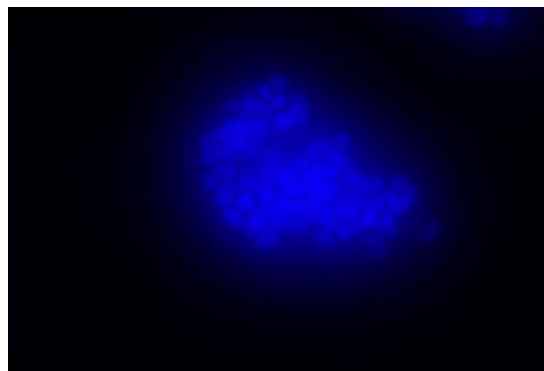
## NANOPARTÍCULES DE PLGA AMB RODAMINA

### CÈL·LULES



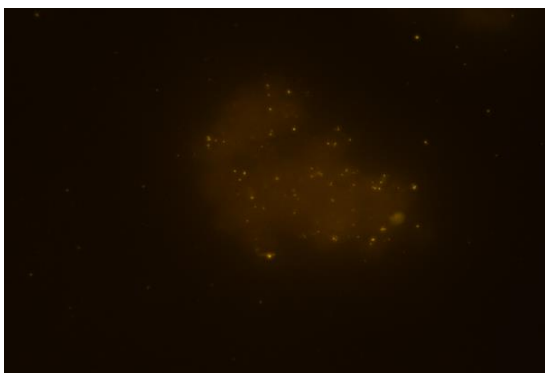
IMATGE 86. CÈL·LULES NANOPARTÍCULES DE PLGA AMB RODAMINA

### NUCLIS



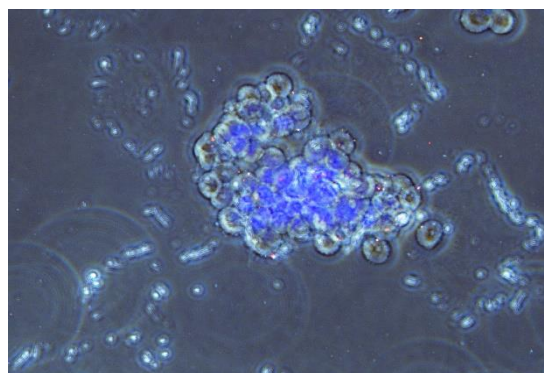
IMATGE 87. NUCLIS NANOPARTÍCULES DE PLGA AMB RODAMINA

### FLUORESCÈNCIA



IMATGE 88. FLUORESCÈNCIA NANOPARTÍCULES DE PLGA AMB RODAMINA

### RESULTAT FINAL



IMATGE 89. RESULTAT FINAL NANOPARTÍCULES DE PLGA AMB RODAMINA

A les nanopartícules al microscopi, els hi passa el següent:

- Les nanopartícules buides serveixen com a controls. En principi no veiem fluorescència (que és el que s'espera). Serveix per comprovar que ni el PLGA ni les nanopartícules d'Eudragit tenen fluorescència pròpia que es pugui confondre amb la fluorescència de la rodamina.
- Les nanopartícules de PLGA amb rodamina, quan entren a la cèl·lula els costa dies de dissoldre's, per això veiem fluorescència agregada en puntets petits, que són acumulacions de nanopartícules, encara intactes.
- Les nanopartícules d'Eudragit, com que al pH del citosol es destrueixen, quan hi arriben alliberen el seu contingut, que es difon i en comptes de veure més punts mostra un vermell més difuminat.

## SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPY (SEM)

El microscopi electrònic de rastreig és una tècnica de microscòpia electrònica capaç de produir imatges d'alta resolució de la superfície d'una mostra utilitzant les interaccions electró-matèria. Utilitza un feix d'electrons en lloc d'un feix de llum per a formar una imatge.

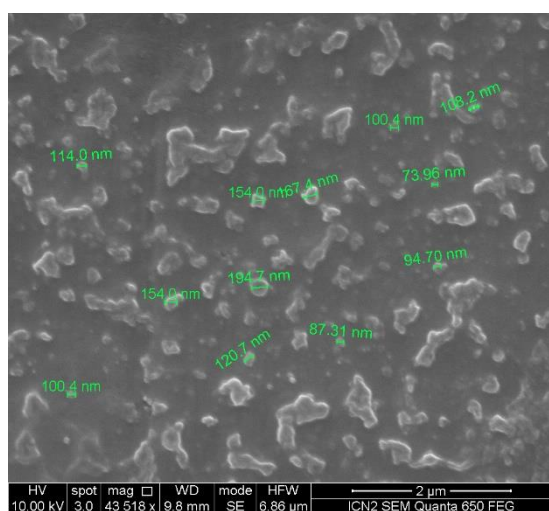
Per observar les nanopartícules al microscopi electrònic de rastreig cal:

1. Rentar les nanopartícules perquè quedin amb aigua destil·lada (si tenen aigua normal, les sals dissoltes cristal·litzen i tapen les nanopartícules).
2. En un suport especial de microscopi electrònic de rastreig, recobert amb alumini (ha de conduir l'electricitat) posem 3 gotes de les nanopartícules diluïdes, de manera que no es toquin. Ho deixem assecar en un dessecador fins que s'evapori tota l'aigua.
3. Un cop seques els suports s'introdueixen en un metal·litzador, que difumina platí en pols sobre les nanopartícules creant una capa conductora que fa que les puguem veure bé al microscopi.

Un cop metal·litzades s'introdueixen al microscopi, que fa el buit (perquè les molècules d'aire no absorbeixin o desviïn els electrons) i ja es poden observar.

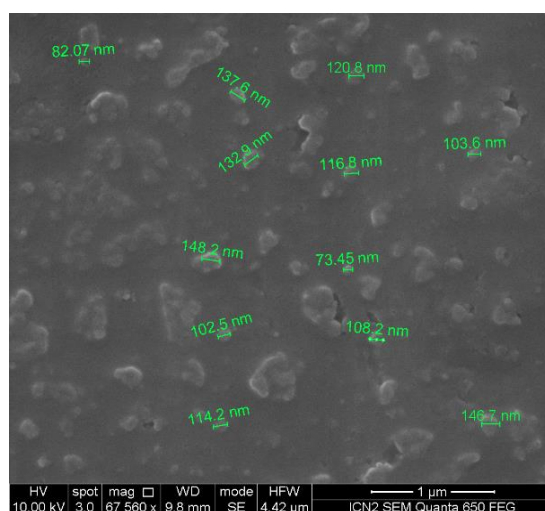
## NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES

IMATGE A 2  $\mu$ M



IMATGE 90. IMATGE SEM A 2  $\mu$ M NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES

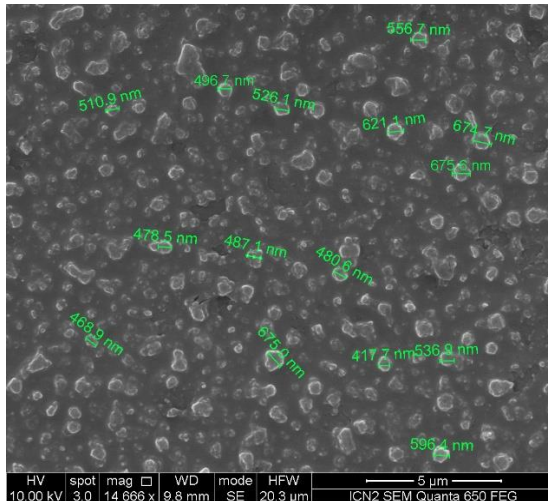
IMATGE A 1  $\mu$ M



IMATGE 91. IMATGE SEM A 1  $\mu$ M NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 BLANQUES

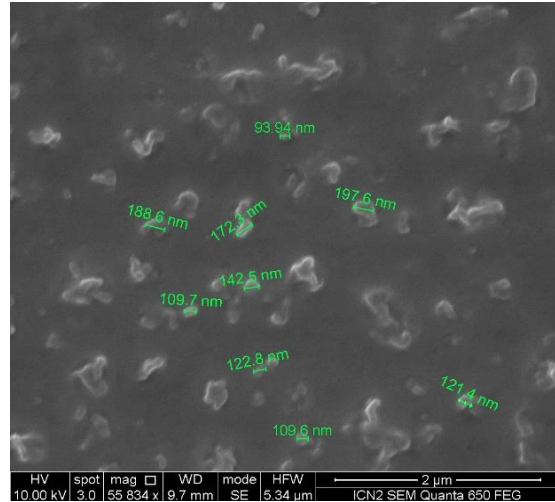
## NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA

IMATGE A 5  $\mu\text{m}$



IMATGE 92. IMATGE SEM A 5  $\mu\text{m}$  NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA

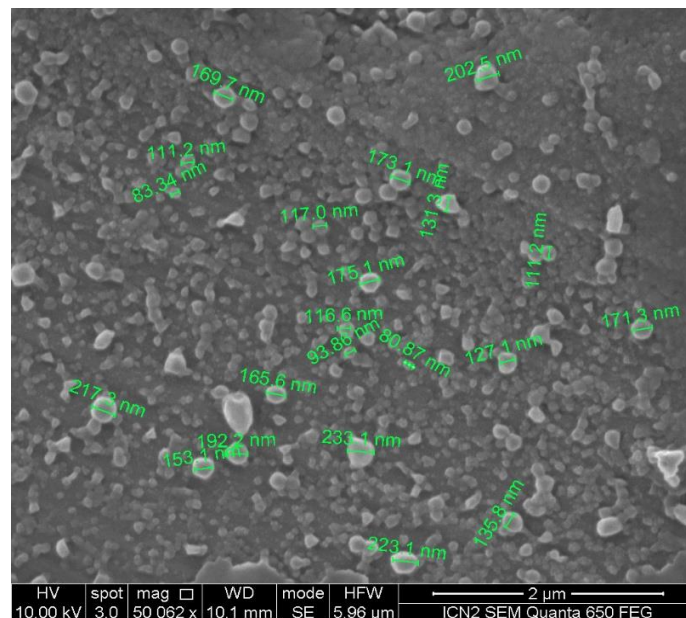
IMATGE A 2  $\mu\text{m}$



IMATGE 93. IMATGE SEM A 2  $\mu\text{m}$  NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L 100-55 AMB RODAMINA

## NANOPARTÍCULES DE PLGA BLANQUES

IMATGE A 2  $\mu\text{m}$

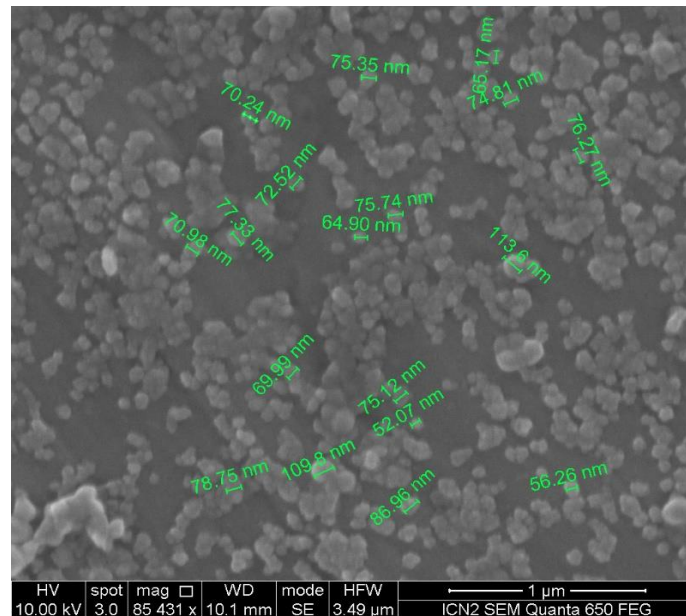


IMATGE 94. IMATGE SEM A 2  $\mu\text{m}$  NANOPARTÍCULES DE PLGA BLANQUES



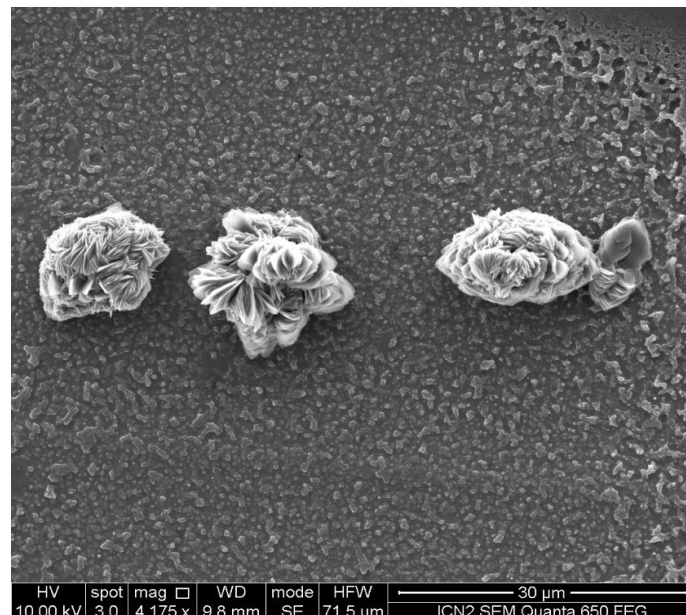
## NANOPARTÍCULES DE PLGA AMB RODAMINA

IMATGE A 1  $\mu\text{M}$



IMATGE 95. IMATGE SEM A 1  $\mu\text{M}$  NANOPARTÍCULES DE PLGA AMB RODAMINA

Amb el SEM, a més a més, també hem pogut observar la cristallització de la rodamina que no ha estat encapsulada correctament i ha precipitat adoptant aquestes formes:

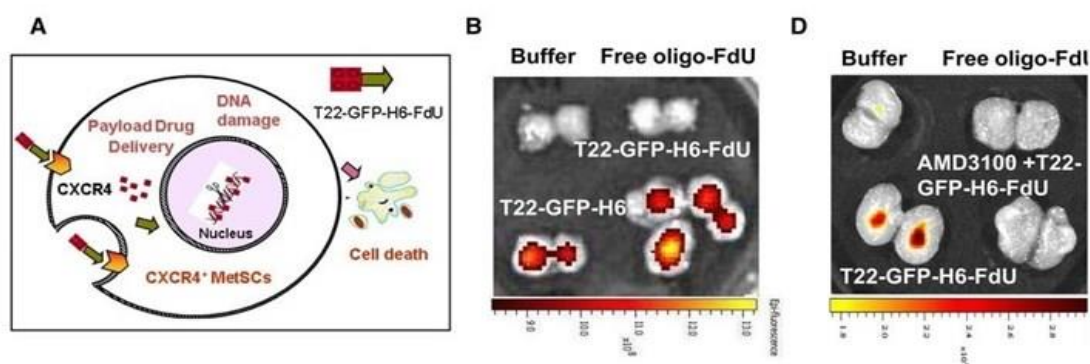


IMATGE 96. IMATGE SEM A 30  $\mu\text{M}$  D'EUDRAGIT L 100-55 QUE MOSTRA LA FORMA DE LA RODAMINA QUE NO HA ESTAT ENCAPSULADA I HA AGREGAT

## 9. ACTUALITAT NANOMÈDICA I NANOFARMACOLÒGICA

Investigadors del CIBER de Bioenginyeria, Biomaterials i Nanomedicina (CIBER-BBN) en l'Institut de Recerca Biomèdica de Sant Pau, la Universitat Autònoma de Barcelona i el CSIC (Consell Superior d'Investigacions Científiques) han creat un nanofàrmac que elimina selectivament les cèl·lules mare causants de metàstasi en models animals de càncer de còlon. Els resultats s'han publicat en la revista *EMBO Molecular Medicine*.

El fàrmac actua solament sobre les cèl·lules iniciadores de metàstasi a través de la seva interacció específica entre un pèptid present en la nanopartícula proteica que el transporta i el receptor cel·lular CXCR4 que es troba sobreexpressat en les cèl·lules tumorals.



IMATGE 97. IL·LUSTRACIÓ QUE MOSTRA L'ESTRUCTURA DEL NANOFÀRMAC I L'EFICÀCIA D'AQUEST EN CÈL·LULES TUMORALS

Això permet atacar solament a les cèl·lules tumorals, bloquejant la seva disseminació en estadis primerencs, de manera que prevé l'aparició de metàstasi alhora que evita els efectes adversos derivats dels tractaments habituals.

Els investigadors assenyalen que el receptor està sobreexpressat en 20 tipus diferents de càncer "com a mínim", entre ells els de pròstata, mama, ovari i uns altres no tan comuns com el de pàncrees.

Actualment, no existeixen fàrmacs en el mercat que eliminin selectivament les cèl·lules mare metastàtiques. El descobriment podria tenir un alt impacte clínic després que s'hagin realitzat els assajos necessaris per a aplicar-se a pacients humans, ja que afirmen que es tracta del primer fàrmac en el món que bloqueja la disseminació metastàtica, la principal causa de mort en pacients oncològics.

Els líders del projecte d'en concret, la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), són Toni Villaverde i Esther Vázquez, dos grans investigadors amb els quals vaig tenir el plaer de passar unes hores i realitzar una entrevista per tal d'aprofundir una mica més en el seu camp de treball i més concretament, en el projecte de caire mundial de l'elaboració d'un nanofàrmac capaç de bloquejar la metàstasi.

L'entrevista es troba a un annex a part en forma de revista; elaborada a partir de la transcripció literal de les paraules d'en Dr. Toni Villaverde i la Dra. Esther Vázquez. En ella, podem diferenciar tres apartats per tal de dividir el contingut de les respostes: preguntes generals, preguntes referides al nanofàrmac de prevenció de la metàstasi en el càncer colorectal i preguntes relacionades amb el càncer i l'aplicació de la nanomedicina en aquest.

A més de trobar aquest contingut, la revista també inclou l'entrevista al Dr. Simó Schwartz Jr., un dels millors investigadors de l'aplicació de la nanomedicina al càncer i a altres malalties no només a escala nacional, sinó a escala mundial, que ha fet possible que La Vall d'Hebron s'hagi convertit en el referent europeu en nanomedicina.

Per primera vegada el Campus Vall d'Hebron compta amb un projecte FET Innovation (*Future and Emerging Technologies*) que ha estat concedit en el marc del programa Horitzó 2020 al grup de recerca CIBBIM-Nanomedicina, liderat pel Dr. Simó Schwartz Jr., que pretén desenvolupar un simulador virtual, anomenat NanoDoc, que permetrà assajar el comportament de les nanopartícules dins d'un tumor i amb altres nanopartícules.



IMATGE 98. LOGOTIP HOSPITAL LA VALL D'HEBRON

Es tracta d'un projecte multidisciplinari que desenvoluparà una comunitat de centres de recerca europeus amb l'objectiu de crear una plataforma a l'abast de tot el món i a l'avantguarda de la Nanomedicina que faciliti el ràpid desenvolupament i testatge de nous tractaments contra el càncer.

*"Es convertirà una plataforma evolutiva capaç d'oferir de manera autònoma solucions innovadores, eficients i adaptades que també es puguin traslladar a altres reptes biomèdics complexos", explica el Dr. Schwartz Jr.*

Fins ara, es desconeix com és el comportament de les nanopartícules quan s'injecten en gran volum i entren en contacte, per exemple, amb el torrent sanguini. No se sap si fruit de les interaccions entre elles en diferents medis tindran una millor o pitjor eficàcia terapèutica. De la mateixa manera, tampoc es coneix la seva distribució en un entorn tumoral, si afecten més una mena de cèl·lules que a uns altres, el seu comportament davant les cèl·lules mare de càncer, etc.

*"Aquest simulador ajudarà a entendre com interaccionen entre si i en un medi biològic les nanopartícules quan s'injecten en gran volum, en un tumor o en qualsevol part de l'organisme", afegeix el Dr. Schwartz Jr. I així es podran aconseguir dissenys de nanopartícules que tinguin un comportament òptim que després s'estudiaran i validaran en models biològics *in vitro* i *in vivo* en cèl·lules mare de càncer de mama i de còlon.*

Aquesta entrevista també reflecteix una transcripció literal de les paraules del Dr. Simó i està dividida en quatre parts: preguntes personals, generals, referides al campus de La Vall d'Hebron com a referent europeu i preguntes relacionades amb el càncer, l'aplicació i el camí de la nanomedicina en aquest.



## 9.1. ENTREVISTA DRA. ESTHER VÁZQUEZ I DR. TONI VILLAVERDE

El missatge que jo considero que és més important i característic de la primera entrevista, és el fet que la nanofarmacologia no es basa en encapsular un fàrmac, sinó que tracta d'unir de forma química o covalent una estructura de mida nanomètrica amb un fàrmac, donant propietats que els fan estar entre líquid i sòlid produint un fenomen específic en el càncer, capaç de fer que els fàrmacs entrin dintre del tumor i no surtin, definint la penetrabilitat en els teixits, la qual varia segons la mida de les partícules.



IMATGE 99. AMB LA DRA. ESTHER VÁZQUEZ I EL DR. TONI VILLAVERDE

Bàsicament es vol reproduir la mobilitat i penetrabilitat dels virus, els quals són d'escala nanomètrica. Expliquen també que la mida nanomètrica en si no comporta el risc, i el problema està en el fet que moltes nanopartícules que es fan contenen materials intrínsecament tòxics. Però remarquen: *“El fet de ser nano no és tòxic”*.

Pel que fa a la referència al seu treball, els doctors s'encarreguen de fer nanoteràpia, i més concretament, transportar fàrmacs antitumorals a través de nanopartícules.

Tal com diu la Dra. Esther: *“Cualquier enfermedad es susceptible de ser tratada mediante la nanomedicina”*, ja que aquesta dóna l'oportunitat que el fàrmac antitumoral vagi directament a les cèl·lules diana, no alliberi el seu material citotòxic a la resta de cèl·lules del cos i redueixi els efectes secundaris.

Insisteixen que tot pot acabar dintre de l'escala nanomètrica, però que en el camp de la nanomedicina no es talla fins a aconseguir aquesta mida, sinó que es fa un disseny racional dintre de l'escala nanomètrica per tal que tingui una funció concreta i vagi a un lloc determinat.

Ens expliquen que la sortida al mercat d'un nou fàrmac requereix molts estudis, molts anys de fases clíniques i preclíniques, de molta experimentació i sobretot, de molts criteris de controls de qualitat força estrictes.

Confien que s'obtindran fàrmacs més eficients que faran possible les teràpies personalitzades i que l'objectiu terapèutic es complirà amb millor estadística i amb un menor percentatge d'efectes secundaris.

Referit al seu nanofàrmac de prevenció de metàstasi, expliquen interessos, estudis, funcionament i capacitat d'actuació que caracteritzen el seu estudi.

El més important que jo trec és el fet que el seu disseny podria combatre 20 tipus de tumors i que sense un finançament privat extern, no hi ha res a fer. Els diners tenen molta importància al desenvolupament i arribada d'un nou fàrmac al mercat. Amb el finançament públic es pot començar i avançar en un cert projecte, però les últimes fases necessàries per a poder provar-ho amb pacients humans no es poden arribar a desenvolupar.

En definitiva, s'augmentarà l'efectivitat farmacològica, es reduiran a la vegada els efectes secundaris i el càncer acabarà sent derrotat: *“La cura del càncer evidentment, encara està lluny, però jo crec que és la direcció i camí correcte. Que ningú tingui por a les innovacions”* conclou el Dr. Toni Villaverde.

## 9.2. ENTREVISTA DR. SIMÓ SCHWARTZ JR.

En la segona entrevista, podem situar l'interès del Dr. Simó en fer recerca a molts anys enrere, quan no hi havia tanta varietat de carreres científiques per especialitzar-se. Però el veritable interès que l'ha portat al lloc on es troba actualment, el marquem aproximadament fa uns 10 anys, un moment on es començava a plantejar el possible ús de la nanotecnologia en el camp del tractament i diagnòstic de malalties. Va afrontar-se llavors a tot un seguit de reptes, ja que en aquell moment la tecnologia no es trobava tan avançada; però van ser aquests anys tan complicats els



IMATGE 100. AMB EL DR. SIMÓ SCHWARTZ JR.

essencials per a portar el seu equip i el Campus de La Vall d'Hebron com a centre sanitari capdavanter mundial.

L'entorn familiar i els estudis als Estats Units, l'han portat a ocupar grans càrrecs com són ser el director del CIBBIM-Nanomedicina i el president de l'European Society of Nanomedicine (ESNAM), d'entre altres, dels quals ens explica el seu paper.

Ha aportat també grans projectes relacionats amb el càncer i amb nanoconjugats terapèutics capaços de destruir per exemple, cèl·lules mare tumorals, les principals responsables del fet que el càncer estigui i sigui capaç de fer metàstasi i matar al malalt.

A més a més, ha estat capaç de resoldre un punt que era clau per identificar aquestes cèl·lules canceroses i poder treballar amb elles, gràcies a un sistema genètic artificial que fa que aquestes cèl·lules emetin llum i fluorescència.

Ens explica amb detall el concepte de nanomedicina, els interessos per a treballar amb ella i els clars avantatges respecte a la idea convencional d'administrar el fàrmac en sang: un fàrmac en via intravenosa arriba al tumor en un 0,1%, en un fet que vol dir que el 99,9% del fàrmac injectat va a on no toca. La nanomedicina fent servir transportadors específics ha experimentat entre un 5 i un 15% d'efectivitat, el que vol dir que si parléssim d'un 10%, voldria dir un augment de 100 vegades més.

Compara el nanofàrmac amb un camió a l'hora de transportar un fàrmac amb l'ajuda d'uns transportadors com per exemple pèptids, que ajuden a dirigir-los a les cèl·lules afectades. Ens parla d'un funcionament químic i espontani a l'hora de fer nanomedicina i rebutja la idea d'utilitzar unes mini pinces per muntar les estructures.

L'estructura especial dels tumors, sobretot vascular, és la que afavoreix l'ús de les nanomedicines i ens parla de com el ràpid creixement del tumor deixa espais al teixit per on entren els quimioteràpics.

Parla de beneficis en el tractament i de l'eficàcia dels estudis en models animals per evitar imprevistos, i aprofundeix en les 3 branques de les quals es divideix la nanomedicina, en l'explicació i el concepte de nanopartícules i nanopartícules dirigides, i en l'impacte dels nanorobots, tant actual com futur.

Agraeix l'alarma social que s'ha creat amb el concepte de nanotoxicitat, ja que les coses s'han de fer amb cap, i aprova una possible distinció amb etiquetes d'advertència, pel fet que tenim dret de saber el que posem i deixem de posar en contacte amb el nostre cos.

En aquesta entrevista, també podem apreciar la importància dins de la recerca biomèdica tant dels diners, com dels controls clínics i preclínics. Confia que en els pròxims anys veurem molts més fàrmacs al mercat basats en nanomedicines i que efectivament, faran el que estan demostrant que poden fer: augmentar l'eficàcia terapèutica disminuint els efectes secundaris indesitjables.

Ens demostra l'impacte que té treballar en un campus referent a Europa: una quantitat de projectes de recerca molt més grans que qualsevol altra institució i moltes aportacions científiques que donen un prestigi que fa que els científics d'arreu del món segueixin els seus passos.

Trobem l'explicació i funcionament dels projectes europeus dels quals forma part i de l'esperançador camí que s'espera amb aquests projectes i més concretament, amb l'ús de la nanomedicina aplicada al càncer.

Per acabar, situa Catalunya com a capdavantera en coneixement, descobriment de nous materials i en moviment de publicacions de patents: en articles científics de nanociència, Barcelona és la segona ciutat del món en importància després de Boston, un fet que dóna una potència i capacitat mundial molt gran.

I finalment, ens especifica la situació actual de la nanomedicina aplicada al càncer i de com aquesta hauria de millorar la seva cura amb nous instruments i nous fàrmacs més efectius que ajudaran a salvar més vides.

*“La previsió de futur de la nanomedicina en aquests moments és molt bona i és una oportunitat terapèutica nova que s’ha d’acabar d’explotar. No s’ha de tenir por als termes nano”,* afegeix per concloure el Dr. Simó Schwartz.

## 10. CONCLUSIONS

Un cop acabada la investigació realitzada al llarg de tot el treball, tant bibliogràfica com experimental, he pogut reflexionar sobre les dues hipòtesis plantejades, les quals puc dir amb total certesa, que són certes.

La primera d'elles feia referència a la possibilitat de millora de les propietats de farmacològiques mitjançant l'ús de nanotecnologia aplicada a la salut. Es tracta d'una afirmació que bé es podia arribar a corroborar amb la recerca més aviat bibliogràfica, però que ha estat amb les entrevistes on he vist el veritable efecte: encapsulant a escala nanomètrica es redueix la toxicitat i s'aconsegueixen millors resultats.

La nanomedicina dona una oportunitat que és molt bona: dirigir el fàrmac a cèl·lules d'un teixit en particular. Això és molt important en el cas del càncer perquè els fàrmacs antitumorals són citotòxics i maten totes les cèl·lules, quan l'únic que es vol és que acabi amb les cèl·lules diana. Per això els fàrmacs antitumorals tenen tants efectes secundaris.

Un es pren un fàrmac com podria ser un antiinflamatori o un quimioteràpic i aquest es difon per tot el cos, però sense anar a aquells teixits que concretament estan inflamats. Llavors la nanomedicina podria arribar a permetre en un futur que els fàrmacs vagin i actuïn on han d'actuar.

La millora de resultats va lligada a la possibilitat d'elaborar un disseny racional on poder afegir a una nanopartícula tot allò que es consideri necessari perquè allò que es transporta resulti funcional, arribi a un lloc concret i faci la seva funció. En la teràpia del càncer més concretament, el que fa la nanomedicina és "dir-li" a un fàrmac a quina cèl·lula en concret ha d'entrar, assegurant-se que tots aquests antitumorals que presenten tants efectes secundaris es redueixin i la resta de cèl·lules sanes no es vegin afectades.

I és a causa de tot el que he esmentat que la nanomedicina es presenta com a una ciència amb un seguit de possibilitats que fan que la meua segona hipòtesi es corrobori, i per tant, la nanomedicina sigui un possible substitut als tractaments actuals contra el càncer.

Actualment els antitumorals no són suficientment eficaços pel fet que en tenir tants efectes secundaris, s'obliga a reduir les dosis fins a unes xifres on no són suficientment eficaces: "quan un fàrmac s'injecta via intravenosa, la quantitat de fàrmac que injectada que arriba al tumor, més o menys, és un 0,1%. Un fet que vol dir que el 99,9% del que has injectat va on no toca", afirma el Dr. Simó Schwartz Jr.

Per tant, tots els tractaments actuals del càncer resulten insuficients i la nanomedicina presenta una millora que es veu molt clara mitjançant l'exemple del Dr. Simó, on explica que si parléssim d'una millora d'un 10%, passariem d'un 0,1% a un 10%, aconseguint una efectivitat 100 vegades major.

Amb la qual cosa, dirigint el fàrmac fem que aquest sigui menys tòxic per a les cèl·lules sanes i per tant, pugui permetre augmentar les dosis fins a poder atacar directament les cèl·lules mare tumorals, les principals causants de la metàstasi.

A més a més, m'agradaria esmentar el fet que desgraciadament la nanomedicina, com tot en aquesta vida, no deixa de ser un negoci. Aquest fet implica que la subvenció pública arribi a uns límits de finançament de projectes i que per tant, per avançar en estudis, faci falta una inversió privada.

Però aquests inversors miren abans el benefici de la seva inversió a curt termini, que el fet de curar a la gent, un fet que m'entristeix i que possiblement, hagi deixat a molta gent sense cura o sense una millora en la seva salut.

Per arribar a aquestes conclusions, he anat assolint a poc a poc i detingudament tot i cadascun dels objectius proposats en un principi.

Gràcies a tot el seguit d'apartats i subapartats del marc teòric he après, conegut i profunditzat en un molt petit i a la vegada molt ampli món, el nanoscòpic.



D'aquest he assolit la seva existència a la natura i més específicament, el seu impacte en la salut mitjançant tècniques innovadores i sofisticades.

Aquestes tècniques, juntament amb tots els coneixements adquirits amb la recerca bibliogràfica, les he pogut acabar d'entendre gràcies a la primera part del meu marc pràctic, on he pogut treballar autònomament seguint uns protocols per realitzar una síntesi i caracterització de nanopartícules mitjançant tècniques d'encapsulació, fluorescència i microscòpiques.

Aquestes nanopartícules van fer-se de manera correcta i totes dues van penetrar les cèl·lules tumorals de neuroblastoma per dur la seva funció corresponent.

A més a més, a part d'endinsar-me en el que és l'experimentació en la nanociència i de viure en primera persona com s'hi treballa en ella, tres grans científics m'han demostrat el motiu pel qual a Catalunya som punters en el camp de la nanomedicina i sobretot, han arrodonit les meves idees sobre les aplicacions, novetats i el futur que s'espera de la nanomedicina.

Per acabar aquest treball, el missatge que més m'agradaria transmetre a tots aquells que tenen en el seu interior aquesta preocupació i aquesta por davant el càncer, és que s'està anant pel bon camí i que encara que aquest pugui ser llarg i fosc, cada vegada desprèn més llum al seu final.

Estic segur que la lluita contra el càncer finalment, acabarà sent una realitat i el càncer serà derrotat.

## 11. FONTS DOCUMENTALS

### BIBLIOGRAFIA

P. POOLE, CHARLES; J. OWENS, FRANK. *Introducción a la nanotecnología*. ES: REVERTE, 2007.

SANTAMARÍA RAMIRO, JESÚS. *Nanomedicina: Una visión desde el diseño de nuevos materiales*. ES: Prensas de la Universidad de Zaragoza, 2015.

### WEBGRAFIA

EcuRed. Nanociencia, <https://www.ecured.cu/Nanociencia> (Consulta: 19 de juny de 2019)

The Room Bottom. Historia de la Nanotecnología, <https://theroombottom.wordpress.com/historia-de-la-nanotecnologia/> (Consulta: 19 de juny de 2019)

Gran enciclopèdia catalana. nanociència, <https://www.enciclopedia.cat/EC-GEC-0518065.xml> (Consulta: 19 de juny de 2019)

Educación química. La química en la nanociencia, <https://educacionquimica.wordpress.com/2012/01/28/la-quimica-en-la-nanociencia/> (Consulta: 20 de juny de 2019)

Tecnalia. Nuevos conocimientos en nanociencia y nanotecnología, <https://www.tecnalia.com/es/actualidad/noticias/tecnalia/nuevos-conocimientos-en-nanociencia-y-nanotecnologia.htm> (Consulta: 20 de juny de 2019)

Naukas. Avances, límites y problemas de la Nanotecnología, <https://naukas.com/2018/08/03/avances-limites-y-problemas-de-la-nanotecnologia/> (Consulta: 24 de juny de 2019)

Public Health. Nanotecnologías, [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/opinions\\_layman/es/nanotecnologias/index.htm](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/es/nanotecnologias/index.htm) (Consulta: 24 de juny de 2019)

Nanova. ¿Qué es la Nanotecnología y como se aplica a la vida diaria en el 2019?, <https://nanova.org/que-es-la-nanotecnologia/> (Consulta: 5 de juliol de 2019)

El Mundo. La revolución de la nanotecnología en la medicina del futuro, <https://www.elmundo.es/ciencia/2014/03/25/5331560a268e3e8a688b4571.html> (Consulta: 5 de juliol de 2019)

Grupo de Nanobiosensores y aplicaciones Bioanalíticas. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud, [https://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7\\_Nanomedicina.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf) (Consulta: 17 de juliol de 2019)

Teinteresa.es. Biomedicina. ¿Qué es la nanomedicina?, [http://www.teinteresa.es/microsite/Pregunta\\_al\\_medico/biomedicina/nanomedicina\\_0\\_1135086697.html](http://www.teinteresa.es/microsite/Pregunta_al_medico/biomedicina/nanomedicina_0_1135086697.html) (Consulta: 17 de juliol de 2019)

CORDIS. Resultados de investigaciones de la UE. Nanomedicina: formas innovadoras de tratar afecciones complejas, <https://cordis.europa.eu/article/id/400909-nanomedicine-innovative-ways-of-treating-challenging-conditions/es> (Consulta: 18 de juliol de 2019)

Euroresidentes. Nanomedicina: nanotecnología aplicada a la medicina, <https://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/diccionario/nanomedicina.htm> (Consulta: 19 de juliol de 2019)

El Mundo. Nanomedicina para luchar contra la propagación del cáncer, <https://www.elmundo.es/economia/innovadores/2018/07/13/5b43778c268e3e2e428b45ad.html> (Consulta: 19 de juliol de 2019)

Divulgación y Cultura Científica Iberoamericana. Nanomedicina: la revolución ya comenzó, [https://www.oei.es/historico/divulgacioncientifica/noticias\\_517.htm](https://www.oei.es/historico/divulgacioncientifica/noticias_517.htm) (Consulta: 23 de juliol de 2019)

SCIELO. Nanomedicina: aspectos generales de un futuro [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2011000300018](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2011000300018) (Consulta: 23 de juliol de 2019)

NCYT. La cultura vista a escala nanométrica, <https://noticiasdelaciencia.com/art/25974/la-cultura-vista-a-escala-nanometrica> (Consulta: 26 de juliol de 2019)

Universidad de Costa Rica. La cultura es vista a escala nanométrica <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2017/09/18/la-cultura-es-vista-a-escala-nanometrica.html> (Consulta: 26 de juliol de 2019)

Madri+d. Nuevos materiales a escala nanométrica, <http://www.madri-masd.org/noticias/Nuevos-materiales-escala-nanometrica/44217> (Consulta: 26 de juliol de 2019)

Monografias.com. Nanotecnología, Riesgos y Beneficios, <https://www.monografias.com/trabajos87/nanotecnologia-riesgos-y-beneficios/nanotecnologia-riesgos-y-beneficios.shtml> (Consulta: 31 de juliol de 2019)

Euroresidentes. Beneficios de la Nanotecnología, [https://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/nanotecnologia\\_responsable/nanotecnologia\\_beneficios.htm](https://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/nanotecnologia_responsable/nanotecnologia_beneficios.htm) (Consulta: 31 de juliol de 2019)

EcuRed. Nanopartículas, <https://www.ecured.cu/Nanopart%C3%ADculas> (Consulta: 28 d'agost de 2019)

Solmeglas. ¿Qué son las Nanopartículas? Tipos y propiedades de estas partículas, <https://solmeglas.com/que-son-nanoparticulas-tipos/> (Consulta: 28 d'agost de 2019)

Nanotec. ¿Qué son las nanopartículas?, <http://www.nanotec.es/que-son-las-nanoparticulas/> (Consulta: 28 d'agost de 2019)

Interempresas.net. Nanomateriales: riesgos para la salud y recomendaciones en el manejo de nanopartículas en entornos laborales, <https://www.interempresas.net/Proteccion-laboral/Articulos/250630-Nanomateriales-riesgos-salud-recomendaciones-manejo-nanoparticulas-entornos-laborales.html> (Consulta: 29 d'agost de 2019)

Astronoo: El universo en todos sus estados. Nanopartículas, un millar de átomos, <http://www.astronoo.com/es/articulos/nanoparticulas.html> (Consulta: 29 d'agost de 2019)

AIMPLAS. Materiales del futuro. Nanopartículas con propiedades avanzadas, <https://www.aimplas.es/blog/materiales-del-futuro-nanoparticulas-con-propiedades-avanzadas/> (Consulta: 30 d'agost de 2019)

El Mundo. Nanopartículas para la medicina del futuro, <https://www.el-mundo.es/elmundo/2012/03/26/nanotecnologia/1332760914.html> (Consulta: 30 d'agost de 2019)

OpenMind. Nanopartículas: una gran promesa contra el cáncer, <https://www.bbvaopenmind.com/ciencia/investigacion/nanoparticulas-una-gran-promesa-contra-el-cancer/> (Consulta: 30 d'agost de 2019)

Muy interesante. Desarrollan nanopartículas capaces de 'abrasar' las células tumorales, <https://www.muyinteresante.es/salud/articulo/nanoparticulas-para-combatir-el-cancer> (Consulta: 2 de setembre de 2019)

Biosalud. Las nanopartículas permiten transportar terapias hasta los tumores, <https://biosalud.org/blog/nanoparticulas-permiten-transportar-terapias-tumores/> (Consulta: 2 de setembre de 2019)

SINC: La ciencia es noticia. Nanotecnología para combatir el cáncer mucho más rápido, <https://www.agenciasinc.es/Noticias/Nanotecnologia-para-combatir-el-cancer-mucho-mas-rapido> (Consulta: 3 de setembre de 2019)

Ennomotive. Nanomateriales: breve historia y aplicaciones actuales, <https://www.ennomotive.com/es/nanomateriales-historia-aplicaciones/> (Consulta: 3 de setembre de 2019)

AFULIC. Nanomedicina aplicada al cáncer, <http://afulic.org/2017/11/nanomedicina-aplicada-al-cancer/> (Consulta: 5 de setembre de 2019)

MM: Mutua Madrileña. Nanomedicina contra el cáncer: tratamiento de tumores, [https://www.mutua.es/blog/salud/nanomedicina-contra-el-cancer\\_post/](https://www.mutua.es/blog/salud/nanomedicina-contra-el-cancer_post/) (Consulta: 5 de setembre de 2019)

Campus Sanofi. La nanomedicina abre nuevas vías en la lucha contra el cáncer, <https://campussanofi.es/2017/09/07/la-nanomedicina-abre-nuevas-vias-en-la-lucha-contra-el-cancer/> (Consulta: 6 de setembre de 2019)

Nanomedicina XXI. Nanodiagnóstico, <https://sites.google.com/site/nanomedicina21/home/nanodiagnostico> (Consulta: 13 de setembre de 2019)

Nanomedicina, una cura en miniatura, <http://curaminiatura.weebly.com/aplicaciones.html> (Consulta: 13 de setembre de 2019)

SINC: La ciencia es noticia. Nanoterapia para combatir células madre cancerosas, <https://www.agenciasinc.es/Noticias/Nanoterapia-para-combatir-celulas-madre-cancerosas> (Consulta: 15 de setembre de 2019)

LibertadDigital. Nanoterapia para luchar contra el cáncer, <https://www.libertaddigital.com/salud/nanoterapia-para-luchar-contra-el-cancer-1276404753/> (Consulta: 15 de setembre de 2019)

NCYT. Nanoterapia: la liberación controlada de quimioterapéuticos para combatir células madre cancerosas, <https://noticiasdelaciencia.com/art/34223/nanoterapia-la-liberacion-controlada-de-quimioterapeuticos-para-combatir-celulas-madre-cancerosas> (Consulta: 15 de setembre de 2019)

Gaceta Médica. Nanofármacos: una mega-revolución en el interior de la célula tumoral, <https://www.gacetamedica.com/especializada/nanofarmacos-una-mega-revolucion-en-el-interior-de-la-celula-tumoral-YX2189890> (Consulta: 18 de setembre de 2019)

Nanofarmacología y Nanomedicina. Nanofarmacología, <https://nanofarmacologia.wordpress.com/nanofarmacologia/> (Consulta: 18 de setembre de 2019)

El Global. Nanofármacos, el mejor vehículo para alcanzar la célula tumoral, <https://www.elglobal.es/industria-farmaceutica/nanofarmacos-el-mejor-vehiculo-para-alcanzar-la-celula-tumoral-YG2190247> (Consulta: 18 de setembre de 2019)

Mejor con Salud. Avances que la nanomedicina está aportando al campo de las ciencias de la salud, <https://mejorconsalud.com/avances-nanomedicina-campo-ciencias-de-la-salud/> (Consulta: 20 de setembre de 2019)

Genotipia: Genética Médica News. Nanorobots de ADN para combatir el cáncer, [https://genotipia.com/genetica\\_medica\\_news/nanorobots-de-adn/](https://genotipia.com/genetica_medica_news/nanorobots-de-adn/) (Consulta: 22 de setembre de 2019)

Diari as. Crean nanorobots para combatir el cáncer, [https://as.com/deporte/vida/2018/02/20/portada/1519116734\\_324425.html](https://as.com/deporte/vida/2018/02/20/portada/1519116734_324425.html) (Consulta: 22 de setembre de 2019)

Muy interesante. Crean nanorobots para buscar y destruir tumores, <https://www.muyinteresante.es/ciencia/video/crean-nanorobots-para-buscar-y-destruir-tumores> (Consulta: 22 de setembre de 2019)

Razón y Palabra. La nanotecnología y sus riesgos: el nacimiento de la nanotoxicología, <http://www.razonypalabra.org.mx/N/n68/10hreyes.html> (Consulta: 26 de setembre de 2019)

Nanova. Nanotecnología en la medicina: Un gran potencial, pero ¿cuáles son los riesgos?, <https://nanova.org/nanotecnologia-en-la-medicina/> (Consulta: 26 de setembre de 2019)



El País. Los 'nanorriesgos' no son tan diminutos, [https://elpais.com/diario/2010/10/05/sociedad/1286229601\\_850215.html](https://elpais.com/diario/2010/10/05/sociedad/1286229601_850215.html) (Consulta: 26 de setembre de 2019)

Tendencias científicas. Nanotoxicidad: Las nanopartículas sí pueden atravesar membranas, [https://www.tendencias21.net/Nanotoxicidad-Las-nanoparticulas-si-pueden-atravesar-membranas\\_a43381.html](https://www.tendencias21.net/Nanotoxicidad-Las-nanoparticulas-si-pueden-atravesar-membranas_a43381.html) (Consulta: 27 de setembre de 2019)

Evonik. Eudragit® functional polymers for oral solid dosage forms, <https://healthcare.evonik.com/product/health-care/en/products/pharmaceutical-excipients/EUDRAGIT/> (Consulta: 30 de setembre de 2019)

PMC. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347861/> (Consulta: 30 de setembre de 2019)

NUVE. Un nanofármaco para la prevención de la metástasis en el cáncer colorrectal, <https://www.revistanuve.com/un-nanofarmaco-para-la-prevencion-de-la-metastasis-en-el-cancer-colorrectal/> (Consulta: 4 d'octubre de 2019)

CIBER-BNN. Avanzan en una nanomedicina para la eliminación selectiva de las células madre tumorales, <https://www.ciber-bbn.es/noticias/avanzan-en-una-nanomedicina-para-la-eliminacion-selectiva-de-las-celulas-madre-tumorales> (Consulta: 4 d'octubre de 2019)

CIBER-BNN. Ficha personal, <https://www.ciber-bbn.es/grupos/grupo-de-investigacion/ficha-personal?id=6204> (Consulta: 5 d'octubre de 2019)

CIBER-BNN. Ficha personal, <https://www.ciber-bbn.es/grupos/grupo-de-investigacion/ficha-personal?id=3632> (Consulta: 5 d'octubre de 2019)

Vall d'Hebron. La actualidad de todo, <https://www.vallhebron.com/es/noticias/un-nuevo-proyecto-europeo-concedido-al-cibbim-nanomedicina-convierte-al-campus-vall-dhebron> (Consulta: 6 d'octubre de 2019)

Vall d'Hebron (VHIR), Personal profile, <http://en.vhir.org/portal1/fitxa-personal.asp?id=33250> (Consulta: 6 d'octubre de 2019)

Vall d'Hebron Hospital. All Investigators, <http://www.cibbim.eu/team/dr-simo-schwartz-navarro/> (Consulta: 6 d'octubre de 2019)

## REFERÈNCIES

BLANCO BEA, DUANI; PÉREZ TEJEDA, ALAIN; ACUÑA PARDO, ARLENIS; CARREÑO CUADOR, JENRY. *"Nanomedicina: aspectos generales de un futuro promisorio"*. Revista Habanera de Ciencias Médicas, Juliol-Setembre 2011, vol. 10, núm. 3, p. 410-421.

BOISSEAU, PATRICK; LOUBATON, BERTRAND. *"Nanomedicine, nanotechnology in medicine"*. Comptes Rendus Physique, Setembre 2011, vol. 12, núm 7, p. 620-636.

DE LA ROSA, MIGUEL ÁNGEL. *"Nanomedicina"*. SEBBM (Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular), Juny 2017, núm. 192, p. 6-24.

GÓMEZ LÓPEZ, ARLEY. *"Nanomedicina y su impacto en la parte médica"*. Repertorio de Medicina y Cirugía, Juliol-Setembre 2017, vol. 26, núm. 3, p. 129-130.

ROJAS-AGUIRRE, YARELI; AGUADO-CASTREJÓN, KARINA; GONZÁLEZ MÉNDEZ, ISRAEL. *"La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?"*. Educación Química, Octubre 2016, vol. 27, núm. 4, p. 286-291.

STYLIANOPOULOS, TRIANTAFYLLOS; K.JAIN, RAKESH. *"Design considerations for nanotherapeutics in oncology"*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Novembre 2015, vol. 11, núm. 8, p. 1893-1907.

ZHANG, LIJIE; J.WEBSTE, THOMAS. *"Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration"*. Nano Today, 2009, vol. 4, núm 1, p. 66-80.

## 12. GLOSSARI

**Abscés:** L'abscess pulmonar, en medicina, fa referència a una lesió a teixit pulmonar plena de pus i amb simultània inflamació de teixits. Generalment, és ocasionada per una infecció.

**Aerosols:** Col·loide de partícules sòlides o líquides suspeses en un gas.

**Agent coagulant:** Que produeix coagulació, és a dir, que ajuda a la separació o a la obtenció d'una fase sòlida gelatinosa insoluble.

**Algoritme:** Conjunt d'instruccions o regles definides i no-ambigües, ordenades i finites que permet, típicament, solucionar un problema, realitzar un còmput, processar dades i dur a terme altres tasques o activitats.

**Anticossos:** Proteïna sintetitzada per les cèl·lules plasmàtiques en resposta a l'estimulació exercida per un antigen, amb el qual interacciona de forma específica.

**anti-HER2:** Que frena les reaccions canceroses del HER2. L'HER2 és aquell que presenta resultats positius en la prova de detecció d'una proteïna denominada receptor del factor de creixement epidèrmic 2, que afavoreix el creixement de les cèl·lules canceroses.

**Antimitòtic:** Tipus de medicament que bloqueja el creixement cel·lular en impedir la mitosi (divisió cel·lular). Els antimitòtics s'usen per a tractar el càncer.

**Aptàmers:** Àcids nucleics de cadena senzilla, aïllats de conjunts de gens de oligonucleòtids per selecció *in vitro*, mitjançant enriquiment exponencial en presència del lligant, denominats anticossos químics.

**Autoensamblatge:** L'autoensamblatge molecular és el fenomen d'organització de diverses molècules per a adquirir una distribució espacial no aleatòria entre elles mitjançant interaccions no covalents.

**Bactericida:** Efecte que produeix la mort a un bacteri i està provocat per alguna substància secretada pels organismes com a mitjans defensius contra els bacteris.

**Bulb olfactori:** Estructura nerviosa del nas implicada en la percepció d'olors.

**Cèl·lules diana:** Cèl·lula en la qual una hormona s'uneix al seu receptor, s'hagi determinat o no una resposta bioquímica o fisiològica.

**Cirurgia periodontal:** Tractament necessari en molts pacients que sofreixen periodontitis, la fase crònica de la malaltia de les genives.

**Covalentment:** Un enllaç covalent entre dos àtoms es produeix quan aquests àtoms s'uneixen per compartiment d'electrons, per a aconseguir l'octet estable, compartint electrons de l'últim nivell.

**DAPI:** Marcador fluorescent que s'uneix a regions enriquides en adenina i timina en seqüències d'ADN. És utilitzat en la microscòpia de fluorescència, ja que s'utilitza per a tenyir cèl·lules.

**Doxorrubicina:** Fàrmac àmpliament utilitzat en la quimioteràpia del càncer. És un antibiòtic que s'administra mitjançant injecció.

**Efecte EPR:** *“Enhanced permeability and retention effect”*. Concepte que ens mostra quines molècules (liposomes, nanopartícules i drogues macromoleculars) tendeixen per acumular-se al teixit tumoral amb un major percentatge que al que s'emmagatzemen al teixit normal.

**Electroestàticament:** De manera electrostàtica. L'electrostàtica és la branca de la física que analitza els efectes mutus que es produeixen entre els cossos com a conseqüència de les seves càrregues elèctriques.

**Emulsió:** Mescla de dos líquids immiscibles de manera més o menys homogènia. Un líquid és dispersat en un altre.

**Endodòncies:** Tipus de tractament que es realitza en odontologia. Consisteix en l'extirpació de la polpa dental i el posterior farcit i segellat de la cavitat pulpar amb un material inert.

**Enllaços iònics:** L'enllaç iònic és un dels tres tipus d'enllaç químic habituals. Correspon a la unió d'ions de signe oposat per atracció electrostàtica i sempre ve format per un metall (catió) i un no-metall (anió).

**Fibrosi intersticial:** Grup de trastorns pulmonars en els quals els teixits pulmonars resulten inflamats i després danyats.

**Fol·licles capil·lars:** Part de la pell que dona creixement al cabell en concentrar cèl·lules mare, formant-se a partir d'una invaginació tubular.

**Forces de Van der Waals:** Forces atractives i/o repulsives febles entre molècules diferents a aquelles degudes a un enllaç intermolecular o a la interacció electrostàtica d'ions amb molècules neutres.

**Fosfolípids:** Lípid complex que conté àcid fosfòric i és constituent de les membranes cel·lulars.

**Geckos:** Petits llangardaixos ràpids i àgils caracteritzats per tenir ulls i peus relativament grans, en particular els dits dels peus. Es distribueixen en totes les zones càlides del món.

**Heterogeneïtat:** Cosa heterogènia, és a dir, que els elements que ho componen són diferenciabls entre si i formen, al seu torn, part del mateix conjunt, mescla o grup.

**Hidrofílic:** Substància que té afinitat per l'aigua. En una solució o col·loide, les molècules hidròfiles no es poden barrejar amb lípids o greixos.

**Hidrofòbic:** Terme aplicat a aquelles substàncies que són repel·lides per l'aigua o que no es poden barrejar amb ella. Un exemple de substàncies hidròfobes són els olis.

**Hipertèrmia:** Procediment per al tractament del càncer mitjançant el qual s'exposa el teixit corporal a temperatures extremes per a danyar i eliminar les cèl·lules canceroses o tornar-les més sensibles a l'efecte de la radiació i alguns medicaments contra el càncer.

**Indústria automotriu:** Conjunt de companyies i organitzacions relacionades en les àrees de disseny, desenvolupament, manufactura, màrqueting i vendes d'automòbils.

**Inflamogènic:** Inflamació dels gens capaç de portar una nanopartícula a la seva biodegradació.

**In vitro:** Tècnica per a realitzar un determinat experiment en un tub d'assaig, o generalment en un ambient controlat fora d'un organisme viu. La fecundació *in vitro* és un exemple àmpliament conegut.

**In vivo:** Experimentació feta dins o en el teixit viu d'un organisme viu, per oposició a un parcial o mort. Proves amb animals i els assajos clínics són formes de recerca *in vivo*.

**Liposolubles:** Que és soluble en greixos o olis.

**Lligands:** És un ió o molècula que s'uneix a un àtom de metall central per a formar un complex de coordinació.

**mAb 2C5:** Anticòs monoclonal, produït per un únic clon de limfòcits B reconegut per la cèl·lula tumoral.

**Melanoma:** Tipus més greu de càncer de pell que es forma en les cèl·lules (melanòcits) que produeixen melanina, el pigment que li dóna color a la pell.

**Melsa:** Òrgan de l'abdomen, la funció del qual és la destrucció d'eritròcits vells i servir de reservori de sang.

**Micel·les:** Es denomina micel·la al conjunt de molècules que constitueix una de les fases dels col·loides. És el mecanisme pel qual el sabó solubilitza les molècules insolubles en aigua, com els greixos.

**Molècules polars:** Molècules neutres amb separació de càrregues neta.

**Multivalents:** Que té el poder de combinar-se amb més de dos àtoms univalents.

**Nacre:** Substància dura, blanca, iridescent, que forma la capa interior de certes conquilles, usada en la fabricació de botons i d'altres articles.

**Nanohidroxiapatita:** Versió modificada reduïda de la hidroxiapatita, que s'adhereix de manera natural en les dents, penetrant en els túbuls dentaris, reduint la sensibilitat, al mateix temps que remineralitzen i reparen qualsevol defecte de l'esmalt.

**O.S. Navy:** Armada o Marina dels Estats Units.

**Paclitaxel:** Fàrmac utilitzat per al tractament del càncer. Presenta bons resultats més concretament amb càncer de pulmó, ovari, mama i formes avançades del sarcoma de Kaposi. Es ven amb el nom comercial de Taxol.

**Plantes biòniques:** Plantes modificades de manera que s'incorporen nanotubs de carboni als seus cloroplasts, millorant així alguns dels paràmetres de la fotosíntesi.

**Polidispersitat:** La polidispersitat indica, matemàticament el grau de variació, o amplitud d'una campana gaussiana que representa els pesos moleculars d'un polímer.

**Polietilenglicol:** Polièter àmpliament emprat en la indústria que procedeix de la interacció d'òxid d'etilè amb aigua. La seva estructura química pot representar-se com  $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ .

**Potencial catalític:** Poder d'accelerar o retardar una reacció química sense participar en ella.

**Propietats farmacocinètiques:** La farmacocinètica és la branca de la farmacologia que estudia els processos als quals un fàrmac és sotmès a través del seu pas per l'organisme. Intenta comprendre què succeeix amb un fàrmac des del moment en el qual és administrat fins a la seva total eliminació del cos.

**Proteïna nucleolina:** Proteïna codificada en humans pel gen NCL que està implicada en la síntesi i maduració dels ribosomes.



**PSMA:** Glutamat carboxipeptidasa II. Proteïna.

**Punts quàntics:** Partícula de material semiconductor de dimensions de només diversos nanòmetres on els electrons de la banda de conducció i els forats de la banda de valència, queden confinats i es comporten com si es tractés d'un sol àtom.

**Radicals:** Espècie química (orgànica o inorgànica), caracteritzada per posseir un o més electrons desaparellats.

**Resilina:** La resilina és una proteïna elastomèrica que es troba en molts insectes i altres artròpodes. Proporciona elasticitat de goma suau a òrgans i teixits mecànicament actius.

**Rosada:** Gotes petites d'aigua que es formen per condensació directa del vapor d'aigua sobre els objectes refredats durant la nit.

**Solució tampó:** Són aquelles que davant l'addició d'un àcid o base són capaces de reaccionar oposant la part de component bàsica o àcida per a mantenir fix el pH.

**Tina:** Atuell gran de fang cuit, i a vegades vidre, molt més ampla en la seva part central, encaixada en un peu o cercol o encastada en el sòl, que s'usa per a guardar aigua, oli o altres líquids.

**Zona intersticial:** Zona entre cèl·lules o entre teixits.

An abstract graphic consisting of two flowing, wavy teal lines that create a sense of movement and depth. The lines are layered, with one appearing in front of the other, and they curve around the central text.

# ANNEXOS

## 13. PROTOCOLS DE SÍNTESI. MARC PRÀCTIC

### 13.1. SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES DE PLGA

#### PROTOCOL PLGA

**1.** EPI (Equips de primera intervenció). Són barreres de seguretat primàries: elements que s'interposen entre nosaltres i els productes peril·losos. En el nostre cas són bata i guants.

També hi ha barreres de seguretat secundàries com detectors de gasos, sensors variis... però nosaltres únicament treballarem amb els primaris.

**2.** Preparar tot el material.

#### REACTIUS

Els reactius han de ser el màxim de purs possibles sense soluts que interfereixin

##### ➤ W1

- **Rodamina isotiocianat.** Anàleg de la doxorubicina, el qual és menys tòxic, més fàcil de treballar i fa la funció de colorant. Treballarem amb 10mg/mL.
- **Aigua mil·li-Q.** Aigua molt pura, que ha estat filtrada i purificada per osmosi inversa per a treballar a laboratoris. Aquesta passa per un filtre 0'2µm.

##### ➤ Fase O

- **SPAN-80.** Surfactant amb el qual treballarem amb una concentració 4% volum volum.
- **PLGA.** Polímer amb el qual treballarem amb proporció 50:50.
- **Diclorometà.**

➤ W2

- ⦿ **PVA.** 4% massa volum.
- ⦿ **NaCl.** 2M.

## RENTATS

- ▣ **Aigua mil·li-Q.**
- ▣ **PBS.** Solució tampó: Tampó fosfat salí. Es tracta d'un àcid o base feble amb el seu conjugat (reacció reversible) que serveix per compensar variacions de pH, mantenir l'equilibri químic i estabilitzar.

*Per què rentem?* La rodamina és un colorant vermell; amb el rentat aconseguim reduir la intensitat del vermell fins a un rosa claret que no molesta a l'hora de mirar pel microscopi.

Per dur a terme el rentat, centrifuguem.

## APARELLS

- ▣ **Sonicador.** Sonicar és l'acte d'aplicació de l'energia del so (generalment ultrasons) per a agitar les partícules d'una mostra. Hi ha sonicadors de 2 tipus: agulla i amb bany.
- ▣ **Agitador magnètic.** Consisteix en una petita barra magnètica (anomenada barra d'agitació) la qual està normalment coberta per una capa de plàstic i una placa davall, de la qual es té un magnet rotatori o una sèrie d'electromagnets disposats en forma circular a fi de crear un camp magnètic rotatori.
- ▣ **Centrífugues.** Fan ús de la força centrífuga que es genera en els moviments de rotació, per tal de separar els elements constituents d'una mescla.

## MATERIAL

Poden ser fungibles (1 sol ús) o inventariables (els que s'acostumen a fer servir).

- Vials de vidre (tubs d'assaig amb tap de rosca i cul pla).
- Vasos de precipitació de 100mL.
- Gel. El sonicador és tan energètic que escalfa la mostra. El PLGA es fon i perd l'estructura a uns 55 graus i per tant volem el gel per evitar-ho.
- Tubs de centrifuga per aguantar la pressió d'aquesta.
- Tub eppendorf.

## PAS PER PAS

### PRIMERA PART: PREPARACIÓ

- **W1.** Per començar, hem de fer dos controls per estudiar com és el sistema amb el qual treballarem sense la variable. L'objectiu és distingir allò que volem estudiar d'allò que ja contenia la cèl·lula. Per tant, hem de mirar exactament el mateix sistema sense el compost fluorescent.

Primer control. Mirar cèl·lules sense res.

Segon control. Mirar cèl·lules amb nanopartícules sense rodamina.

Quan nosaltres sintetitzem les nanopartícules de rodamina, en farem dues: unes amb rodamina encapsulada i les altres amb aigua; obtenint d'aquesta manera unes nanopartícules fluorescents i unes que no ho són. D'aquesta manera ens assegurem que no hi ha cap compost del sistema que anul·li la rodamina en algun punt.

Per tant, amb aquest doble control ens assegurem de:

1. Que no hi ha res fluorescent a la cèl·lula.
2. No hi ha res fluorescent a la càpsula.

En el cas que trobéssim fluorescència a la cèl·lula, hauríem de mirar la intensitat de fluorescència hi ha a la cèl·lula sola, i quina hi ha amb nanopartícules.

La rodamina la tenim guardada a 10mg/mL, dissolta en aigua mil·li-Q. Volem treballar amb una concentració final de 1mg/mL i per tant farem dilució 1:10 amb aigua: posarem 90µm d'aigua i 10µm de rodamina i ens quedaran llavors 100 µm a 1mg/mL.

Per fer la síntesi necessitem 75µm de rodamina 1mg/mL i ho prepararem en tubs d'eppendorf.

- **Fase Orgànica.** En un vial de vidre, posarem 750µm de diclorometà. A més a més, li posarem 25mg de PLGA i 30µm d'SPAN-80.

Tot seguit, posarem una mosca magnètica petita (imant) i ho deixarem agitant.

- **W2.** Utilitzarem 9,4mL per síntesi i per tant, com farem dues síntesis, necessitem 18,8mL. Com volem que ens sobri una mica, treballarem amb 20mL.

Barrejarem 10mL PVA 4% i 10mL del NaCl 2M. En tubs de vidre més grans posarem 9,4mL de la mescla.

Un cop tenim totes les fases preparades, comencem la síntesi de les nanopartícules.

## SEGONA PART: SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES

L'ordre de la síntesi de les nanopartícules sempre serà:

**Pas 1.** Control: 75µm d'aigua mil·li-Q.

**Pas 2.** Rodamina: 75µm.

Com s'enganxa bastant, i fent servir rodamina, el material podria quedar tenyit, primer fem la nanopartícula de rodamina i després el control, ja que hi ha la possibilitat que una mica de rodamina acabi al control. Però d'aquesta manera, el pas del control a la mostra, com que és exactament el mateix, no exigeix una neteja tan estricta.

1. Hem de tenir en compte que a la fase orgànica la mostra s'està agitant, i hem de treure l'imatge. Tot seguit, barregem W1 amb la Fase Orgànica i soniquem 90 segons a 25% d'amplitud.
2. Aquesta mescla, la qual rep el nom de W1/O, l'aboquem a sobre de W2 i tornem a sonicar a 90 segons 25% d'amplitud.
3. Un cop tenim el resultat final, al mateix pot afegim l'agitador magnètic i deixem evaporar el diclorometà durant 3 o 4 hores.
4. Rentats. Bàsicament s'afegeix tot el contingut en una màquina centrífuga i es fan 3 rentats durant 1 hora cadascú a 30.000G: vol dir centrifugar a una velocitat que simuli una gravetat 30.000 vegades superior a la de la Terra.

Per tant, es duen a terme 3 rentats que impliquen 4 centrifugacions.

**Rentats:** Eliminem el líquid aplicant gravetat i fent que les nanopartícules precipitin soles quedant d'aquesta manera les nanopartícules a sota i el líquid a sobre.

**Primera centrifugació:** Encara no és el primer rentat, és una precipitació on baixem les nanopartícules i eliminem el líquid sobrant que conté PVA, NaCl i la rodamina que no s'ha encapsulat.

**Primer rentat:** Afegim 10mL de PBS i ho agitem amb agitació mecànica (si no és suficient, fem servir un sonicador amb bany: ultrasons a l'aigua que individualitzen agregats i separen coses unides per forces febles). Per tant, posem un líquid nou, homogeneïtzem i tornem a dispersar les nanopartícules.



Aquests rentats els reproduïrem 3 vegades: redispersarem, posarem els 10mL, dispersarem i centrifugarem, retirarem el líquid sobrant, tornarem a posar 10mL, agitarem i finalment, tornarem a centrifugar. Tot això fins que a resuspendre tot en 1mL de PBS i ho aconseguir una màxima concentració.

A l'últim rentat, afegim 1mL de PBS, tornem a homogeneïtzar la solució i dispersem les nanopartícules i fins a obtenir el material amb el qual treballarem.

## PARÀMETRES

Eficiència d'encapsulació → % rodamina encapsulada.

Per saber-ho, guardem els 25µm que no agafem i el líquid descartat precipitat de la primera centrifugació que queda al primer rentat. Aleshores, mirem la intensitat de fluorescència d'un i de l'altre al fluorímetre: mirem el %.

## 13.2. SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES D'EUDRAGIT L-100 55

L'Eudragit L-100 55 és un polímer que bàsicament té una part hidrofòbica i una part àcida. Els grups àcids tenen la tendència de protonar-se o desprotonar-se en funció del pH.

Quan tu tens aquest polímer en un medi bàsic aquest és soluble perquè tots els seus grups àcids estan desprotonats i per tant, les càrregues negatives fan que siguin més soluble. Però quan el tens en medi àcid, aquest polímer és insoluble perquè les càrregues de l'àcid es protonen i llavors pot fer ponts d'hidrogen amb els surfactants que li posem.

Per tant, la idea que hem d'extreure d'això és, que amb els canvis de pH, canvien les propietats químiques del polímer que el fan soluble o insoluble.

### MÈTODE

Fem servir una precipitació, és a dir, canviem el pH. Si precipitem el polímer, farà agregats grans d'1mm o 2mm que es poden veure a simple vista; per tant el que fem és afegir amb una bomba d'injecció (xeringa) el líquid a poc a poc, aconseguint un procés lent de canvi de solubilitat que permet que el polímer precipiti amb certes molècules del seu voltant. Per tant, no fa un agregat, fa coses més petites.

Llavors, aquest polímer es pot controlar fent aquest canvi de pH. En el cas de l'Eudragit, canviem de pH 8 (totalment soluble) a pH 2 (totalment insoluble).

Perquè aquest polímer faci les nanopartícules que volem aconseguir sense agregats, farem dos controls:

1. Control del temps.
2. Afegir un surfactant. Dóna els grups OH per fer els ponts d'hidrogen.

Aleshores utilitzem dues substàncies: surfactant (polivinil alcohol) i Eudragit.

El que fem en aquest cas és un hidrogel. Bàsicament tota la nanopartícula té un 90% d'aigua dintre. Es formen miniporus que poden deixar sortir substàncies de mida petita com la rodamina i per tant, no hi ha res que assegurí que s'encapsularà correctament.

## MATERIAL

- Bomba d'injecció.
- Agitador multiplaca o magnètic.
- Xeringues de 10 mL.
- Agulles llargues.
- Bomba per empènyer lentament la xeringa.
- Tires de pH.
- Mosques magnètiques.
- Pipetes.
- Tubs de 20 mL.
- Sonicador amb bany d'ultrasons.

## AVANTATGE

- No utilitzem cap solvent orgànic, els quals no són fàcils de treballar amb proteïnes.
- Fem servir 2 medis aquosos que fan que hi hagi certa protecció de l'activitat de les proteïnes.

Per fer les nanopartícules amb algun element dintre, ho fem amb una xeringa, ja que si no, es fan microbombolles pel fet que si juntes dos medis, aquests necessiten un temps perquè es solubilitzin. Si no es fa lentament no se solubilitzen i es fan aquestes bombolles.

- Afegirem 1mL de rodamina en els 5mL d'Eudragit.

## RENTATS

Com són tan solubles, no es poden centrifugar com fem amb les de PLGA, i per tant les treballem amb **amicons**.

Els amicons són uns filtres que funcionen com una centrífuga on el líquid passa amb les coses més petites de mida de porus, mentre que les que són més grans es queden a dalt. Amb aquesta mida de porus, separem coses grans de l'aigua però que no són prou solubles com per a precipitar com les sals, el PVA i la rodamina no encapsulada.

Van molt ràpidament i el funcionament es basa en posar líquid al filtre i utilitzar el que té la màxima mida de porus: 100 kDa.