

NANOBIOTECNOLOGIA: ALLIBERAMENT DE FÀRMACS, OBTENCIÓ D'IMATGES I DISSENY DE NANOBIOSENSORS AMB NANOMATERIALS

ARBEN MERKOÇI

*Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Grup de Nanobioelectrònica i Biosensors,
Institut Català de Nanotecnologia, Departament de Química,
Universitat Autònoma de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Arben Merkoçi. ICREA i Grup de Nanobioelectrònica i Biosensors, Institut Català de Nanotecnologia, Departament de Química, UAB. 08193 Bellaterra. Adreça electrònica: *arben.merkoci.icn@uab.es*.

RESUM

Es presenta una introducció sobre la nanobiotecnologia com una dels parts principals de la nanotecnologia. Tres són els camps més importants de la nanobiotecnologia actual: *a)* alliberament controlat de fàrmacs, *b)* l'ús de nanopàrticules per a l'obtenció d'imatges de cèl·lules i *c)* els nanobiosensors. Es descriu breument cadascun d'aquests camps i es fa una revisió d'algunes publicacions rellevants, incloent-hi, en el cas dels nanobiosensors, exemples del nostre grup d'investigació.

Tals aplicacions, resultat de la difusió entre nanotecnologia i biotecnologia, demostren la importància de la nanobiotecnologia en el camp de la salut humana, entre altres camps d'interès.

Paraules clau: nanobiotecnologia, nanopàrtícula, alliberament controlat de fàrmacs, imatges de cèl·lules, nanobiosensors.

NANOBIOTECHNOLOGY: DRUG DELIVERY, IMAGING AND DESIGN OF NANOBIOSENSORS USING NANOMATERIALS

SUMMARY

An introduction of the nanobiotecnology as one of the principles parts of the nanotechnology. Three are the most important fields of the current nanobiotecnology: i) controlled delivery of drugs, ii) use of nanoparticles for the obtaining of images and iii) nanobiosensors. Each of these fields is described and a revision of some relevant publications, including examples of the group of research itself, in the case of the nanobiosensors, is done.

Such applications, results of the diffusion among nanotechnology and biotechnology, demonstrate the importance of nanobiotechnology in the field of the human health among other fields.

Key words: nanobiotechnology, nanoparticles, drug delivery, cell imaging, nanobiosensors.

INTRODUCCIÓ

La nanotecnologia i la nanobiotecnologia: què representen?

La nanotecnologia és la ciència i al mateix temps l'enginyeria i la tecnologia de fabricació de sistemes dimensionats d'escala nanomètrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). La nanotecnologia du a terme diverses tasques específiques, que poden ser de caràcter elèctric, mecànic, biològic, químic o fins i tot de computació. La nanotecnologia se centra en la manipulació de la matèria a una escala molecular i atòmica.

Les nanoestructures, els nanoaparells i els nanosistemes exhibeixen propietats i funcions noves com a resultat de la seva mida reduïda, normalment en el rang d'1 a 100 nm. Aquest és un fenomen nou que estudia la nanociència fent servir la nanotecnologia.

D'una banda, la nanotecnologia es considera la tecnologia de construcció de na-

noestructures des de baix a dalt amb una precisió d'escala molecular i atòmica. D'altra banda, representa també la creació, utilització o manipulació (de dalt a baix) de materials, aparells i sistemes mitjançant el control dels materials a escala nanomètrica amb diverses tècniques de nanocaracterització i fabricació.

Ateses les funcions inherents a escala nanomètrica dels components biològics de les cèl·lules, era inevitable que la nanotecnologia s'apliqués a les ciències de vida. Tals aplicacions, resultat de la difusió entre nanotecnologia i biotecnologia, han creat una nova tecnologia: la nanobiotecnologia. La nanobiotecnologia és l'aplicació de la nanotecnologia a les ciències de vida o, amb altres paraules, l'aplicació d'eines de dimensions reduïdes (d'escala nanomètrica) als sistemes biològics. Addicionalment, la nanobiotecnologia utilitza els sistemes biològics com a plantilles per al desenvolupament de productes nous a escala nanomètrica.

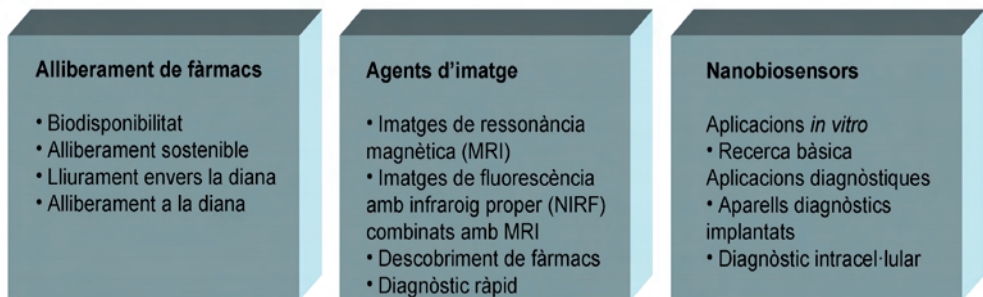


FIGURA 1. Presentació esquemàtica dels segments principals de la nanobiotecnologia incloent-hi els aspectes més importants per a cada segment.

Quins són els objectius de la nanobiotecnologia?

La demanda de més tecnologies avançades i innovacions en nanomaterials ha creat tres segments essencials dins de la nanobiotecnologia actual: l'alliberament de fàrmacs, l'obtenció d'imatges, i els nanobiosensors.

A continuació s'expliquen breument aquests tres segments (vegeu la figura 1) que representen els camps més importants on s'està enfocant recentment la nanobiotecnologia: l'alliberament controlat de fàrmacs, l'ús de nanopartícules per a obtenció d'imatges de cèl·lules i els nanobiosensors.

ALLIBERAMENT DE FÀRMACS

La nanobiotecnologia està tenint un impacte no solament en el camp de la diagnòsi, sinó també en el d'alliberament dels fàrmacs. L'anàlisi de les transduccions de senyals (canvis de senyals durant els processos biològics) amb tècniques nanobiotecnològiques podria proporcionar idees noves sobre els processos d'una malaltia, i permetria identificar biomarcadors nous, més eficaços, i entendre els mecanismes d'acció dels fàrmacs; a més, ajudaria a dissenyar-ne de nous.

L'objectiu essencial en l'alliberament del fàrmac és repartir-lo eficaçment en el seu objectiu biològic (diana) sense provocar efectes secundaris nocius. Aquest alliberament controlat dels fàrmacs, en principi, minimitzaria la toxicitat causada per l'excés dels fàrmacs, i repartiria una dosi eficaç del fàrmac cap al lloc on cal. L'alliberament controlat exigeix la conjugació química de fàrmacs o dels transportadors del fàrmac amb la diana (o amb una part seva) que ho necessita. Els sistemes d'alliberament de fàrmacs (DDS, de l'anglès *drug delivery systems*) poden millorar les propietats far-

macològiques dels fàrmacs convencionals canviant-ne la farmacocinètica i la biodistribució, i també funcionen com a reservoris dels fàrmacs.

Els DDS actuals són eficaços per dur a terme l'alliberament dels fàrmacs d'una manera controlada, però al mateix temps produeixen una concentració local del fàrmac relativament alta, que està dirigida a tot el teixit i no solament a les cèl·lules que ho necessiten. En canvi, les nanopartícules, per tal com són més petites, tindrien una càrrega de fàrmac més baixa i, a més, a causa de la seva mida, podrien travessar la membrana cel·lular i portar el fàrmac al destí. Aquests nous DDS basats en la nanotecnologia (nanoDDS) tenen diàmetres de ~100 nm o menys. Els nanoDDS inclouen liposomes, dendrímers, micelles i nanopartícules polimèriques i ceràmiques, i s'estan estudiant àmpliament per a l'alliberament de diversos fàrmacs en objectius cel·lulars. A part de la capacitat de ser utilitzats com a portadors de fàrmacs, els DDS han de tenir la capacitat de poder dirigir-se a l'objectiu (diana) que ho necessita. És per això que a aquests materials s'ha d'afegir una «marca» específica que farà de guia per fer-los arribar al destí.

La figura 2a descriu el trànsit intracel·lular típic per a les nanopartícules i altres sistemes de transport de medicaments basats en col·loides (Vasir *et al.*, 2007), mentre que la 2b esquematitza l'alliberament dirigit d'un fàrmac dins de les cèl·lules de melanoma metastatitzades (Rezler *et al.*, 2007).

Un altre exemple és l'ús de nanopartícules per a l'alliberament de fàrmacs en el camp d'aplicacions oftàlmiques. Les nanopartícules, en forma de solució col·loïdal, es poden subministrar o aplicar a l'ull en forma de gota, igual com es fa amb altres medicaments. La biodisponibilitat ocular de molts fàrmacs augmenta significativament quan aquest està connectat amb les nanopartícules en comparació de l'ús del mateix

fàrmac en forma de solució aquosa normal de gotes (Reshetnikov *et al.*, 2007).

La figura 3 demostra el cas d'un *vehicle* d'alliberament del fàrmac que és sensitiu

a l'acidesa. Es tracta de les nanopartícules de policetal, que estan dissenyades per ser alliberades just quan arriben al medi àcid al voltant d'un tumor (Heffernan *et al.*, 2005).

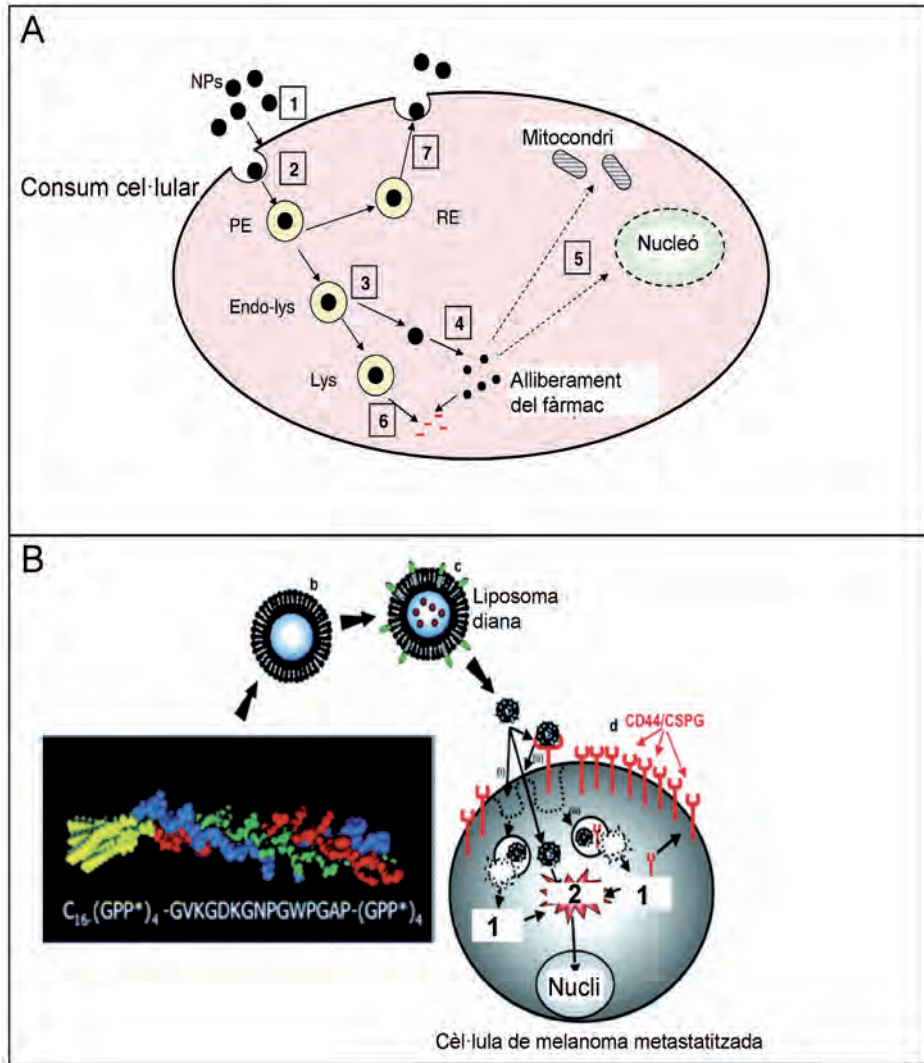


FIGURA 2. *a*) Representació esquemàtica d'alliberament de fàrmacs (escala no real) amb nanopartícules. 1) associació cel·lular dels NP, 2) internacionalització de NP dins les cèl·lules mitjançant l'endocitosi, 3) escapada endosòmica de NP, 4) alliberament del fàrmac dins el citoplasma, 5) transport citosòlic de l'agent terapèutic, 6) degradació del fàrmac a lisosoma o citoplasma, 7) exocitosi de NP. PE: endosoma primari; RE: endosoma reciclant; Endo-lys: endolisosomes; Lys: lisosoma. *b*) Representació esquemàtica del cas d'alliberament dirigit dins les cèl·lules de melanoma metastatitzades: 1) degradació i escapada endosòmica, 2) alliberament del fàrmac. En els dos casos es mostra com les nanopartícules (carregades amb un fàrmac adequat) penetren dins de la cèl·lula i es dirigeixen cap a la diana, on alliberen el fàrmac (Vasir *et al.*, 2007; Rezler *et al.*, 2007).

Aquest sistema d'alliberament en principi podria tenir aplicacions nombroses, ja que la síntesi d'aquests productes és relativament fàcil i, a més, presenten propietats de degradació excel·lents.

Un altre sistema alternatiu d'alliberament que ha emergit com a alternativa a les nanopartícules són els nanotubs de carboni d'una sola paret (SWCNT, de l'anglès *single walled carbon nanotubes*). Els SWCNT representen un nou nanovehicul altament eficaç per a l'alliberament d'espècies de mides i propietats diverses a la membrana cel·lular. Els SWCNT poden ser utilitzats per alliberar molècules més petites a les cèl·lules que en necessiten (Bottini *et al.*, 2006; Nakayama-Ratchford *et al.*, 2007)

OBTENCIÓ D'IMATGES MITJANÇANT NANOPARTÍCULES

Es preveu que la nanobiotecnologia proporcioni recursos nous per a la millora de la diagnòsi i el tractament de les malalties. Els avenços en les tècniques de síntesi d'una varietat de nanomaterials ha fet que augmenti l'interès per l'ús de nanopartícules

com a eines noves d'obtenció d'imatges per a una sèrie d'aplicacions biomèdiques *in vivo* (Rosi *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2005). Els exemples típics inclouen nanopartícules magnètiques com a agents de contrast de la ressonància magnètica (Kim *et al.*, 2003; Martina *et al.*, 2005), punts quàntics (QD, de l'anglès *quantum dots*) (Gao *et al.*, 2004) i nanopartícules d'or (AuNP) (Loo *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006) com a sondes per a l'obtenció d'imatges òptiques. Les propietats físiques noves dels nanomaterials, com el superparamagnetisme, la fluorescència altament intensa, i la ressonància de plasmons de superfície, els donen avantatges sobre els materials convencionals moleculars utilitzats fins ara.

Els punts quàntics semiconductors (QD) estan reemplaçant lentament els fluoròfors moleculars com a agents de contrast òptic gràcies a la seva intensitat i estabilitat espectral significativament millorades (Bruchez *et al.*, 1998). La investigació duta a terme fins ara en el camp de les aplicacions biològiques ha mostrat que una gran part de les tècniques, incloent-hi les que utilitzen l'emissió en la gamma de l'infraroig proper (NIR), es poden fer servir amb nanopartícules

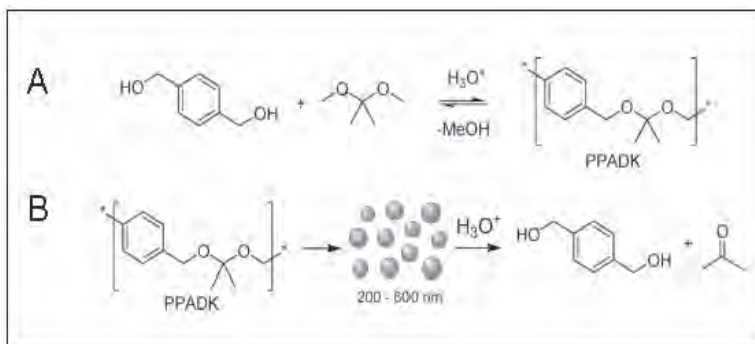


FIGURA 3. Síntesi del policetal (poli(1,4-fenileneacetona dimetilè), PPADK), mitjançant la reacció d'intercanvi d'acetal. a) polimerització per etapes basada en la reacció d'intercanvi d'acetal entre 1,4-benzidimetanol i 2,2-dimetoxipropà per produir PPADK; b) formació de nanopartícules carregades amb el fàrmac amb el mètode d'evaporació del solvent. Les partícules exhibeixen una degradació que depèn del pH i es degraden a altres espècies de pes molecular baix (Heffernan *et al.*, 2005).

cules. Les aplicacions biològiques dels QD inclouen el marcatge dels tumors *in vitro* i *in vivo*, l'observació *in vivo* de la circulació de les cèl·lules a llarg termini i l'estudi dels fenòmens intracel·lulars amb una resolució molecular. La raó principal de la versatilitat dels QD es basa en la seva química de superfície en la fase aquosa rica, que fa possible la incorporació d'un ampli espectre de biomolècules (proteïnes, pèptids, DNA, etc.) dissenyades per dur a terme una funció específica dins d'una cèl·lula.

Últimament s'ha informat per primera vegada de l'obtenció d'imatges simultànies *in vivo* de cinc fluxos limfàtics diferents i la

seva circulació cap a nòduls limfàtics determinats (Kobayashi *et al.*, 2007). S'utilitzen cinc QD compostos de seleniür de cadmi (CdSe) de mides diverses (amb pics d'emissió de 565, 605 i 655 nm) o tellurur de cadmi (CdTe, amb emissió de llum a 705 i 800 nm). Es fa una injecció intercutània simultània dels cinc QD (tres de CdSe i dos de CdTe) en cinc llocs diferents en les falangines, l'extremitat superior, les orelles i la barbeta, per controlar els drenatges limfàtics al coll i al tronc superior, on hi ha les xarxes limfàtiques més complexes del cos (vegeu la figura 4).

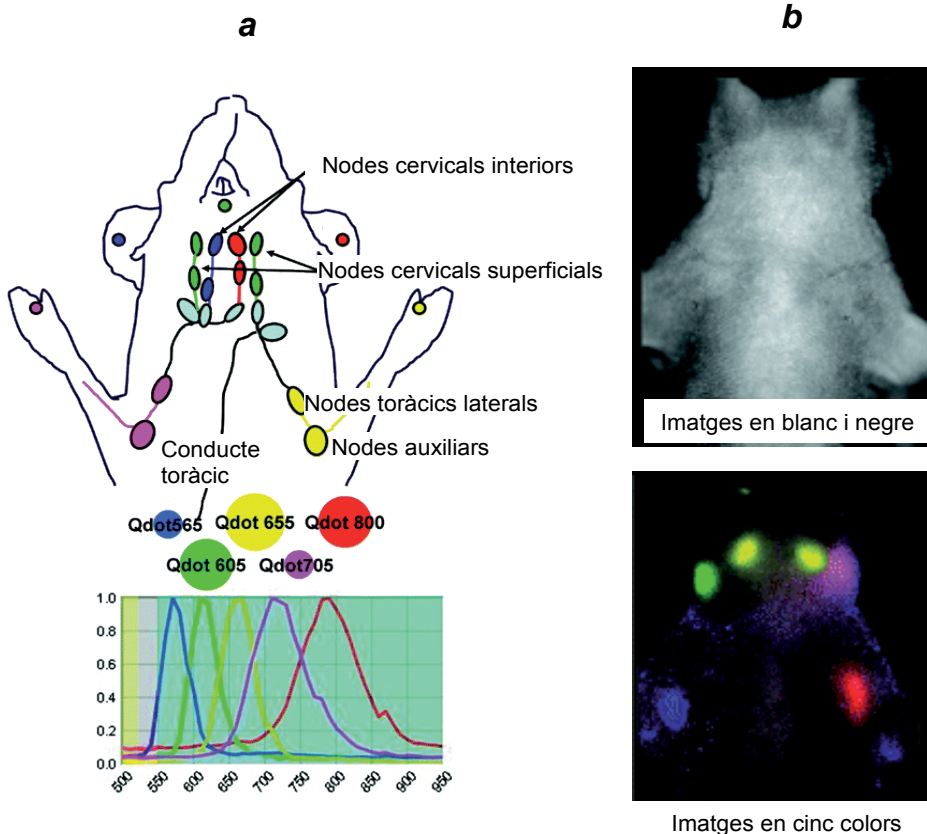


FIGURA 4. *a*) Anatomia del sistema limfàtic de la part alta del cos del ratolí amb una il·lustració esquemàtica de les imatges de fluorescència amb cinc colors diferents i un gràfic dels espectres d'emissió de cada un dels cinc QD utilitzats (QD 565, blau; QD 605, verd; QD 655, groc; QD 705, magenta; QD 800, vermell). Els nòduls limfàtics pintats són els nòduls limfàtics que drenen i que es visualitzen en aquest estudi. *b*) Imatge *in vivo* amb cinc colors del drenatge limfàtic (Kobayashi *et al.*, 2007).

NANOBIOSENSORS

Actualment hi ha un ús creixent dels nanomaterials per a aplicacions en biosensors. Malgrat l'esforç, no hi ha encara cap biosensor que sigui produït totalment en l'escala nanomètrica. Un objectiu principal de la nanobiotecnologia a llarg termini és la creació d'aparells que es puguin utilitzar dins del cos d'un pacient per realitzar tasques de diagnosi. El punt crucial d'aquest objectiu és la integració en nanoescala de l'esdeveniment de detecció —dit també *reconeixement (bio)químic*— amb l'element responsable de la transducció de senyal electrònic. El procés d'integració, que inclou també la transmissió del senyal i la font d'energia necessària per al funcionament del biosensor, serà costós i arriscat, ja que no es poden garantir totalment ni la funció ni l'adaptació de la tecnologia.

A continuació es mostren alguns casos d'aplicació de nanopartícules per dur a terme l'anàlisi de DNA com a exemples d'una integració parcial: detecció-senyal.

Anàlisi de DNA i els genosensors

L'evolució ràpida del Projecte Genoma Humà ha fomentat el desenvolupament de

diversos mètodes analítics per a la detecció de mutacions i per entendre altres problemes complexos de la biologia molecular. Les tecnologies relacionades amb el DNA s'estan convertint en plataformes capdavanteres per descobrir i desenvolupar nous assaigs diagnòstics. Aquests assaigs estan emergint com a eines d'una importància especial per determinar els tipus de tractament que han de prescriure els metges als pacients.

L'anàlisi de DNA o, en altres paraules, detectar la seqüència de les bases que el constitueixen, és el fonament de la investigació genètica. Aquesta classe d'anàlisi normalment exigeix temps i esforços considerables per part dels especialistes. Fins i tot la quantitat més petita de DNA extreta de cèl·lules està formada per uns quants milions de bases, que no es poden llegir directament. Primer el DNA s'ha de dividir en fragments d'uns quants centenars de parells de bases. Després, s'ha de produir un nombre de còpies d'aquests fragments mitjançant la PCR i, finalment, la informació de l'anàlisi s'ha de processar i descodificar amb un ordinador per completar l'anàlisi. El procés complet exigeix l'ús d'equips relativament sofisticats i cal que es porti a terme en un laboratori especialitzat.

Què es pot fer en el cas en què és necessari un control ràpid (*screening*) per detectar si hi ha present només una seqüència de DNA relativament curta? És possible evitar la PCR

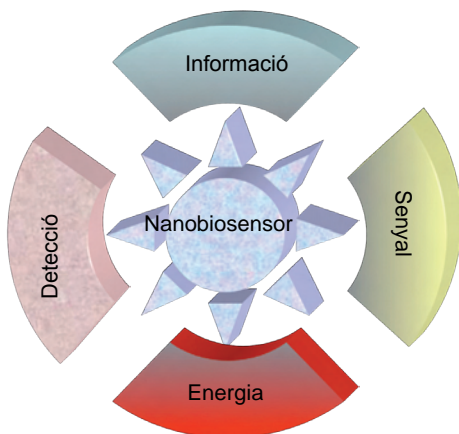


FIGURA 5. Els components principals d'un nanobiosensor totalment integrat en nanoescala. La part de detecció i els reactius relacionats estan totalment integrats a escala nanomètrica. La detecció d'un esdeveniment químic o biològic es converteix en un senyal que es pot propagar cap a l'usuari. La font d'energia que s'ha d'utilitzar per fer nanobiosensors capaços de ser autònoms durant la seva vida en un medi biològic hauria d'estar basada en la bioelectrònica. Les dades de diagnosi s'han de transmetre al pacient o l'especialista per a la interpretació i presa de mesures adequades. Un cop construïts tots els elements d'un nanobiosensor en l'escala nanomètrica, s'han d'integrar en un mateix sistema.

per reduir el temps d'anàlisi i el cost? La resposta la tenim en uns aparells simples anomenats *sensors de DNA* o *genosensors*. L'acoblament de l'esdeveniment d'identificació de l'àcid nucleic amb un transductor òptic o electroquímic condueix a una detecció ràpida de les seqüències de DNA, que és el principi d'un genosensor (vegeu la figura 6, part esquerra). Aquests aparells tindrien un gran interès per ser utilitzats en la detecció ràpida de seqüències de DNA relacionades, per exemple, amb una malaltia infecciosa, un contaminant específic o un ingredient especial d'un aliment, incloent-hi la identificació d'un aliment en particular.

Els sensors electroquímics, entre altres,

estan mostrant un paper creixent en diversos camps en què cal un sistema de mesurament ràpid, acurat i de baix cost. La millora dels sistemes existents i el disseny conceptual de nous sistemes requereixen la millora contínua de tots els components dels sistemes de detecció electroquímica de DNA.

Detecció de DNA basada en nanopartícules

El desenvolupament de sistemes de detecció no isotòpics sensibles ha causat un impacte significatiu en el camp dels sensors de DNA. Els biosensors electroquímics

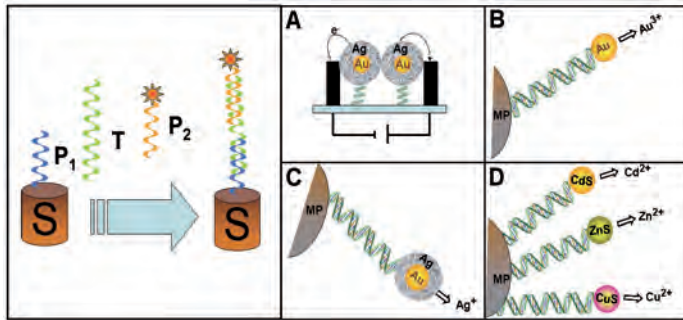


FIGURA 6. Esquerra: Representació esquemàtica d'un sensor de DNA. Una sonda de DNA (P1) s'immobilitza a la superfície d'un transductor (S). El DNA objectiu (diana T) que necessita ser analitzat s'hibrida amb la seqüència de DNA P1, complementària al T, i que està immobilitzada sobre la superfície d'un sensor S. En una segona etapa tindria lloc la segona hibridació d'una altra part de T amb una altra sonda complementària P2, que està connectada amb una marca (label) detectable. Un senyal electroquímic o òptic perceptible (relacionat amb la marca utilitzada) es produeix quan la seqüència per analitzar (T) queda «atrapada» en l'anomenat *sandwich*. Dreta: Estratègies utilitzades per a la detecció de DNA mitjançant l'ús de nanopartícules metàl·liques. Normalment una sonda de DNA està immobilitzada sobre una plataforma de transducció, s'hibrida amb el DNA diana (objectiu) i més endavant aquesta diana s'hibrida amb un altre DNA complementari modificat amb una nanopartícula. a) Assaig basat en mesures de conductivitat: la deposició de plata sobre les nanopartícules d'or (amb hidroquinona com a agent reductor) amb un increment notable del corrent, apareix només quan hi ha present el DNA diana, b) assaig basat en la redissolució electroquímica anòdica de les nanopartícules d'or (utilitzades com a marques de DNA) després de la redissolució química amb la mescla HBr/Br₂, c) igual com b), però les nanopartícules d'or es cobreixen primer amb plata, que és el metall que es detecta després (Wang *et al.*, 2001) i d) multi-etiquetatge mitjançant l'ús de tres nanopartícules diferents (punts quàntics, QD) i la detecció simultània de tres sondes de DNA diana.

d'afinitat, basats en marcatge amb enzims, han resolt els problemes de detecció radioactiva (p. ex., perills per a la salut i temps de vida curts) i han obert noves possibilitats per a la detecció ultrasensible i automatitzada de DNA (Pividori *et al.*, 2000). No obstant això, els biòlegs investiguen com uns altres camps d'aplicació necessiten una gamma més àmplia i fiable de sistemes de marcatge, més robustos, que permetin una bioanàlisi d'alt rendiment i la possibilitat de determinació simultània de diverses biomolècules presents en una mostra. Les tècniques de marcatge existents tenen uns quants desavantatges: els marcadors utilitzats tenen temps de vida curts i un nombre limitat de combinacions, que es poden utilitzar per a l'anàlisi simultània de diversos analits.

El marcatge de materials biològics amb colorants orgànics fluorescents també s'ha emprat àmpliament i s'ha utilitzat en una varietat de sistemes de detecció òptica de DNA. Els fluoròfors orgànics, tanmateix, tenen característiques que limiten la seva eficàcia per a tals aplicacions. Aquestes limitacions inclouen bandes d'excitació estretes i bandes d'emissió amples amb cues espectrals vermelles, que poden ser problemàtiques en l'avaluació simultània d'unes quantes sondes a causa de la superposició espectral. Altres desavantatges de molts colorants orgànics són que no són estables i es degraden sota la llum. Millorar la sensibilitat d'assaig i arribar a una millora i fiabilitat d'anàlisi significa cercar altres alternatives de marcatge.

Les propietats electroquímiques de les nanopartícules (NP) fan que siguin extremadament fàcils de ser detectades utilitzant a més a més una instrumentació simple com l'anomenada *anàlisi de redissolució electroquímica*, que permet el disseny d'assaigs ultrasensibles i detecció simultània.

La detecció d'hibridació de DNA amb mesures conductomètriques després del marcatge amb nanopartícules ha estat de-

mostrada per Park *et al.* (2002). Els autors fan servir la tècnica de deposició de plata i mesuren l'augment de la conductivitat quan es produeix l'amplificació de les nanopartícules d'or (vegeu la figura 6a).

Altres estratègies per a la detecció de DNA es basen en l'ús de NP d'or (AuNP) o en els QD. S'han utilitzat extensament diverses tècniques de redissolució voltamètrica o potenciomètrica basades en elèctrodes de *screen-printed* (Wang *et al.*, 2001) o fins i tot amb elèctrodes construïts amb portamines de carboni (Ozsoz *et al.*, 2003). El senyal electroquímic intrínsec de les AuNP, observat després de dissoldre-les amb HBr/Br₂, es relaciona llavors amb DNA. La mesura s'aconsegueix mitjançant la preconcentració d'ions d'or (+3) després de la reducció electroquímica i la subsegüent determinació amb voltametria de redissolució anòdica (vegeu la figura 6b) (Wang *et al.*, 2001).

Amb l'objectiu de disminuir els límits de detecció, s'ha utilitzat també l'amplificació mitjançant deposició de plata. Això representa una alternativa interessant per a l'obtenció de més sensibilitat en la detecció de DNA (Thaxton *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2001) (vegeu la figura 6c).

El marcatge amb NP fa possible la detecció simultània de més d'una sonda de DNA en una mostra. El nombre de sondes (dianes) que es poden detectar simultàniament és controlat pel nombre de marcadors NP distingibles amb la tècnica voltamètrica. A continuació es descriu un assaig d'hibridació basat en l'ús de tres QD (ZnS, CdS i PbS) (Wang *et al.*, 2003). Les sondes de DNA connectades amb QD representen pics de redissolució ben definits en els potencials: -1,12 V (Zn), -0,68 V (Cd) i -0,53 V (Pb) amb un elèctrode de carboni vitrificat cobert d'una capa de mercuri (amb l'elèctrode de referència d'Ag/AgCl) després de dissoldre les nanopartícules de metall esmentades. (vegeu la figura 6d).

Integració dels components del genosensors

L'ús de NP com a marques electroquímiques per a la detecció de DNA té uns quants avantatges. La tècnica relacionada (voltametria de redissolució) és més barata comparada amb l'òptica, i més ràpida i fàcil de fer servir en l'anàlisi de camp. A més, ofereix la possibilitat de la detecció simultània d'unes quantes molècules biològiques en la mateixa mostra amb un sensor únic, tot això a causa de l'obtenció d'una corba voltamètrica específica produïda per marques electroquímiques diferents. Els avantatges oferts, juntament amb la possibilitat de ser utilitzada en l'anàlisi d'un conjunt de biomolècules, exigeixen el desenvolupament de noves estratègies de detecció de nanopartícules.

Últimament s'ha desenvolupat una tècnica nova de detecció de DNA basada en un genosensor integrat (Pumera *et al.*, 2005). Es basa en la detecció electroquímica directa

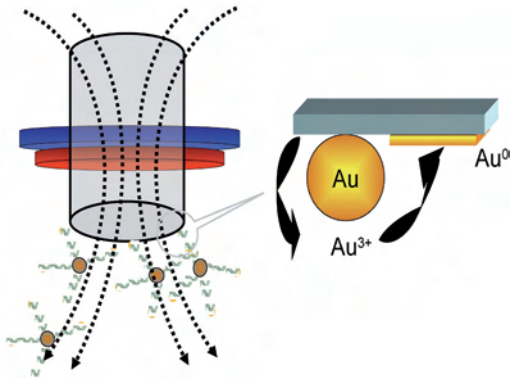


FIGURA 7. Representació esquemàtica del principi d'un nou genosensor basat en l'ús de AuNP. Es fa servir un material electròdic nou que inclou un imant al seu interior. Aquest magnetosensor captura les partícules paramagnètiques amb l'híbrid de DNA connectat amb les AuNP. Després de la captura del conjugat es du a terme la voltametria de polsos diferencial de les AuNP i el senyal obtingut es relaciona amb la quantitat del DNA diana present en la mostra.

de DNA mitjançant la detecció de AuNP utilitzades com a marques. El sistema desenvolupat evita la redissolució àcida prèvia (és a dir, HBr/Br₂). Per aconseguir aquest objectiu es fan servir micropartícules paramagnètiques (MP) modificades amb estrep-tavidina, que es modifiquen amb sondes de DNA amb biotina. Aquesta sonda de DNA (sonda de captura) s'hibrida després amb el DNA marcat amb AuNP (Au67) en una proporció 1:1. El conjugat resultant, MP-DNA-AuNP, és recollit magnèticament mitjançant un magnetosensor (un sensor amb un imant petit integrat al seu interior) (vegeu la figura 7). Els avantatges més destacats d'aquest nou sensor són: *a*) la detecció directa de les AuNP evita l'ús de la redissolució química prèvia i *b*) la connexió 1:1 entre el DNA i les AuNP evita la formació de les xarxes entre les MP i les AuNP, i augmenta així la sensibilitat d'anàlisi.

La integració de la nanotecnologia amb la biologia i l'electroquímica, l'anomenada *nanobioelectrònica*, pot produir avenços importants en el camp dels sensors electroquímics de DNA i dels immunosensors. La recerca sobre l'aplicació dels sistemes citats en mostres reals està en procés de desenvolupament i s'espera que pugui portar noves alternatives i avenços en l'anàlisi del DNA.

CONCLUSIONS

La nanobiotecnologia, com a part de la nanotecnologia, ha augmentat la seva importància durant els darrers deu anys, en particular en medicina i farmacologia. Aquesta àrea d'investigació obre perspectives noves en relació amb la terapèutica i la diagnòsi.

En el camp dels fàrmacs, les nanopartícules, un producte d'especial interès per a la nanobiotecnologia, estan esdevenint una eina nova per assegurar un alliberament

controlat dels fàrmacs. Per dur a terme aquestes funcions la preparació adequada de les nanopartícules té una importància especial, per assegurar la càrrega amb el fàrmac i la modificació adequada de la nanocàpsula formada per poder dirigir-la cap al lloc que ho necessita. A més, la nanocàpsula s'ha d'obrir fàcilment (per alliberar el fàrmac) i les restes (l'excés de nanocàpsules) s'han d'evacuar per evitar possibles efectes secundaris.

La utilització de les nanopartícules per obtenir imatges de cèl·lules és ja un camp consolidat amb una sèrie d'avantatges en relació amb altres tècniques. Cal destacar no solament la qualitat d'imatge (ja que hi ha més intensitat de fluorescència), sinó també la possibilitat d'obtenir imatges multicolor amb una qualitat millor de diagnosi. Un altre camp d'interès per a l'ús de nanopartícules és el dels nanobiosensors. Encara que la preparació d'un nanobiosensor ideal, que integra en un únic sistema totes les parts necessàries per al seu funcionament, encara no ha tingut lloc, s'està fent un gran esforç per al desenvolupament d'una nova generació de biosensors que aprofita una sèrie d'avantatges que ofereixen els nanomaterials. El camp de l'ús de les nanopartícules, com a marcadors de DNA o anticossos, és només una part d'aquestes aplicacions.

La nanobiotecnologia és un camp d'investigació interdisciplinari i es basa en un treball cooperatiu de farmacèutics, químics, físics, biòlegs, metges i enginyers. Els tres camps de la nanobiotecnologia mostrats en aquest article són només part dels esforços que s'estan duent a terme últimament.

La nanobiotecnologia investiga també, en la interfase entre la biotecnologia i la nanotecnologia, els fenòmens d'autoacoblament o autoorganització de biomolècules, com les membranes cel·lulars o els virus, per adaptar aquests principis a la producció de noves nanoestructures. Hi ha altres casos més que no són descrits en aquesta revisió i

que poden ser objecte d'altres articles interessants en el futur.

AGRAÏMENTS

L'autor d'aquesta revisió agraeix les ajudes de la Fundació Ramón Areces (projecte Bionanosensores), el MEC (Madrid) (projectes MAT2008-03079/NAN) i Consolider-Ingenio 2010 (projecte CSD2006-00012) per a la investigació duta a terme en el camp dels nanobiosensors. Resta agraït també a tots els seus col·laboradors, professors i doctorands, que han contribuït a dur a terme els treballs mencionats.

BIBLIOGRAFIA

- BOTTINI, M.; CERIGNOLI, F.; DAWSON, M. I.; MAGRINI, A.; ROSATO, N.; MUSTELIN, T. (2006). «Full-length single-walled carbon nanotubes decorated with streptavidin-conjugated quantum dots as multivalent intracellular fluorescent nanoprobe». *Biomacromolecules*, 7: 2259-2263.
- BRUCHEZ, J. M.; MORONNE, M.; GIN, P.; WEISS, S.; ALVISATOS, A. P. (1998). «Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels». *Science*, 281: 2013-2016.
- GAO, X.; CUI, Y.; LEVENSON, R. M.; CHUNG, L. W.; NIE, S. (2004). «In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots». *Nat. Biotechnol.*, 22: 969-976.
- GAO, X.; YANG, L.; PETROS, J. A.; MARSHALL, F. F.; SIMONS, J. W.; NIE, S. (2005). «In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots». *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16: 63-72.
- HEFFERNAN, M. J.; MURTHY, N. (2005). «Polyketal nanoparticles: a new pH-sensitive biodegradable drug delivery vehicle». *Bioconjugate Chem.*, 16: 1340-1342.
- HUANG, X.; EL-SAYED, I. H.; QIAN, W.; EL-SAYED, M. A. (2006). «Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods». *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 2115-2120.
- KIM, D. K.; MIKHAYLOVA, M.; WANG, F. H.; KEHR, J.; BJELKE, B.; ZHANG, Y.; TSAKALAKOS, T.; MUHAMMED, M. (2003). «Starch-coated superparamagnetic nanoparticles as MR contrast agents». *Chem. Mater.*, 15: 4343-4351.

- KOBAYASHI, H.; HAMA, Y.; KOYAMA, Y.; BARRETT, T.; REGINO, C. A. S.; URANO, Y.; CHOYKE, P. L. (2007). «Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots». *Nano Lett.*, 6: 1711-1716.
- LOO, C.; LOWERY, A.; HALAS, N.; WEST, J.; DREZEK, R. (2002). «Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy». *Nano Lett.*, 5: 709-711.
- MARTINA, M. S.; FORTIN, J. P.; MENAGER, C.; CLEMENT, O.; BARRATT, G.; GRABIELLE-MADELMONT, C.; GAZEAU, F.; CABUIL, V.; LESIEUR, S. (2005). «Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging». *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 10676-10685.
- NAKAYAMA-RATCHFORD, N.; BANGSARUNTIP, S.; SUN, X.; WELSHER, K.; DAI, H. (2007). «Noncovalent functionalization of carbon nanotubes by fluorescein-polyethylene glycol: supramolecular conjugates with pH-dependent absorbance and fluorescence». *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 2448-2449.
- OZSOZ, M.; ERDEM, A.; KERMAN, K.; OZKAN, D.; TUGRUL, B.; TOPCUOGLU, B.; EKREN, H.; TAYLAN, M. (2003). «Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of factor v leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes». *Anal. Chem.*, 75: 2181-2187.
- PARK, S. J.; TATON, T. A.; MIRKIN, C. A. (2002). «Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes». *Science*, 295: 1503-1503.
- PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. (2000). «Electrochemical genosensor design. Immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection». *Biosensors & Bioelectronics*, 15: 291-303.
- PUMERA, M.; CASTAÑEDA, M. T.; PIVIDORI, M. I.; ERITJA, R.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. (2005). «Magnetically triggered direct electrochemical detection of DNA hybridization using Au67 quantum dot as electrical tracer». *Langmuir*, 21: 9625-9629.
- RESHETNIKOV, P. S.; HALDAR, M. K.; SEAL, S.; MALLIK, S. (2007). «Surface-derivatized nanoceria with human carbonic anhydrase ii inhibitors and fluorophores: a potential drug delivery device». *J. Phys. Chem. C.*, 111: 8437-8442.
- REZLER, E. M.; KHAN, D. R.; LAUER-FIELDS, J.; CUDIC, M.; BARONAS-LOWELL, D.; FIELDS, G. B. (2007). «Targeted drug delivery utilizing protein-like molecular architecture». *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 4961-4972.
- ROSI, N. L.; MIRKIN, C. A. (2005). «Nanostructures in biodiagnostics». *Chem. Rev.*, 105: 1547-1562.
- THAXTON, C. S.; HILL, H. D.; GEORGANOPOULOU, D. G.; STOEVA, S. I.; MIRKIN, C. A. (2005). «A bio-bar-code assay based upon dithiothreitol-induced oligonucleotide release». *Anal. Chem.*, 77: 8174-8178.
- VASIR, J. K.; LABHASETWAR, V. (2007). «Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics». *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 718-728.
- WANG, J.; LIU, G.; MERKOÇI, A. (2003). «Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets». *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 3214-3217.
- WANG, J.; POLSKY, R.; XU, D. (2001). «Silver-enhanced colloidal gold electrochemical stripping detection of DNA hybridization». *Langmuir*, 17: 5739-5741.
- WANG, J.; XU, D.; KAWDE, A.-N.; POLSKY, R. (2001). «Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization». *Anal. Chem.*, 73: 5576-5581.