

POSSIBLE MILLORA EN EL COMPORTAMENT DE LES NEURONES AMB L'ÚS DE NANOTUBS DE CARBONI COM A POLÍMER



Treball de Recerca

Alumne: Ayman Farricha

Tutora: Maite García

Curs: 2019-20

Data: 10-01-2020

2n de Batxillerat

Centre: IES Puig Castellar

AGRAÏMENTS

«Quan se'm va plantejar aquest gran repte del treball de recerca, no sabia com reaccionar, com respondre a quelcom que fins a aquell mateix moment semblava encara ser lluny. El caos que generava dintre meu el fet d'haver de pensar en un tema, desenvolupar-lo i, sobretot, conviure un estiu sencer amb ell em feia considerar determinats aspectes de la meva existència. Llavors, trobant-me dintre de tal desordre i confusió mentals, com podia jo superar aquest obstacle?

La solució no residia en allò conceptual, tampoc residia en la simple recerca i investigació sinó en les entitats tangibles i sensibles, en les persones. Per aquesta raó he decidit incloure en el meu treball aquest apartat exclusiu. Per tant, m'agradaria agrair la col·laboració i l'ajut de determinades persones i entitats grupals que han fet possible tot allò que s'observa en aquest projecte de recerca.

Primerament, són poques les paraules amb les que puc agrair el suport constant per part de la meva família, sobretot, l'ajut ofert per part dels meus pares, qui han estat sempre a la disposició de les meves necessitats. Probablement, l'execució del treball no hauria estat pas exitosa si no hagués aprofitat la bondat dels meus pares i la paciència d'aquests.

D'altra banda, també vull agrair al programa Batx2Lab impulsat pel Parc Científic de Barcelona (PCB), un programa que m'ha ofert l'oportunitat de treballar als seus laboratoris de forma confident i honorable. Però, no només agraeixo els serveis i les instal·lacions del programa sinó també l'ajut que em va proporcionar el meu tutor del PCB, Adrián López Canosa, qui no només ha estat un excel·lent guia i tutor sinó també una persona comprensiva.

I, per últim però no per això menys important, vull agrair a la meva tutora a l'institut, Maite Garcia, qui ha sabut oferir-me ajuda a nivell documental, teòric, pràctic, creatiu, iniciatiu i intencional, entre altres. És qui m'ha estat avisant dels errors, de les mancances que tenia el meu treball i que anaven desapareixent gràcies a ella. És qui de forma instantània ha sabut resoldre problemes referents a l'execució del treball i qui ha pres grans iniciatives que presentaven grans opcions per al desenvolupament del meu projecte. Per exemple, va ser ella qui em va dir de participar en el programa Batx2Lab i qui em va ajudar a portar a terme els diferents processos d'accés al programa. Per tant, la Maite Garcia no només ha estat una tutora excepcional sinó també un pilar fonamental del present treball de recerca.»

INTRODUCCIÓ	7
Objectius	10
PART TEÒRICA	11
1. Què són els nanotubs de carboni o CNTs?	11
1.1. Descobriment dels CNTs	14
1.1.1. La controvèrsia del descobriment	14
1.1.2. Línia del temps	15
1.2. Tipus de CNTs segons l'estructura	19
1.2.1. Nanotubs de carboni d'una sola paret (SWCNTs)	20
1.2.2. Nanotubs de carboni de múltiples parets (MWCNTs)	23
1.2.3. Propietats dels CNTs	24
1.2.3.1. Propietats elèctriques	24
1.2.3.2. Propietats mecàniques	26
1.2.3.3. Propietats tèrmiques	26
1.2.3.4. Propietats òptiques	27
2. Aplicacions dels CNTs	28
2.1. Electroquímiques	28
2.2. Electrònica	31
2.3. Altres aplicacions industrials	31
3. Nanotubs en medicina	32
3.1. Comportament i interacció biològica	33
3.1.1. Toxicitat	33
3.1.2. Solució a la toxicitat	36
3.2. CNTs en sistemes terapèutics	37
3.2.1. Teràpia farmacològica	37
4. Funcionalització dels CNTs	39
4.1. Funcionalització covalent	40
4.2. Funcionalització no covalent	42
5. Aspectes neuronals	43
5.1. Estructura i composició d'una cèl·lula	43
5.1.1. Membrana	44
5.1.2. Histologia i estructura interna	44
5.2. Connectivitat	46
5.3. Desordres neuronals	48
5.3.1. Desmielinització	48
5.3.2. Degeneració axonal	49

6. Regeneració neuronal amb CNTs	49
6.1. Enginyeria de teixits	50
6.2. Regeneració nerviosa perifèrica y central	51
6.3. Aplicació dels CNTs en regeneració i estimulació nerviosa	53
7. Solució de l'adequació dels nanotubs de carboni a les neurones	55
8. Conclusió	57
PART PRÀCTICA	58
1. Formulació del problema	58
2. Hipòtesi	58
3. Objectiu i enfocament	59
4. Justificació del treball	59
5. Marc teòric	60
5.1. Obtenció de làcid poli-làctic	60
5.2. Tècnica d'electrospinning	60
5.3. Marcatge fluorescent	63
6. Metodologia aplicada	64
7. Materials (rellevants)	64
8. Procediment pas a pas	70
8.1. Muntatge de l'experiència	70
8.2. Execució de l'experiència	71
8.2.1. Síntesi de la scaffold	71
8.2.2. Fabricació del plàstic	75
8.2.3. Marcatge fluorescent de les cèl·lules	77
9. Interpretació i aplicació dels resultats	85
9.1. Taula de resultats	85
9.2. Esquematització dels resultats	87
9.3. Justificació dels resultats	88
10. Conclusió	88
Conclusions finals	90
Bibliografia/Webgrafia	91

INTRODUCCIÓ

Avui dia podem parlar sense por a equivocar-nos del fet de viure en una societat marcada per l'evolució constant en medicina i la seva creixent tecnològització que ha permès, entre altres avenços, desenvolupar noves tècniques d'exploració biològica. Per això, no hauria de sorprendre'ns el fet de plantejar-nos objectius que fins fa ben poc eren inabastables com, per exemple, la regeneració o reparació de teixits malmesos a causa de lesions o malalties de diversos tipus.

En aquesta línia de pensament i buscant inspiració per al meu treball de recerca, vaig llegir l'article «Properties and behaviour of carbon nanomaterials when interfacing neuronal cells: How far have we come?» publicat a la revista *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*.¹

Arran de la lectura d'aquest article vaig continuar cercant articles ja no relacionats amb els nanomaterials en general sinó amb els nanotubs de carboni en especial, i va ser aquest el moment quan vaig trobar l'article «Sculpting neurotransmission during synaptic development by 2D nanostructured interfaces» publicat a la revista *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*.²

Aquest article explica com les característiques que tenen els nanotubs de carboni poden ajudar a fomentar l'activitat neuronal. Precisament, aquest grup d'investigadors que ha publicat l'anterior article, en el qual es troba Maurizio Prato (professor Ikerbasque en CIC biomaGUNE), ha estat investigant els possibles efectes que poden tenir els nanotubs de carboni sobre les cèl·lules neuronals i com aquestes es comporten quan entren en contacte amb aquests nanomaterials. Prato, en col·laboració amb la neurofisiòloga Laura Ballerini de la Universitat de Trieste, ha utilitzat nanotubs de carboni com a substrats per al creixement neuronal. Els científics han demostrat que aquests sistemes estructurals nanomètrics poden

¹ L'article ha estat publicat el maig de 2019 i té com a autors o científics principals a Rossana Rauti i Maurizio Prato.

² L'article ha estat publicat el maig de 2017 i té com a autors o científics principals a Maurizio Prato i Laura Ballerini.

intervenir en la formació de sinapsis³ i modular mecanismes biològics, com ara el creixement de les neurones com a part d'un procés autoregulat. Els nanotubs de carboni s'han convertit en una plataforma biomaterial intrigant i prometedora per a la regeneració i la reparació funcional dels teixits nerviosos danyats. A més, les seves propietats elèctriques, estructurals i mecàniques úniques, i la seva penetració cel·lular fan que siguin útils suports implantables per al lliurament de molècules terapèutiques. El procés d'adaptar aquest nanomaterial a l'aplicació que busquem (és a dir, la funcionalització) consisteix, bàsicament, a envoltar aquests nanotubs amb molècules biològicament rellevants i efectives. En aquest sentit, aquesta esdevé una esperançadora estratègia per aportar una millor biocompatibilitat per a la regeneració neuronal.

He de destacar que trobar biomaterials que puguin utilitzar-se com a matrius artificials pel seu ús en l'enginyeria de teixits suposa un gran repte, ja que aquests materials han d'interactuar amb els sistemes biològics i han de tenir característiques que els facin biocompatibles i biològicament acceptables. En afegit, és evident que aquests materials han de ser avaluable i han de mantenir les seves prestacions durant tot el temps que hagin de fer la seva funció.

A més a més, a causa de la complexitat de l'anatomia del sistema nerviós, tant la reparació de nervis malmesos com la recuperació de la seva funcionalitat són un gran repte per a la medicina actual. No cal dir que trobar el biomaterial idoni per restaurar la funcionalitat nerviosa és fonamental per tal d'aconseguir aquest objectiu i d'obrir així un camí d'esperança cap a noves línies d'investigació.

De fet, és per aquest motiu que vaig decidir enfocar el meu treball de recerca cap a l'ús de nanomaterials de carboni i regeneració neuronal.

³ Sinapsis: estructures especialitzades a través de les quals les neurones es comuniquen.

La meva experiència s'ha vist complementada amb l'ajut per part de la meva tutora del treball de recerca, Maite Garcia. A més, el seu ajut no es va limitar únicament al desenvolupament del treball com a document (constituïnt una porció fonamental en aquest) sinó també informant-me de propostes. Amb la intenció de poder realitzar la part pràctica del meu treball de recerca, la meva tutora em va suggerir d'aplicar al programa *Batx2Lab*, del Parc Científic de Barcelona (PCB). D'aquesta manera, la tutoria va ser compartida entre la meva tutora a l'institut i el meu tutor del PCB, Adrián López Canosa, investigador de l'IBEC (Institut de Bioenginyeria de Catalunya) que és un centre d'investigació interdisciplinar dedicat a la bioenginyeria i a la nanomedicina amb seu a Barcelona.

Va ser allà (en el PCB) on em van informar de la impossibilitat de treballar amb neurones i nanotubs de carboni a causa del fet de ser difícils d'aconseguir. Però, malgrat això, em van oferir l'oportunitat d'experimentar amb fibroblasts de rata (un altre tipus cel·lular) i àcid polilàctic (un altre material).

El meu treball de recerca té, doncs, dues parts. Una primera part bibliogràfica que em va permetre conèixer les propietats dels nanotubs de carboni i la fisiologia de les neurones per tal d'intuir una opinió sobre la idoneïtat d'aquests materials per a la reparació neuronal. D'aquesta manera, he pogut mantenir la meva idea inicial (entendre perquè aquests nanomaterials poden ser revolucionaris en l'àmbit de la bioenginyeria de teixits) i, al mateix temps, valorar els possibles efectes negatius del seu ús.

D'altra banda, en la part experimental, vaig poder comprovar com interfereix el substrat en el creixement i la funcionalitat cel·lulars. Aquest era un primer pas per tal d'entendre la importància de seleccionar un bon biomaterial com a bastida (o base). Vaig treballar amb fibroblasts⁴ de rata i vaig utilitzar com a bastida el polímer àcid polilàctic⁵, fent una comparativa per veure si hi havia diferències pel que fa a la

⁴ fibroblasts: tipus de cèl·lula que forma part del teixit conjuntiu.

⁵ àcid poli-làctic: polímer (=complex) amb una molt baixa toxicitat, derivat de la polimerització de l'àcid làctic.

disposició espacial de les cèl·lules depenent de la presència o absència del polímer. Això em va permetre entendre la importància de la interacció substrat-cèl·lula.

Quan vaig començar la realització del treball de recerca no vaig tenir gens clar com seria el resultat, em van dominar les situacions de desànim, unes situacions que només em van portar a tornar a plantejar-me el sentit del treball. No obstant això, a mesura que avançava en el desenvolupament del treball, més esperança adquiria en el seu triomf.

Objectius

En aquest treball de recerca, pretenc estudiar: la interacció entre biopolímers, utilitzats com a bastida, i el comportament cel·lular. Per això, m'he plantejat els següents objectius:

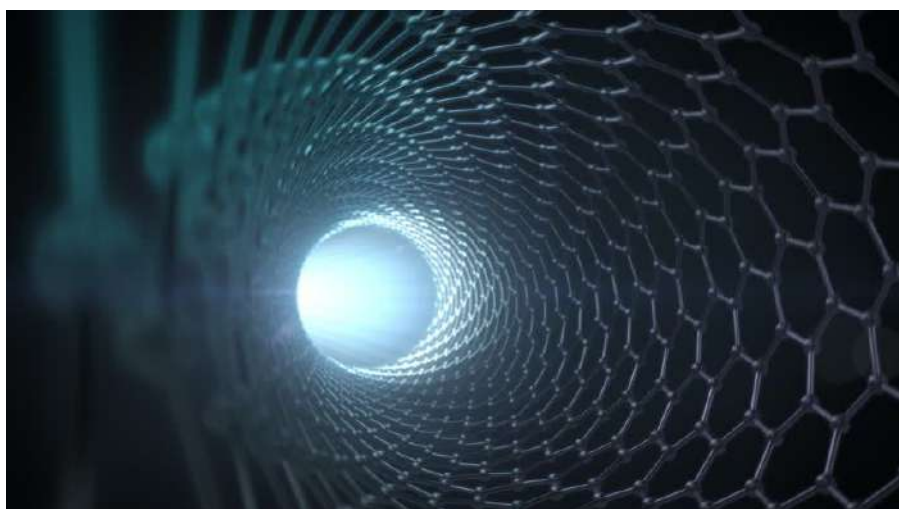
- Caracteritzar (a nivell documental) les propietats dels nanotubs de carboni.
- Analitzar les propietats dels nanotubs de carboni i determinar la seva idoneïtat com a substrats per a la regeneració neuronal.
- Comprovar experimentalment la interacció entre un tipus de substrat i una activitat cel·lular determinada (sinapsi).
- Valorar la importància de la caracterització dels substrats emprats en experimentació pel que fa a la biocompatibilitat i la toxicitat .
- Valorar la investigació científica com a un procés que requereix la cooperació entre diferents disciplines.
- Aprendre mètodes i tècniques experimentals en l'estudi de teixits.

PART TEÒRICA

En aquesta secció del treball es durà a terme un estudi única i excusivament teòric del treball. Tots els aspectes exposats i plantejats es refereixen a aspectes purament conceptuals o exemplificats (quan s'exposen altres experiments).

1. Què són els nanotubs de carboni o CNTs?

Avui dia hi ha diversos tipus de nanomaterials que es presenten com a quelcom que exerceix papers fonamentals en la constitució d'altres macroestructures (com ara superfícies) que faciliten el funcionament d'altres construccions. Una dècada sencera d'investigació en nanotubs de carboni (des d'aquest moment els anomenarem CNTs a causa de l'acrònim anglès *Carbon Nanotubes*) ha marcat el camí per difondre l'ús d'aquests nanomaterials únics i fer que esdevinguin una gran font de diverses aplicacions. Al relativament nou àmbit de la nanobioteχνologia, les diverses aplicacions dels CNTs van des de l'ús de biosensors miniaturitzats fins l'aprofitament d'òrgans de regeneració. No obstant això, la complexitat dels sistemes biològics planteja un repte significatiu en el desenvolupament d'aplicacions d'enginyeria de teixits basades en els CNTs. Aquesta perspectiva se centra en el desenvolupament recent de l'enginyeria de teixits formats per CNTs, on la interacció entre les cèl·lules vives i els nanotubs s'ha transformat en diverses tècniques noves.



Imatge 1. Interior d'un nanotub de carboni. Font: <https://www.shutterstock.com/pt/video/clip-10953341-inside-rotating-carbon-nanotube-on-dark-background>

Els CNTs tenen una alta resistència mecànica⁶, acompanyada d'un pes ultralleuger, unes propietats riques en electrons i una excel·lent estabilitat química i tèrmica. Aquestes propietats fan que els CNTs siguin molt prometedors en diferents camps: s'han utilitzat en compòsits conductors, per a dispositius d'emmagatzematge d'energia i de conversió d'energia, sensors, pantalles d'emissió de camp i fonts de radiació, suports d'emmagatzematge d'hidrogen i dispositius semiconductors de mida nanomètrica, sondes i interconnexions. En general, l'únic que ens interessa saber dels seus usos és que s'han estès per diferents àmbits que s'allunyen de la biologia. No obstant això, la seva potencial toxicitat ha estat discutida però alhora solucionada parcialment en la darrera dècada mitjançant, per exemple, la funcionalització (o millora) de la superfície dels CNTs, entre altres. Aquesta funcionalització esdevé l'adaptació de la superfície dels CNTs a la funció que ens interessa. Aquestes funcionalitzacions estan destinades a augmentar la solubilitat i seguretat del disseny per tal de promoure aplicacions biomèdiques.

Entre el nombre d'aplicacions biològiques possibles dels CNTs, la interfície⁷ i l'enginyeria de teixits (és a dir, les macroestructures que interactuaran amb el teixit neuronal) són les més interessants. A causa de les seves característiques peculiars, els CNTs semblen adequats per a la interacció amb els òrgans d'activitat elèctrica (com el cervell). En particular, molts estudis han demostrat que els substrats dels CNTs són capaços de mantenir la supervivència neuronal i de promoure el creixement de les neurones. La major part dels nostres coneixements sobre interfícies neuronals s'han obtingut estudiant estructures i dispositius en un sol pla (2D), més recentment els biòlegs han explorat l'ús de complexos topogràfics en tres dimensions (3D) que recorden l'entorn fisiològic extracel·lular en què les cèl·lules funcionen de manera rutinària in vivo (és a dir, en éssers vius).

El 2009, un grup d'investigadors dirigits per Ghibaudo va informar sobre diferències en les interaccions cel·lulars entre els substrats 2D i 3D mitjançant el seu article

⁶ resistència mecànica: capacitat que té un material o cos per no trencar-se davant de grans forces.

⁷ interfície: una mena de interacció entre els nanotubs i neurones.

«Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration» publicat a la revista *Biophysical Journal*. Les cèl·lules connectades a medis 3D van mostrar formes més allargades i ramificades. L'estructura esponjosa obtinguda era molt estable, mostrant una excel·lent compressibilitat i capacitat de recuperació de volum mitjançant l'expansió lliure. D'aquí podem deduir que el comportament dels CNTs en conformacions 3D fa que tinguin la capacitat d'adaptar-se i expandir-se en el medi en què es troben. També es van poder fabricar bastides⁸ en 3D. Aquestes bastides 3D realitzades amb un polímer del CNT i amb CNTs purs es van aplicar per estudiar l'activitat de les neurones. Els components basats en CNTs poden contribuir al desenvolupament de dispositius neuroprostètics robustos i biocompatibles, amb l'objectiu de restaurar habilitats a pacients que han perdut alguna funció sensorial o motora a causa d'una malaltia o d'una lesió. Per tant, el que es busca essencialment amb la investigació a l'àmbit dels CNTs és poder reparar o, simplement, substituir una funció o capacitat que hagi perdut un individu. Específicament, el que buscarem serà la substitució d'aquestes capacitats però a nivell neuronal.

1.1. Descobriment dels CNTs

En aquest apartat parlaré una mica sobre l'origen dels nanotubs de carboni, per tal de situar-nos en el context històric. Malgrat que molts experts i persones influenciades per aquests estableixen que els nanotubs de carboni es van evidenciar per primera vegada el 1991 (gràcies a Sumio Iijima), de fet, aquests nanomaterials van sortir a la llum abans. Des de finals del segle XIX es coneix que la descomposició tèrmica (amb calor) d'hidrocarburs⁹ gasosos produeix filaments o fibres de carboni. Controlant les condicions de la síntesi es va disminuir l'extensió d'aquests filaments o fibres fins a obtenir nanofibres de carboni, que són estructures carbonoses amb plànols gràfics ordenats de diferents formes. La barrera entre el que és una nanofibra de carboni i el que és un nanotub de carboni és força difusa,

⁸ bastides: una mena de base formada per un polímer.

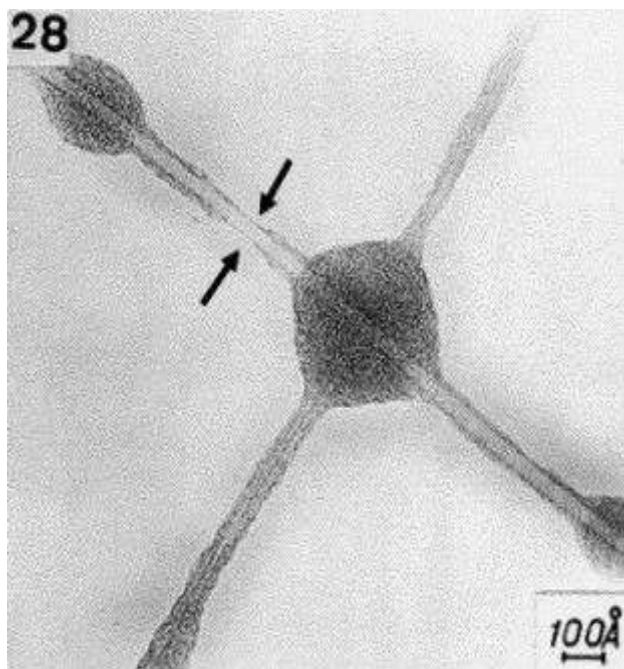
⁹ Hidrocarburs: molècules formades per carboni i hidrogen.

tot i que actualment es consideren nanofibres aquells materials els plànols gràfics dels quals no són paral·lels a l'eix central i es consideren nanotubs els que presenten una disposició paral·lela a aquest eix. Però, abans de disposar de microscopis d'alta resolució (els primers microscopis electrònics de transmissió es van comercialitzar el 1939), això no era senzill d'observar.

1.1.1. La controvèrsia del descobriment

Es creu que la primera evidència de la naturalesa tubular d'alguns filaments de carboni es va publicar el 1952 al Journal of Physical Chemistry i, a més, en rus. Això va dificultar sensiblement la seva transmissió a altres investigadors, en part, per l'idioma i, en part, per la dificultat d'accés a la revista que no estava indexada. En aquest article es demostra inequívocament que hi havia una cavitat a l'interior dels filaments.

El 1958, es va descriure l'existència de CNTs amb textura concèntrica o de tipus bambú, juntament amb altres morfologies. En qualsevol cas, la qüestió va romandre



en debat fins als anys 70, en què el TEM¹⁰ va adquirir suficient resolució. Així, el grup d'Agnès Oberlin el 1976, va mostrar una imatge TEM d'un nanotub de carboni que, en observació del seu diàmetre d'uns 5 nm seria, probablement, de paret múltiple (ja que n'hi ha de diferents tipus). [vegeu imatge 2]

Imatge 2. Nanotub de carboni observat en 1976. Font:

<https://naukas.com/2014/01/13/el-descubrimiento-de-os-nanotubos-de-carbono/>

¹⁰ TEM: tipus específic de microscopi.

Llavors, coneixent el que ha passat, per què la comunitat científica sembla creure que el descobriment va ser l'any 1991 i no pas 40 anys abans? Aquesta situació s'ha donat principalment a causa de la situació i de la societat de cada temps. El 1952, les persones eren quasi totalment incapaces de pensar en quelcom de mesura tan mínima com és la matèria a escala nano, a més, els recursos i la difusió de la ciència no eren els mateixos. En canvi, el 1991, la població ja podia pensar en la possibilitat de l'existència de quelcom que va més enllà dels nostres sentits i de les nostres capacitats.

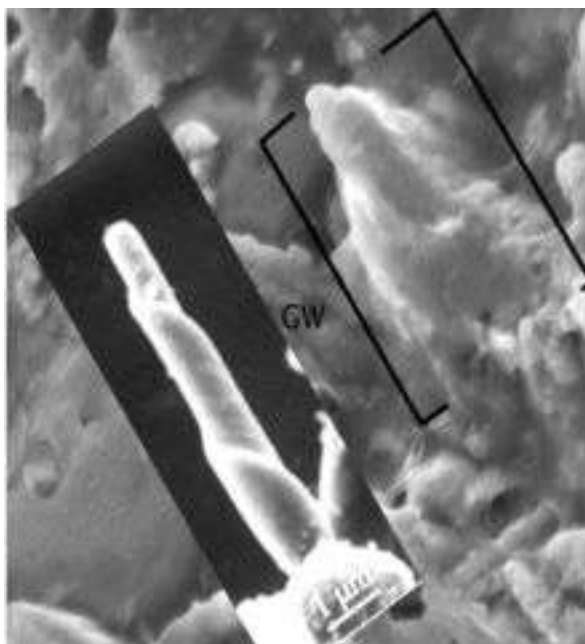
1.1.2. Línia del temps

Tot es remunta a l'any 1952, quan Radushkevich i Lukyanovich publiquen un article a la revista soviètica de química i física que mostra fibres de carboni de 50 nanòmetres de diàmetre. Tot i que suposa un dilema el fet de considerar-ho com a any de descobriment, de fet, segons el que s'ha establert anteriorment, aquest seria l'origen del coneixement dels nanotubs de carboni a partir de petits indicis que afirmaven aquesta existència. Tres anys més tard s'aconsegueix observar un creixement de filaments de carboni tubulars, de 10–200 nm de diàmetre.

Malgrat això, no és fins l'any 1960 que Roger Bacon aconsegueix fer créixer unes estructures que va denominar *bigotis de grafit* i utilitza la microscopia per mostrar que l'estructura consisteix en làmines de grafit enrotllades en cilindres concèntrics. [vegeu imatge 3]

Aquesta estructura més que tractar-se de nanotubs de carboni, coincideix amb el model estructural de les nanofibres. Aquest mateix any Bollmann i Spreadborough parlen de les propietats de fricció del carboni en vers les làmines rodants de grafit a la natura. La imatge del microscopi electrònic mostra clarament el MWCNT¹¹.

¹¹ MWCNTs: CNTs de paret múltiple, de l'acrònim anglès de *Multi-walled carbon nanotubes*. [vegeu apartat 1.2.2.]



Imatge 3. Imatge del que Bacon va anomenar bi-gotis de grafit. Font: https://news.softpedia.com/news/Dark-Energy-Overpowered-by-Carbon-Whiskers-79823.shtml#sgal_0

Posteriorment, el 1971, Lieberman va anunciar el creixement de tres filaments gràfics diferents: tubulars, retorçat i de forma esfèrica. Cinc anys més tard, el 1976, Morinobu Endo va informar sobre el creixement de deposicions de vapor químic (CVD) de fibres de carboni a escala nanomètrica i també va informar sobre el descobriment de nanofibres de carboni, incloent que algunes estaven formades com a tubs buits. En els següents 15 anys (1976-1991) es van dur a terme avenços en la ciència però no només des del conegut àmbit científic del laboratori sinó també pel que fa a la difusió d'aquests descobriments i a la creació d'altres aspectes en altres àmbits que s'inspiren en el model proposat per la ciència.

A més, durant aquest període de temps s'ha realitzat un dels esdeveniments més importants en aquest àmbit: el descobriment dels full·lerens. Un full·lerè és un al·lòtrop¹² de carboni la molècula del qual està formada per àtoms de carboni

¹² al·lòtrop: l'al·lotropia és la capacitat que té un material per existir en diferents condicions físiques.

connectats per enllaços simples i dobles per formar una malla tancada o parcialment tancada, amb anells fusionats de cinc a set àtoms. La molècula pot ser una esfera buida, un el·lipsoïde, un tub o moltes altres formes i mides. Es tracta d'una estructura que permet la seva aplicació en una gran quantitat d'àmbits i situacions, sobretot, a l'àmbit de la medicina on es poden utilitzar per a exterminar el càncer aplicant un remei que afecta a la zona tumoral únicament sense afectar altres òrgans, fet que permet que la cura del càncer no esdevingui perjudicial per a la persona i que aquesta no pateixi el risc de morir intentant solucionar una possible amenaça de mort. El procés d'inserció del medicament a la zona malalta es duu a terme amb la introducció del medicament dintre de la cavitat interful·lerena, seguidament transportar aquest ful·lerè fins la zona afectada i alliberar el medicament.

D'altra banda, no és fins l'any 1991 que l'investigador japonès Sumio Iijima va observar accidentalment un nanotub de carboni quan estava observant materials de carboni mitjançant un microscopi electrònic. Iijima va definir l'estructura com a «*un material semblant a una agulla prima*». Seguit de la identificació del material, poc temps després, Iijima va afirmar que es tractava d'una estructura de grafit. A més, va ser Iijima qui va anomenar aquest nanomaterial amb el nom de nanotub de carboni pel fet que està format per àtoms de carboni i, a més, té una estructura tubular amb un gruix escalat en menys d'uns quants nanòmetres. En paraules del propi Iijima: «*Els nanotubs de carboni han atret molts investigadors en una àmplia gamma de camps, des del món acadèmic fins a l'industrial, no només per la seva singularitat en comparació amb els materials convencionals, sinó també perquè són materials molt prometedors en nanotecnologia, en la tecnologia futura.*».

Un any després de l'anterior suposat descobriment, el 1992, ja es comencen a proposar i a formular prediccions teòriques sobre les propietats electròniques dels SWCNTs¹³. Aquest tipus de CNTs ha estat objecte d'estudi del laboratori d'investigació naval dels E.E.U.U., de l'Institut de tecnologia de Massachusetts i

¹³ SWCNTs: CNTs de paret única, de l'acrònim anglès de *single-walled carbon nanotubes*. [vegeu apartat 1.2.1.]

d'una corporació (anomenada NEC). Tot seguit, l'any 1993, els grups de Donald S. Bethune de l'IBM (International business machine) i de Sumio Iijima de la corporació NEC, de forma independent l'un de l'altre, van descobrir els SWCNTs i van descobrir mètodes per produir-los fent servir catalitzadors de metalls de transició. Poc després, l'any 1995, els investigadors suïssos van ser els primers a demostrar les propietats d'emissió d'electrons dels nanotubs de carboni. Els inventors alemanys Till Keesmann i Hubert Grosse-Wilde van predir aquesta propietat dels nanotubs de carboni a principis d'any en la seva sol·licitud de patent.

A partir de l'any 1997 fins a l'actualitat, s'ha anat provant l'aplicació dels CNTs en diferents àrees i, també, s'han anat estudiant les propietats d'aquests en funció de les característiques que presenten, tant físiques com químiques. Es pot observar una gran progressió pel que fa als avenços en aquests nanomaterials durant aquest període, partint, per exemple, de la demostració dels primers transistors de nanotub de carboni d'un sol electró o de la primera suggestió d'utilitzar els CNTs com a antenes òptiques fins a derivar en aspectes com ara el desenvolupament d'una nova fibra nanotecnològica en filat humit o la unió de CNTs a la bicicleta de fibra de carboni que Floyd Landis va muntar per guanyar el Tour de França l'any 2006. Expectant l'anterior, podem observar que, malgrat que es tracta d'un mateix material, aquest ha estat utilitzat en àmbits quasi completament diferents i això ens ajuda a reafirmar la presència d'una gran diversitat de propietats en els CNTs. Fent referència a aquestes propietats, es van estudiar en profunditat aquestes gràcies a fets com ara la primera demostració que prova que la flexió dels nanotubs de carboni canvia la seva resistència, el primer informe sobre una tècnica de separació de nanotubs semiconductors i metàl·lics o el fet que els MWCNTs van demostrar ser els oscil·ladors més coneguts (capaços de convertir el corrent continu en corrent altern).

Reforçant la idea de diversitat de propietats dels CNTs, citada anteriorment, va ser precisament l'any 2006 quan es van utilitzar CNTs com a bastida per a la regeneració de nervis danyats. Sense dubte els CNTs de carboni no han estat ni

són només un nanomaterial sinó un mitjà que ha obert les portes a la nanotecnologia i a la ciència (incloent la medicina).

1.2. Tipus de CNTs segons l'estructura

El coneixement de l'estructura d'aquests sistemes de constitució carbònica¹⁴ és essencial a l'hora de determinar quines són les propietats del polímer i, conseqüentment, saber quina és la millor aplicació d'aquest nanomaterial. A més, evidentment la mida o extensió espacial de la unitat variarà en funció del tipus de CNT. D'aquesta forma avui dia podem diferenciar entre dos tipus de CNT: SWCNTs i MWCNTs. A més, s'ha de tenir en compte un factor molt important a l'hora d'interpretar les aplicacions dels CNTs i és que no es pot parlar de CNTs de manera generalitzada sinó que s'ha de saber deduir les utilitats de cada CNT en funció de la seva estructura.

Malgrat que en aquest apartat es descriuen els dos tipus de CNTs, els que realment ens interessin són els MWCNTs que, com veurem més endavant, són els que més s'ajusten als objectius que ens interessin ja que presenten una ampla compatibilitat amb la membrana cel·lular de les neurones. De moment, el que ens interessa saber només és que els CNTs que necessitem són els de paret múltiple (MWCNTs).

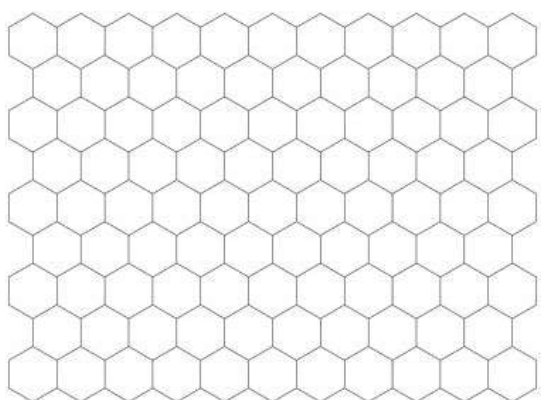
1.2.1. Nanotubs de carboni d'una sola paret (SWCNTs)

La majoria de SWCNTs (l'acrònim anglès de *single-walled carbon nanotube*) tenen un diàmetre de prop d'1 nanòmetre, i poden ser molts milions de vegades més llargs. L'estructura es pot considerar com un tub cilíndric format per anells de carboni de 6 membres, com en el grafit. Els tubs cilíndrics poden tenir un o tots dos extrems coberts per un hemisferi d'estructura fullerena (una estructura que esdevé una semiesfera). A més, malgrat que els SWCNTs ja són un tipus de CNT, dintre d'aquest tipus i ha tres subtipus que també poden influir en les capacitats i

¹⁴ constitució carbònica: que està format de carboni. Fa referència a l'estructura que té quelcom formada per carboni.

propietats dels CNTs. Per tant, diferenciem els SWCNTs: ziga-zaga, armchair (o butaca) i quirals.

Per tal d'entendre cada tipus de SWCNT, s'ha de comprendre primer el concepte de quiralitat¹⁵, en referència al vector quiral¹⁶. Malgrat que no ho sembli, després d'observar com és cada nanotub, de fet, podem concloure que tots tres SWCNTs estan formats per una mateixa estructura o plantilla que, com s'ha dit anteriorment, coincideix amb la del grafè, tot i que això no vol dir que la síntesi o formació dels nanotubs de carboni s'estableixi a partir d'aquest material ja que es dona per altres mètodes.

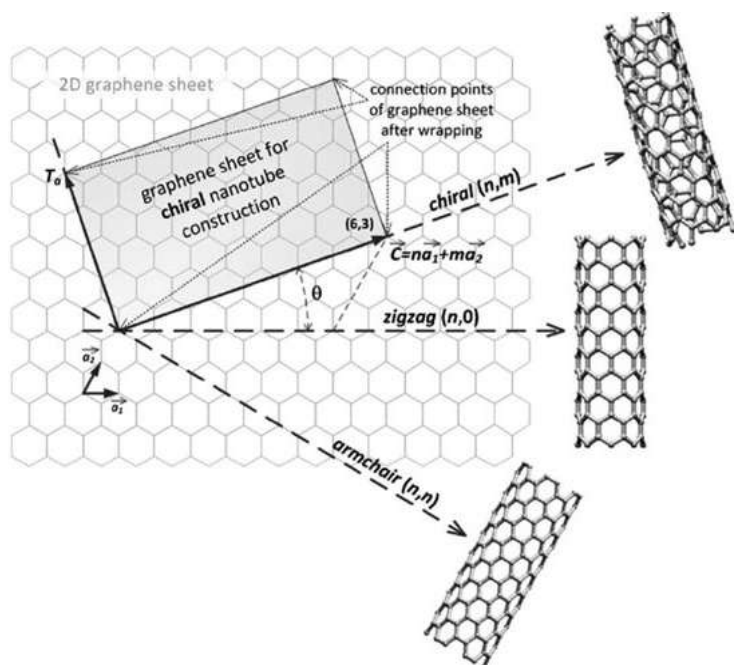


Aquesta plantilla és la que podem observar en la Imatge 4. Llavors, el vector quiral (n,m) és qui determina el grau d'inclinació amb el qual es realitza l'enrotllament de la plantilla per tal de derivar en un o un altre tipus de CNT. [vegeu Imatge 5]

Imatge 4. Plantilla de la estructura de tots els CNTs. Font: <http://freaktm.com/reticulas-en-pdf-para-imprimir-en-papel/>

¹⁵ quiralitat: és la propietat que tenen algunes molècules de tenir una molècula que esdevé la imatge que reflectiria la molècula en un mirall (=imatge especular).

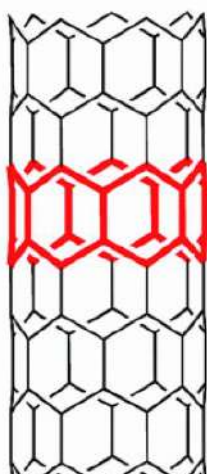
¹⁶ vector quiral: és una mena de 'fletxa' (denominació només orientativa) que senyala la direcció en que s'enrotlla cada plantilla en funció del tipus de CNTs a què es vol donar lloc. [aquesta direcció es manifesta vectorialment]



Per tant, com bé podem observar en la imatge 5, en el tipus ziga-zaga, la component m és igual a 0 i n pot tractar-se de qualsevol número. Mentre que, en el tipus armchair o butaca, es dona la següent igualtat: $n=m$; en el tipus quiral, es tracta de qualsevol altra estructura que no coincideixi amb les altres dues anteriors.

Imatge 5. Origen estructural i vectorial dels CNTs.

Font: <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/09/04/estructura-de-los-nanotubos-de-carbono/>

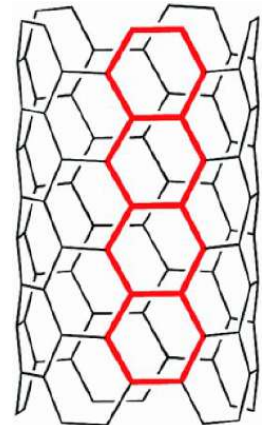


De fet, com bé diu el seu nom, el primer tipus defineix un camí en "ziga-zaga" en una xarxa similar a un grafè com un camí que gira 60 graus, alternant a l'esquerra i la dreta, després de passar per cada enllaç.

Imatge 6. Model de CNT 'ziga-zaga'. Font:

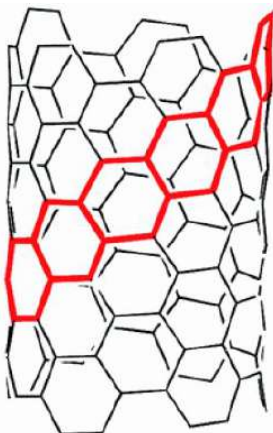
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/sc/c5sc04218f>

També és convencional definir un camí de "armchair (o butaca)" com un que fa dos girs a l'esquerra de 60 graus seguits de dos girs a la dreta cada quatre passos. Bàsicament, com s'observa a la imatge 7.



Imatge 7. Model de CNT 'armchair'.

Font: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/sc/c5sc04218f>



El tipus quiraral és qualsevol altra estructura que presenti una manca de simetria. És a dir, si dividim el nanotub de la imatge 8 verticalment, no obtindríem una simetria determinada.

Imatge 8. Model de CNT 'quiral'. Font: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/sc/c5sc04218f>

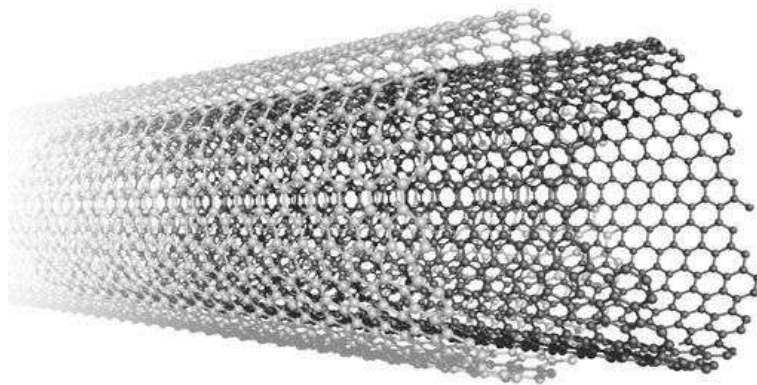
De tal forma que podem afirmar que el tercer tipus, com bé diu el seu nom, presenta la característica de quiralitat ja que no podem sobreposar (quan dividim en dos el nanotub) una meitat a una altra.

1.2.2. Nanotubs de carboni de múltiples parets (MWCNTs)

Els MWCNTs (l'acrònim anglès de "*Multi-walled Carbon Nanotubes*") consten de diverses capes laminades (tubs concèntrics) de grafè. Hi ha dos models que poden ser utilitzats per descriure les estructures dels nanotubs de parets múltiple:

En el model de la nina russa, les làmines de grafit estan disposades en cilindres concèntrics, per exemple, un nanotub d'una sola paret (SWCNT) dins d'un nanotub

de diàmetre més gran d'una sola paret. En la imatge 9, es pot observar en color gris el SWCNT major i en color negre el SWCNT menor.



Imatge 9. Nanotub de carboni de paret múltiple. Font: <http://www.cienciacierta.uadec.mx/2017/12/22/aplicaciones-de-nanotubos-de-carbono/>

En el model de pergamí, un sol full de grafit s'enrotlla al voltant de si mateix, s'assembla a un rotllo de pergamí o a un diari enrotllat. En aquest cas, totes les capes del nanotub de carboni estan formades per un mateix full de grafit. De fet, com he anomenat anteriorment de passada, els MWCNTs seran els que ens seran

útils ja que presentaran propietats que ens interessin, pel que fa al contacte neuronal.

1.2.3. Propietats dels CNTs

Aquest tipus de CNTs (els MWCNTs) tenen un determinat caràcter químic-físic que confereix al material una gran quantitat d'usos i una gran disponibilitat d'ús en diverses àrees. Les propietats principals que condicionen l'aplicació d'aquesta aglomeració carbònica són les elèctriques, les mecàniques i les tèrmiques, genèricament.

1.2.3.1. Propietats elèctriques

Els nanotubs es caracteritzen per presentar una gran complexitat electrònica si tenim en compte les regles quàntiques que regeixen la conductivitat elèctrica amb la mida i la geometria d'aquests. Aquests nanomaterials, en referència al caràcter elèctric, poden comportar-se en un ampli marge de comportaments, partint del caràcter semiconductor fins derivar en presentar, en alguns casos, superconductivitat. Aquest ampli marge de conductivitat depèn directament de la geometria relativa, és a dir, es presenta en funció del seu diàmetre, torsió (quiralitat) i el nombre de capes de la seva composició. Així, per exemple, hi ha nanotubs rectes (Armchair i ziga-zaga) en què les disposicions hexagonals, a les parts extremes del tub, són sempre paral·leles a l'eix de simetria. Aquesta distribució, en funció del diàmetre, permet que dos terços dels nanotubs no quirals siguin conductors i la resta semiconductors. En el cas dels quirals, els hexàgons tenen un cert angle respecte a l'eix del tub, és a dir, la distribució dels hexàgons laterals que conformen l'estructura presenta, respecte a l'eix central del enrotllament, un caràcter helicoïdal. Aquest tipus de conformació dificulta el pas dels electrons als estats o bandes de conducció, de manera que, aproximadament, només un terç dels nanotubs quirals presenta conducció apreciable i sempre en funció de l'angle de torsió.

Cal destacar que els nanotubs que es comporten com a superconductors es podrien utilitzar per a l'estudi d'efectes quàntics fonamentals en una dimensió, així com per a la recerca d'aplicacions pràctiques en la informàtica quàntica molecular. Això és així a causa del fet que poden actuar com a "conductors quàntics", és a dir, si es representa el voltatge, o diferència de potencial davant la intensitat de corrent no s'obté una línia recta, sinó esglaonada (amb pendent). D'aquesta forma s'aprecia clarament que els CNTs tenen un munt d'aplicacions elèctriques. A més, pel que fa a la capacitat de transport del corrent, se sap que poden arribar a quantitats d'aproximadament mil milions d'A/cm² (les unitats es poden considerar com a quelcom referencial; són prescindibles; no es necessiten per comprendre la tesi), mentre que els cables de coure convencionals es fonen en arribar a densitats de corrent de l'ordre del milió d'A/cm². Clarament, existeix una àmplia diferència entre ambdues capacitats i, per tant, en el rendiment.

Llavors, els MWCNTs són els que més conductivitat tenen, una de les principals propietats necessàries per actuar en zones on l'activitat elèctrica és alta, com és el cas del cervell. Però, per què tenen tanta conductivitat?

Com hem vist anteriorment en aquest apartat, la conductivitat depèn, entre altres coses, del diàmetre, del nombre de capes i de la torsió que té un CNT i, com hem vist anteriorment [vegeu apartat 1.2.2.], els MWCNTs, com bé diu el seu propi nom, estan formats per diverses capes, tenen un diàmetre molt ampli que depèn d'aquestes capes en certa manera i no presenten cap mena de quiralitat (no són nanotubs quirals). Llavors, esdevenen els nanotubs idonis per a la seva aplicació en zones on existeix una necessitat de conductivitat elèctrica.

1.2.3.2. Propietats mecàniques

Els nanotubs de carboni són els materials més forts i rígids descoberts fins ara en termes de resistència envers la tracció¹⁷ i el mòdul elàstic. Aquesta força resulta dels enllaços covalents formats entre els àtoms de carboni individuals. De fet, l'any 2000 un nanotub de carboni de paret múltiple (MWCNT) va presentar una força de tracció de 63 gigapascals (GPa). Per fer-nos una mica a la idea, això es tradueix a que aquest CNT presentava l'habilitat de resistir una força exercida per un pes de 6422 Kg (al nostre planeta aquesta força es trobaria al voltant dels 63000 Newtons¹⁸). Clarament, tenint en compte l'anterior, aquesta resistència justifica molts dels usos que es dona als MWCNTs, com la inserció d'aquests en altres materials que hauran de suportar forces grans per tal de fer-los més resistents a trencar-se. D'altra banda, davant d'esforços de deformació molt intensos són capaços de deformar-se notablement i de mantenir-se en un règim elàstic. El mòdul de Young (que mesura la rigidesa d'un material elàstic) oscil·la entre 1.3 i 1.8 terapascals (TPa) tot i que fins ara només s'han pogut obtenir experimentalment fins als 0.8 TPa.

Per tant, també podem concloure que pel que fa a les propietats mecàniques i d'elasticitat, els MWCNTs destaquen per sobre dels SWCNTs (i implícitament també destaquen per sobre de la resta de materials amb propietats d'aquest tipus).

1.2.3.3. Propietats tèrmiques

S'espera que tots els nanotubs siguin molt bons conductors tèrmics al llarg del tub, mostrant una propietat coneguda amb el nom de "conducció bal·lística", però bons aïllants laterals a l'eix del tub. Per exemple, en un metall conductor com el coure, els electrons que condueixen el corrent són dispersats per la vibració tèrmica dels àtoms del metall. Aquesta dispersió redueix la velocitat i l'impuls dels electrons originant el que anomenem resistivitat però aquest no és el cas dels nanotubs de carboni ja que en aquests materials els electrons poden anar d'un extrem fins l'altre

¹⁷ tracció: condició en la que es troba un objecte quan està sotmès a dues forces contràries (=estirat).

¹⁸ Newton: unitat amb què es mesura la força.

del tub sense patir cap dispersió. Aquest tipus de conducció és el que apropiadament anomenem conducció bal·lística. Les mesures mostren que un SWCNT individual té una conductivitat tèrmica a una temperatura determinada al llarg del seu eix d'uns $3500 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ (en aquest cas, les unitats també s'han de prendre com a quelcom referencial i no pas essencial; podrien haver estat unitats arbitràries). La comparem amb el coure, un metall conegut per la seva bona conductivitat tèrmica, i aquest transmet $385 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. Un SWCNT individual té una conductivitat tèrmica a temperatura ambient a través del seu eix (en direcció axial) d'uns $1,52 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, que és igual de tèrmicament conductor que el sòl. Els conjunts macroscòpics de nanotubs com pel·lícules o fibres han arribat fins a $1500 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ fins ara. Les xarxes compostes de nanotubs demostren diferents valors de conductivitat tèrmica, des del nivell d'aïllament tèrmic amb la conductivitat tèrmica de $0,1 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ fins a valors més alts.

En general, els MWCNTs tenen una conducció tèrmica similar a la dels SWCNTs que afavoreix una conducció bal·lística.

1.2.3.4. Propietats òptiques

Els nanotubs de carboni tenen propietats útils d'absorció, fotoluminescència¹⁹ i espectroscopia²⁰ Raman (una típica tècnica d'espectroscopia que determina els modes de vibració de les molècules). Els mètodes espectroscòpics ofereixen la possibilitat d'establir una caracterització ràpida i no destructiva de quantitats relativament grans de nanotubs de carboni. Hi ha una forta demanda de tal caracterització des del punt de vista industrial: nombrosos paràmetres de síntesi de nanotubs es poden canviar, intencionadament o no, per alterar la qualitat dels nanotubs. Les espectroscopies d'absorció òptica, fotoluminiscència i Raman permeten una caracterització ràpida i fiable d'aquesta "qualitat de nanotub" en termes de contingut de carboni no tubular. A més, els nanotubs de carboni són

¹⁹ fotoluminiscència: emetre radiació lluminosa després d'una estimulació externa, ser fluorescent.

²⁰ espectroscopia: estudi de la interacció entre la radiació electromagnètica i la matèria, amb una certa emissió o absorció d'energia.

"sistemes unidimensionals" únics que es poden concebre com a làmines individuals de grafit enrotllades (o més precisament de grafè). Aquesta laminació es pot fer a diferents angles i curvatures, donant com a resultat diferents propietats de nanotubs, com hem vist anteriorment [vegeu apartat 1.2.1]. El diàmetre normalment varia entre 0,4 i 40 nm (és a dir, pot variar poc, fins a 100 vegades), però la longitud pot variar fins a 100.000.000.000 vegades, des de 0.14 nm a 55.5 cm.

En general, considerarem que una propietat és òptica quan el seu rendiment no depèn del material pel que està feta l'estructura sinó de com es conforma aquesta a l'espai i, per tant, aquesta configuració espacial, que té cada nanotub de carboni per separat i independentment dels altres tipus, serà la que determini moltes de les propietats que adquireix el nanomaterial. Això, per exemple, afecta a la conductivitat elèctrica d'un CNT, com hem vist a l'apartat corresponent [vegeu apartat 1.2.3.1], en una relació de proporcionalitat inversa: com més torsió presenta en la seva estructura un CNT, menys conductivitat elèctrica té.

2. Aplicacions dels CNTs

Els nanotubs de carboni, com a característiques principals, tenen una gran resistivitat mecànica, baixa densitat, alta conductivitat tèrmica, gran àrea superficial, un comportament versàtil i una elevada conductivitat elèctrica, com bé hem confirmat anteriorment. Totes aquestes propietats que posseeixen aquests materials els fan candidats ideals per un gran número d'aplicacions si el seu cost és suficientment baix (la síntesi de CNTs millora cada any i, en conseqüència, el preu de venda es redueix un 50% anualment).

2.1. Electroquímiques

Una de les aplicacions més importants dels CNTs, actualment, és l'aplicació electroquímica gràcies a la seva gran superfície i a la seva resistivitat. Exemples d'aquestes aplicacions són el desenvolupament de supercondensadors²¹, de dispositius per l'emmagatzematge d'hidrogen i la fabricació de xarxes solars. Aquests nanomaterials, com s'ha pogut apreciar, tenen nombroses aplicacions. Fent referència als supercondensadors (constituïts per dos elèctrodes²² de carboni separats per una membrana permeable d'ions submergits en un electròlit²³), els SWCNTs tenen la major relació superfície/volum de qualsevol material de carboni, de manera que els seus àtoms són els que formen la superfície de l'elèctrode. Actualment, els supercondensadors són fabricats amb carbó activat, que és extremadament porós i amb una gran àrea superficial. En aquesta classe de carbó obtingut, els porus són irregulars en grandària i forma, reduint, d'aquesta manera, l'eficiència. En canvi, els CNTs alineats verticalment en el supercondensador posseeixen formes molt regulars i una amplada de l'ordre de diversos diàmetres atòmics alhora que presenten una resistència que s'adapta a les condicions, la qual cosa incrementa la seva densitat d'energia.

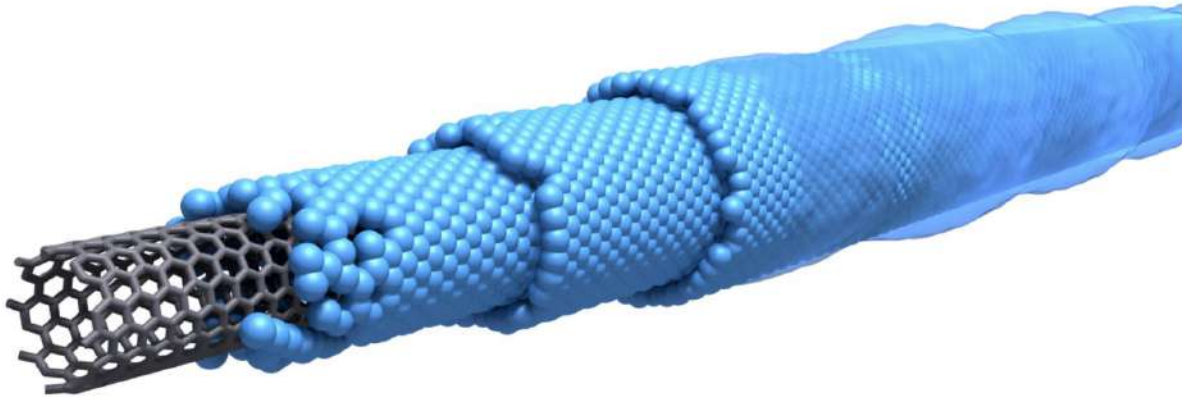
Dintre de les aplicacions electroquímiques que poden tenir els CNTs, destaca el fet d'utilitzar-los per tal d'emmagatzemar hidrogen. L'hidrogen s'afegeix als nanotubs per quimiosorció, ja que els enllaços dels carbonis que formen el nanotub ofereixen capacitat fins a la seva saturació incorporant hidrògens. A l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB) s'està treballant sobre això. La idea consisteix a dipositar nanotubs a l'interior d'una cambra a pressió. Es deixa entrar l'hidrogen en aquesta cambra i passat un temps es deixa sortir de la mateixa. La quantitat de gas

²¹ supercondensador: dispositiu passiu (que no actua amb voluntat) que emmagatzema una densitat d'energia inusualment alta.

²² electrode: element que queda en contacte en un circuit elèctric amb materials no metàl·lics.

²³ electròlit: substància que dissocia ions lliures quan es dissol o es fon, produint un medi elèctricament conductor..

sortint és menor que la que entra. Per tant, es considera que l'hidrogen queda incorporat al nanotub (de manera similar al que passa amb l'Heli).



Imatge 10. Representació gràfica de múltiples capes d'Heli incorporant-se a un nanotub de carboni.

Font: <https://www.icfo.eu/newsroom/news/4352-controlling-superfluid-helium-with-carbon-nanotubes>

Treballant sobre aquesta idea, s'ha comprovat la capacitat d'absorció de l'hidrogen en diferents estructures de nanotubs. Així, un paquet de double-walled carbon nanotubes (els DWCNTs són CNTs de dues parets) pot absorbir fins al doble del que fan els SWCNTs. A partir de la comparació dels plans de grafit dels SWCNTs (amb extremada puresa, uniformitat i, amb prou feines, traces d'impureses) i dels DWCNTs (amb un alt ordenament però amb empaquetament més lleuger) en un conjunt hexagonal, s'ha trobat que aquests últims presenten una major estabilitat per a l'absorció d'H₂. Això es dona a causa del fet que la matriu dels nanotubs presenta porus als quals poden unir-se les molècules d'H₂, i que donada l'accessibilitat d'aquests i el més profund potencial molecular, conseqüència del solapament dels potencials moleculars per la doble paret, l'absorció és molt major.

Però, per què ens interessa emmagatzemar molt H₂ en poc espai?

Avui dia, un dels factors que probablement acabaran amb la vida a la terra és la contaminació. Per això, per evitar aquesta tragèdia, s'han començat a dissenyar piles o bateries d'H₂. Però, com que el volum d'hidrogen en estat gasós és molt gran, llavors es necessita idear alguna forma d'emmagatzemar aquest hidrogen, que

posteriorment serà energia, en poc espai. Per aquesta raó, l'emmagatzematge en DWCNTs és una idea revolucionària, pel que fa a futures fonts energètiques.

A més, aquesta capacitat d'interactuar pacíficament amb una molècula com l'H₂ (sense cap repulsió), ens suggereix que probablement passi el mateix si el CNT està en contacte amb molècules similars *in vivo*²⁴.

2.2. Electrònica

D'altra banda, si bé els CNTs de carboni tenen nombroses aplicacions és indiscutible que, com a mínim, gran part d'aquestes intervinguin en l'electrònica. A més, sabent que els avenços electrònics es basen bàsicament en la miniaturització dels dispositius, és quasi imprescindible l'ús de CNTs en la seva fabricació. Principalment, els CNTs s'utilitzen com una mena de substituents del Silici. Un dels dispositius on més s'utilitzen els CNTs (exactament els SWCNTs) és el transistor. El procés es basa principalment en la introducció de SWCNTs entre dos elèctrodes (font i drenador) en transistors d'efecte de camp (FET). Aquests CNTs esdevenen amb el nom de CNTFET i el que es pretén fer amb aquesta elaboració és afavorir la circulació dels electrons. En general, el que diferencia els transistors elaborats amb silici i els elaborats amb CNTFETs és que els CNTFETs commuten sense error i, a més, no consumeixen tant com els de silici. De cara al futur, els CNTs podrien repercutir en gran quantitat en la creació de memòries d'accés aleatori (RAM).

2.3. Altres aplicacions industrials

Entre les aplicacions més famoses (en el sentit de globalitzades) dels CNTs, trobem diferents usos que es dona a aquests nanomaterials que es basen en la combinació de CNTs amb altres polímers creant un conjunt on tots dos materials es complementen i aporten determinades qualitats a l'estructura general. Un dels casos més destacats on s'ha portat a terme quelcom similar va ser en la creació de la

²⁴ *in vivo* = en organismes vius.

substància més fosca coneguda fins a la data, material que s'ha creat a partir de nanotubs de carboni. El material es va fabricar amb una matriu de nanotubs de carboni de baixa densitat, disposats de forma vertical. L'índex de reflexió del material és tres vegades menor del que s'havia aconseguit fins ara.

Aquest "bosc" de nanotubs de carboni és molt bo a l'hora d'absorbir la llum (absorbeix aproximadament el 99,9% de la llum que rep), però molt dolent per reflectir-la. El grup d'investigadors nord-americans, pertanyents a l'*Institut Politècnic Rensselaer de Troy*, Nova York, que l'ha desenvolupat, asseguren que és el més semblant que hi ha al cos negre (un cos ideal que absorbeix la llum de totes les longituds d'ona i des de tots els angles possibles). S'espera que el desenvolupament d'aquests materials tingui aplicacions als àmbits de l'electrònica, la invisibilitat a la zona del visible, i el camp de l'energia solar (principalment en la fabricació de plaques solars que tinguin un molt bon rendiment ja que aprofitaran quasi tota la llum que rebin).

3. Nanotubs en medicina

Els nanotubs de carboni es plantegen com a una promesa revolucionària a l'àmbit de la ciència, però quan parlem de ciència no només fem referència al treball en un laboratori o a l'anàlisi de dades obtingudes, sinó també a l'aplicació d'aquesta informació en diverses situacions i camps, on els resultats d'aquestes investigacions són necessaris. Precisament, la referència es dirigeix cap a l'àmbit de la medicina (en tots els seus sentits). Això, com bé hem dit anteriorment, només és possible gràcies a les propietats dels CNTs. Malgrat que avui dia són poques les solucions mèdiques amb CNTs que es poden utilitzar en persones (per no dir que no hi ha cap), de fet, són moltes les investigacions que ja estan quasi acabades, a més, de la presència d'altres que estan en constant desenvolupament i evolució i d'aquelles que sorgiran en un futur molt pròxim.

3.1. Comportament i interacció biològica

Els CNTs han estat estudiats intensament en les últimes dècades a causa de les seves possibles aplicacions en diversos camps que poden afectar les nostres vides. Un dels majors valors dels nanomaterials de carboni estarà en el desenvolupament de tractaments biomèdics nous i eficaços. Però cap de les utilitats biològiques dels CNTs podran ser possibles mai si no es coneix com es comporten aquestes molècules quan es troben en contacte amb quelcom viu. Bàsicament, el que s'ha de veure abans de realitzar cap aplicació (ja sigui terapèutica o eventual) és: com reaccionen aquestes estructures nanomètriques quan entren a un medi on són presents cèl·lules.

3.1.1. Toxicitat

Cal entendre l'extensa toxicitat dels CNTs abans de desenvolupar les aplicacions biomèdiques. Els CNTs poden ser tòxics per als pulmons, la pell o el cor. La toxicitat dels CNTs depèn de les seves estructures, morfologia, grups funcionals superficials i dosi.

Com que els CNTs són molt petits i lleugers, poden arribar a ser volàtils i ser inhalats. Ryman-Rasmussen²⁵ va estudiar els CNTs inhalats en ratolins. Va descobrir que els MWCNTs podrien arribar al teixit subpleural²⁶ de ratolins i ser incrustats a la paret subpleural, així com als macròfags²⁷ subpleurals després d'exposar-los a una inhalació de 30 mg/m³ durant 6 h. Després d'un dia, els agregats de cèl·lules mononuclears a la superfície pleural van augmentar tant en nombre com en mida. La fibrosi subpleural es va incrementar després de les dues i sis setmanes després de l'inhalació. No obstant això, no van trobar aquests efectes en ratolins

²⁵ Ryman-Rasmussen: investigador en el departament de toxicologia mediambiental i molecular, a la universitat de l'estat de Carolina del nord.

²⁶ Teixit subpleural: referit a la pleura. La pleura és una mena de membrana que envolta els pulmons, entre altres òrgans.

²⁷ Macròfag: és una cèl·lula amb capacitat immunològica que es troba al teixit conjuntiu. Tenen la funció d'eliminar o, en ocasions, envoltar agents estranys per l'organisme.

quan es va utilitzar una dosi més baixa de CNTs, la qual cosa va suggerir que la minimització de la inhalació de nanotubs durant la manipulació era prudent.

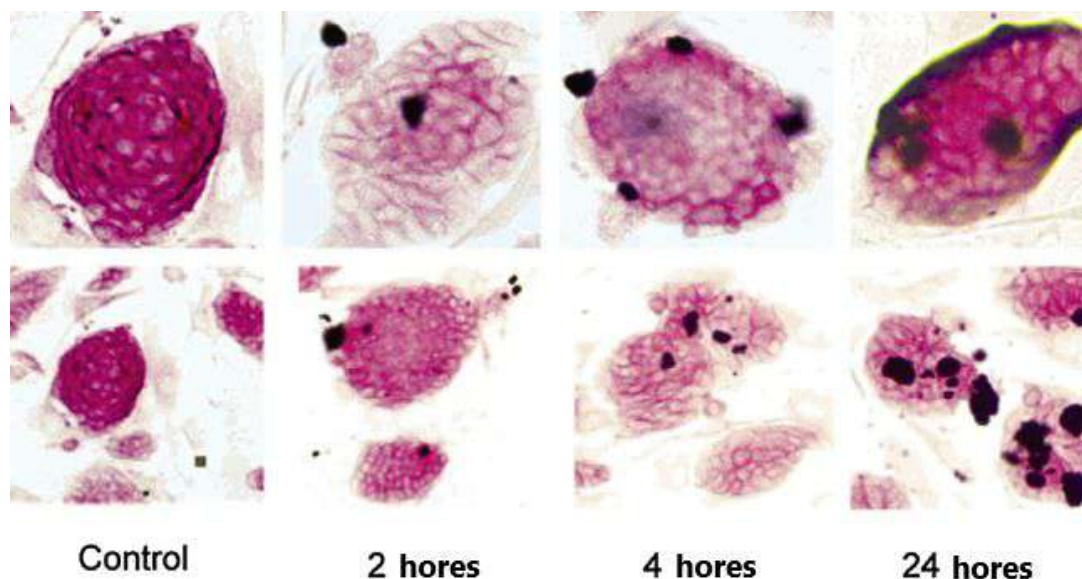
Es va estudiar la toxicitat pulmonar dels MWCNTs en ratolins 7 i 90 dies després de la instil·lació intratraqueal i es va trobar que els MWCNTs inhalats van causar pocs efectes pulmonars, però van suprimir la funció immune. La dosi també va tenir un paper vital. S'han utilitzat tres dosis diferents en els seus experiments, però només la dosi d'1 mg/m³ presentava la funció immune suprimida. També es van estudiar els mecanismes de com els CNTs inhalats van suprimir la funció immune sistèmica en ratolins i es va trobar que uns determinats enzims²⁸, que van respondre al senyal dels pulmons, van tenir un paper molt important en la supressió. Aquests ratolins sense aquests mateixos enzims no es van veure afectats quan es van exposar a la mateixa dosi de CNT. Les seves troballes suggerien senyals provinents de les senyals activades pels pulmons a la melsa per suprimir la funció immune sistèmica dels ratolins exposats.

Els CNTs també poden augmentar la incidència d'altres malalties, com ara malalties de la pell ja que la toxicitat per via cutània pot donar-se després d'exposar, a la pell, SWCNTs a causa de l'estrès oxidatiu accelerat a la pell. També es va determinar que l'administració repetida de CNTs en ratolins masculins pot causar danys reversibles en els testicles. Van trobar que els CNTs es van acumular en els testicles i van disminuir el gruix de l'epiteli seminífer després de 15 dies, però el dany dels teixits es va reparar als 60 i 90 dies. D'altra banda, també es va avaluar la resposta dels danys a l'ADN per part dels MWCNTs en cèl·lules mare embrionàries de ratolí (*Embryonic Stem cells* o *ES cells*). Van trobar que els MWCNTs es van acumular i van induir apoptosi²⁹ en aquestes cèl·lules de ratolí.

²⁸ enzim: molècula (biocatalitzadora) que té la funció de sobretot intervenir en reaccions biològiques i accelerar-les.

²⁹ apoptosi: és una mena de mort programada o induïda. Aquesta programació es pot trobar ja vigent a l'ADN o la pot induir alguna molècula (segons ordres de l'organisme).

La imatge 11 (a la següent pàgina) mostra la captació de MWCNTs, la diferenciació induïda i l'apoptosi en cèl·lules ES de ratolí i indica que la quantitat de MWCNTs acumulats a les cèl·lules ES creix gradualment a mesura que avança el temps.



Imatge 11. Imatges capturades al microscopi (a 20 augments les quatre primeres de dalt i a 10 augments les quatre restants) de l'apoptosi (mort cel·lular - de color negre) en cèl·lules ES de ratolí.
Font: <https://sci-hub.tw/10.1021/nl071303v> [Article original: "DNA damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells"]

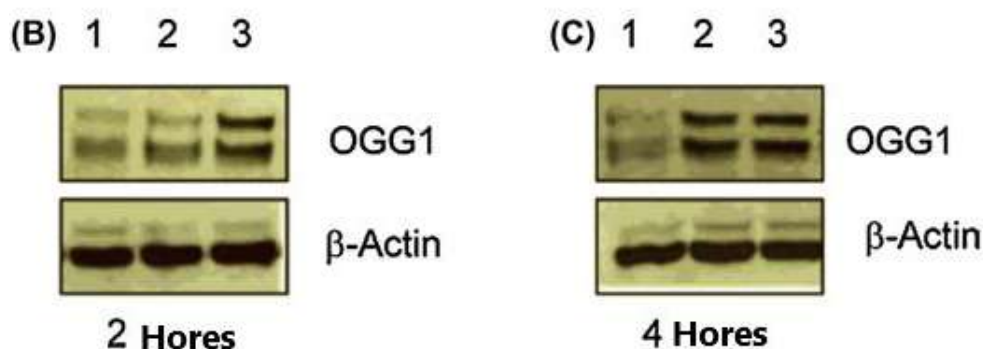
La imatge 12 mostra dues proteïnes isoformes (són una versió d'una proteïna amb petites diferències d'una altra isoforma³⁰ de la mateixa proteïna. Es poden produir diferents formes d'una proteïna a partir de diferents gens però relacionats entre si, o poden derivar-se del mateix gen per *splicing* alternatiu³¹) de la proteïna clau de reparació de l'ADN afectat en la resposta al tractament amb MWCNTs mitjançant l'anàlisi de transferència de Western. Van trobar que l'expressió d'ambdues isoformes s'ha elevat pel tractament amb MWCNTs, que suggereix l'aparició de danys a l'ADN nuclear i mitocondrial a través d'una mutació gènica de base de

³⁰ isoforma: és una de les distintes formes que pot tenir una mateixa proteïna.

³¹ splicing alternatiu: la idea és que d'un sol tros d'ADN (gen), podem obtenir dues o més proteïnes diferents.

guanina (ja que la part afectada és la base³² 8-oxoguanina-ADN glicosilasa 1 [OGG1])

Com s'observa en aquesta mateixa imatge, després de l'aplicació dels MWCNTs hi ha més fosc en les "línies". Això significa que s'ha incrementat la síntesi d'aquesta proteïna reparadora (que repara la base OGG1). De tal forma que podem deduir que els MWCNTs han afectat a l'ADN de tal forma que l'organisme s'ha vist obligat a reparar la zona i en abundància.



Imatge 12. Mostra l'expressió de dues isoformes abans i després de la introducció de MWCNTs a l'organisme. Font: <https://sci-hub.tw/10.1021/nl071303v> [Article original: "DNA damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells"]

3.1.2. Solució a la toxicitat

La modificació de la superfície es considera una manera eficient de canviar la toxicitat dels CNTs. Algunes publicacions han informat que la toxicitat dels CNTs es podria reduir mitjançant la funcionalització³³ de la superfície. Per exemple, es va trobar que els SWCNTs funcionalitzats no tenen cap toxicitat durant 4 mesos. En una experimentació, es va veure que els SWCNTs podien persistir dins dels macròfags del fetge i la melsa sense aparent toxicitat durant 4 mesos. També es van estudiar les relacions de toxicitat i densitat de funcionalització i es va trobar que la toxicitat dels CNTs de forma sistemàtica disminueix augmentant la densitat de

³² base: l'ADN està format per una seqüència de bases disposades en sèrie. Un error en alguna d'aquestes bases suposa la síntesi errònia de proteïnes equivocades. Per això, és necessari reparar aquest tipus d'errors.

³³ funcionalització: fet d'adaptar la superfície d'un material a la funció necessitada.

funcionalització. A més, amb el pas dels anys, s'ha aconseguit arribar a la conclusió que la funcionalització química evita la toxicitat de millor forma que com ho fan els tensioactius³⁴.

El mecanisme del canvi de toxicitat induït per la funcionalització superficial és molt complicat i depèn dels mètodes funcionalitzats, la densitat de funcionalització i diferents grups funcionals. En termes generals, la funcionalització superficial augmenta la dispersió dels CNTs. La funcionalització química pot, fins i tot, escurçar la longitud dels CNTs i trencar la seva estructura grafítica, la qual cosa fa que els CNTs siguin molt més degradables que els propis CNTs primitius. La modificació de la superfície també pot induir abundants grups biocompatibles als CNTs, la qual cosa redueix la toxicitat.

3.2. CNTs en sistemes terapèutics

Altres possibles usos que poden tenir els CNTs són els que van lligats a diferents tipus de teràpies. S'han fet grans esforços per curar malalties, especialment els càncers. Normalment, la resecció³⁵ radical del tumor en la seva primera etapa és l'única manera d'abordar el càncer. No obstant això, els avenços en nanotecnologia i biotecnologia han permès l'aparició d'una altra forma de tractar les malalties. Recentment, els CNTs han estat desenvolupats per part de molts grups amb la finalitat d'intervenir en teràpies per a diverses malalties.

3.2.1. Teràpia farmacològica

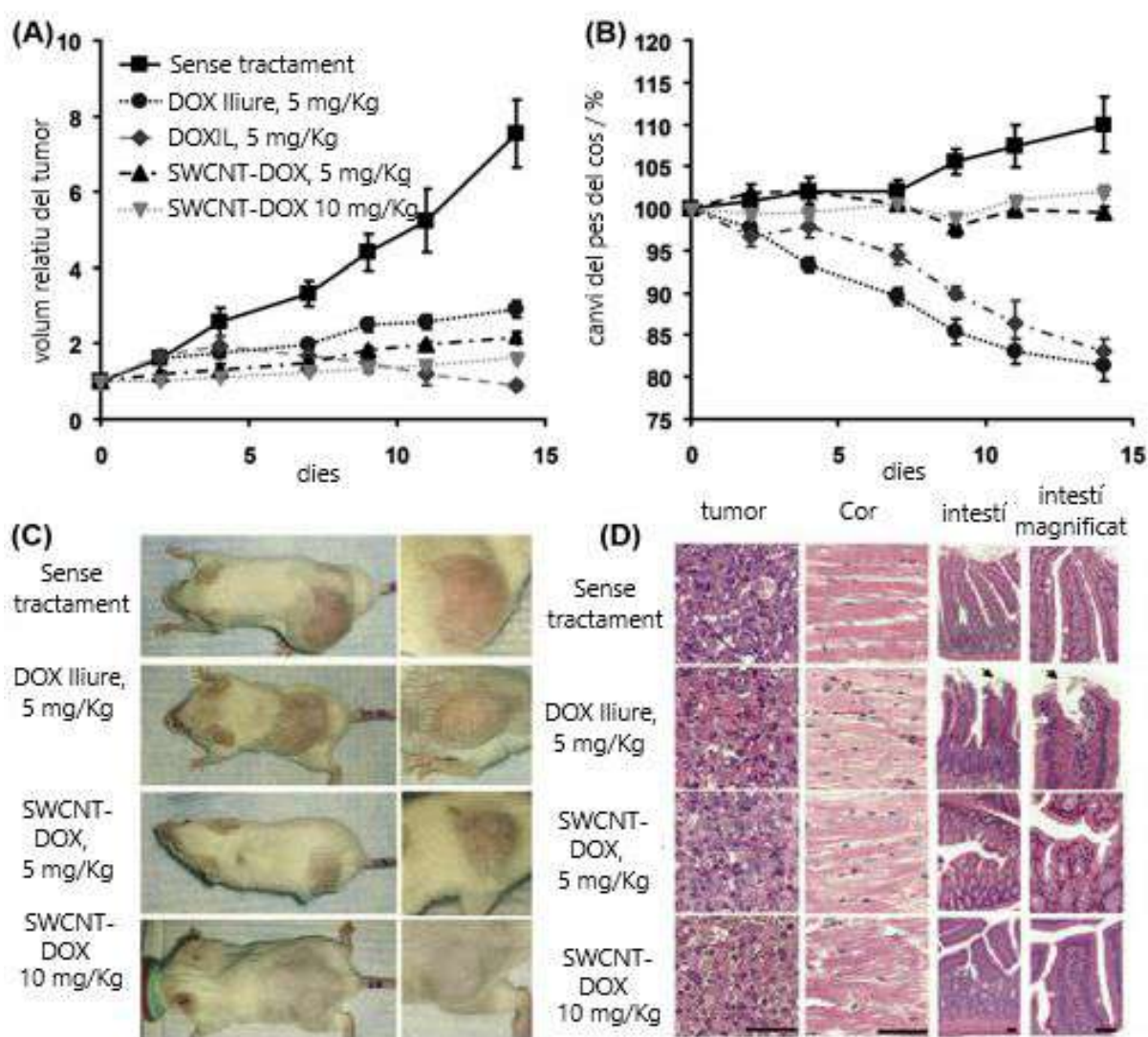
Un grup d'investigadors, entre els quals es troba Arghavan Kavosi³⁶, va introduir doxorubicina (DOX), la medicació químic-teràpica utilitzada en l'extermi del càncer, dintre de SWCNTs per tractar un càncer in vivo. L'experiment va consistir en tractar setmanalment uns ratolins (en mateixes condicions sanitàries, d'alimentació,

³⁴ tensioactiu: substància que influeix en la superfície d'una altra de tal forma que es crea una tensió superficial (com ara el que succeeix amb l'oli i l'aigua immiscibles).

³⁵ resecció: operació quirúrgica que consisteix a llevar o retirar una part més o menys extensa d'un òrgan.

³⁶ pertany al departament de biologia cel·lular i molecular de la facultat de ciències i tecnologia de la universitat Islamic Azad de Tehran, Iran.

etc.) amb DOX lliure, uns amb doxil (una forma de doxorubicina encapsulada, recoberta de polietilenglicol) i uns altres amb SWCNT-DOX a diferents ratolins que portaven el mateix tipus de tumor. El volum relatiu dels ratolins que es van tractar amb SWCNT-DOX ha disminuït molt més que els tractats amb DOX lliure, fet que mostra que el SWCNT-DOX va tenir una alta inhibició, molt més eficient, del creixement del tumor que la DOX lliure. A més, el pes dels ratolins tractats amb SWCNT-DOX era molt millor i, per tant, es pot establir que el tractament amb SWCNT-DOX és molt menys tòxic que el tractament amb DOX lliure o doxil (malgrat que la doxil redueix més el tumor que els SWCNT-DOX).



Imatge 13. Mostra de la baixa toxicitat del SWCNT-DOX en comparació amb el DOX lliure i el doxil.

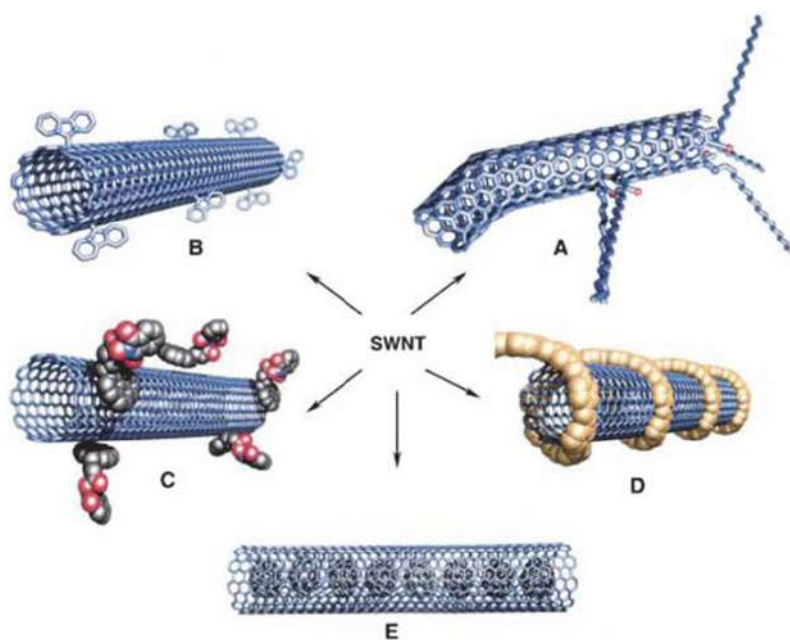
Font: <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/0910/0910.0567.pdf> [Article original: "Supramolecular Stacking of Doxorubicin on Carbon Nanotubes for in vivo Cancer Therapy"]

A més d'aquest tipus de teràpia, on els SWCNTs presenten un paper prometedor i bastant eficaç, com s'ha observat anteriorment, hi ha altres tipus de teràpies on també es podria presentar un gran rendiment per part d'aquests excel·lents nanomaterials, com ara la teràpia fotoacústica, la teràpia fototèrmica i la teràpia fotodinàmica, però aquestes no ens venen al cas.

4. Funcionalització dels CNTs

La funcionalització és un dels passos fonamentals que cal realitzar abans d'estudiar l'acció d'un nanomaterial (com el CNT) sobre algun tipus de funció o activitat. El principal problema amb la majoria dels mètodes sintètics populars és que es produeixen mostres que donen lloc a una barreja de nanotubs de diversos diàmetres i quiralitats o torsions que normalment està contaminada amb impureses metàl·liques i amorfes. Així, els protocols de processament químic post-síntesi que purifiquen els nanotubs, que també poden separar nanotubs individuals segons el diàmetre i la quiralitat aprofitant les seves reactivitats diferencials, són sovint les úniques vies viables cap a la manipulació racional i previsible de les propietats electròniques i mecàniques favorables d'aquests materials.

La funcionalització d'aquest material consisteix bàsicament en el fet d'afegir a aquests nanotubs molècules diferents que condicionen la seva aplicació en diferents situacions, depenent de l'ús que es vulgui donar a aquests. Hi ha diferents tipus de funcionalitzacions per als SWCNTs (i per als CNTs, en general) que es poden observar en la imatge 14 (a la següent imatge):



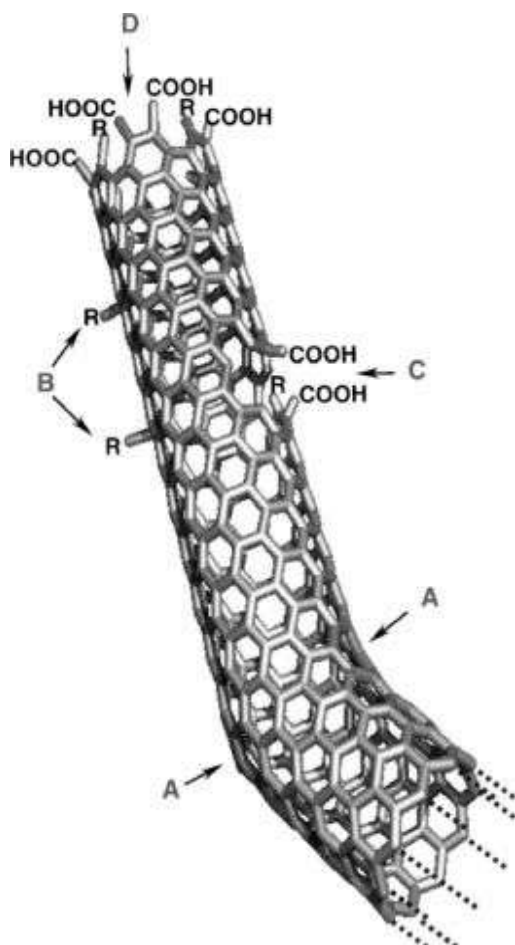
Imatge 14. Representació estructural dels diferents tipus de funcionalització dels SWCNTs. Font: <https://www.intechopen.com/books/carbon-nanotubes-polymer-nanocomposites/functionalization-of-carbon-nanotubes>

- A)** Funcionalització del grup de defectes.
- B)** Funcionalització covalent de paret lateral.
- C)** Funcionalització no covalent exohedra amb tensioactius.
- D)** Funcionalització no covalent exohedra amb polímers.
- E)** Funcionalització endohedra amb, per exemple, ful·luerens C60.

4.1. Funcionalització covalent

Els taps finals dels nanotubs acostumen a estar compostos per hemisferis molt corbats, semblants a mig ful·lerè (semiesfera), que són molt reactius en comparació amb les parets laterals. La funcionalització química es basa en l'enllaç covalent dels grups funcionals en referència a la forma de carboni de CNTs. Es pot realitzar als caps finals dels nanotubs o als laterals que presenten molts defectes.

A la imatge del costat es poden apreciar alguns dels defectes més típics que presenten els nanotubs de carboni després de la seva síntesi:



A) Els anells de cinc o set membres del marc de carboni, en lloc de l'anell normal de sis membres, condueixen a una flexió al tub.

B) Defectes hibriditzats ($R=H$ i OH)

C) Entramat de carboni danyat per condicions oxidatives, que deixa un forat folrat de grups $-COOH$.

D) Final obert del SWCNT, acabat en grups $-COOH$.

Imatge 15. Nanotub de carboni amb defectes després de la seva síntesi. Font: <https://www.intechopen.com/books/carbon-nanotubes-pol-ymers-nanocomposites/functionalization-of-carbon-nanotubes>

El procés de funcionalització es pot realitzar per reacció amb algunes molècules d'alta reactivitat química. En el primer enfocament, la fluorització³⁷ de CNTs s'ha popularitzat per a la investigació inicial de la funcionalització covalent perquè

³⁷fluorització: en referència al fluor, element de la taula periòdica. [F]

s'espera que els laterals dels CNTs siguin inerts. Un altre mètode és la funcionalització defectuosa dels CNTs. Aquests defectes intrínsecs es complementen amb danys oxidatius al marc del nanotub per àcids forts que deixen forats funcionalitzats amb grups funcionals oxigenats. En particular, el tractament dels CNTs amb àcids forts com HNO_3 , H_2SO_4 o una barreja d'aquests, o amb oxidants forts com KMnO_4 , l'ozó o el plasma reactiu tendeixen a obrir aquests tubs i a generar posteriorment grups funcionals oxigenats com l'àcid carboxílic, grups alcoholícs i èsters, que serveixen per lligar molts tipus diferents de fragments químics als extrems i als llocs de defecte d'aquests tubs. En general, els CNTs funcionalitzats amb els mètodes covalents suposen un bon avantatge i és que adquireixen una gran solubilitat en diversos dissolvents orgànics, pel fet que els CNTs tenen molts grups funcionals, com ara grups polars³⁸ o no polars.

El que diferencia la funcionalització covalent de la no covalent [vegeu apartat 4.2.] és que, en la primera, els enllaços entre els CNTs i les molècules funcionalitzants són més difícils de trencar que les atraccions o contactes que hi ha en la no covalent.

4.2. Funcionalització no covalent

L'avantatge de la funcionalització no covalent és que no destrueix el sistema conjugat de les parets laterals del CNT i, per tant, no modifica les propietats estructurals finals del material. La funcionalització no covalent és un mètode alternatiu per ajustar les propietats interfacials dels nanotubs. Els CNTs són funcionalitzats de forma no covalent mitjançant compostos aromàtics, tensioactius i polímers, utilitzant en la seva majoria interaccions hidrofòbiques. En aquests plantejaments, les modificacions no covalents dels CNTs poden fer molt per preservar les seves propietats desitjades, alhora que milloren les seves solubilitats notablement.

³⁸polaritat: separació de la càrrega elèctrica en una molècula

5. Aspectes neuronals

Quan parlem de neurones no ens referim a un tipus qualsevol de cèl·lula al cos, a una simple unitat que conforma el nostre organisme, sinó que les neurones són totes les cèl·lules del cos i al mateix temps cap. Sempre al llarg de la nostra vida acadèmica ja sigui com a alumnes o com a professors hem parlat i ens han donat resposta a qüestions referents al funcionament de cada tipus cel·lular, a com treballa cada cèl·lula del sistema digestiu, del respiratori, del circulatori, etc. Però sempre, malgrat que ens diuen que les neurones són les que transmeten els senyals necessaris per tal que cada mínima estructura del cos funcioni, es tracta de forma igual a aquest tipus cel·lular. Per entendre la importància que té el sistema nerviós al cos, només s'ha d'observar una persona en estat vegetatiu a causa de danys cerebrals o similars, simplement fent malbé un sol òrgan (el cervell), tot el cos ha quedat disfuncional. Ara s'entén perquè una persona pot viure sense ulls, sense un ronyó i, fins i tot, sense mig pulmó i no pas sense cervell.

5.1. Estructura i composició d'una cèl·lula

Les neurones estan altament especialitzades en el processament i la transmissió de senyals cel·lulars. A causa de la diversitat de funcions realitzades en diferents parts del sistema nerviós, hi ha una gran varietat de cèl·lules diferenciades segons la seva forma, la mida i les propietats electroquímiques. Per exemple, el soma (cos) d'una neurona pot variar de 4 a 100 micròmetres de diàmetre.

Una neurona es troba constituïda principalment per un soma (on s'inclou el nucli, la mida del qual varia entre els 3-18 micròmetres de diàmetre). El soma és on es produeix la gran majoria de proteïnes. A més, ramificades des del soma, trobem les dendrites (extensions que tenen la funció de comunicar una neurona amb les altres).

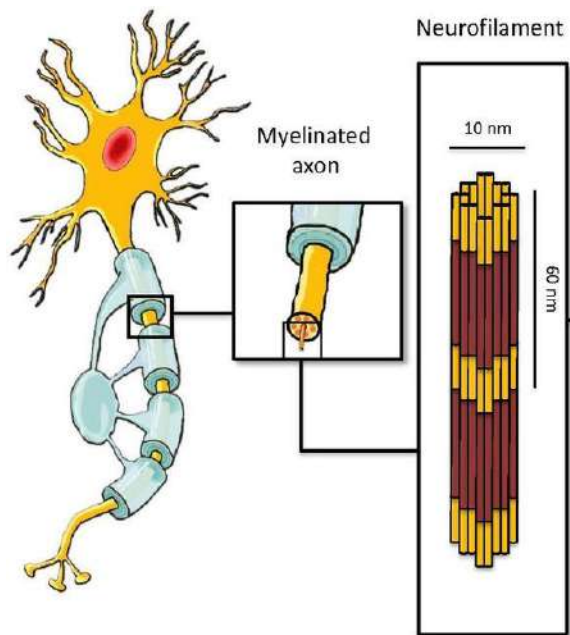
5.1.1. Membrana

Com totes les cèl·lules animals, el cos cel·lular de totes les neurones està tancat per una membrana plasmàtica, una bicapa de molècules lipídiques amb molts tipus d'estructures proteiques incrustades en la mateixa.

Una bicapa lipídica és un potent aïllant elèctric, però en les neurones, moltes de les estructures proteiques incrustades a la membrana són actives elèctricament. Aquests inclouen canals iònics que permeten que els ions amb càrrega elèctrica flueixin a través de la membrana. La majoria dels canals iònics només són permeables per a tipus específics d'ions. Alguns canals iònics estan tensats per tensió, el que significa que es poden canviar entre estats oberts i tancats alterant la diferència de voltatge a través de la membrana. Uns altres tenen rebuig químic, el que significa que es poden canviar entre estats oberts i tancats per interaccions amb productes químics que es difonen a través del fluid extracel·lular. Els materials iònics inclouen sodi, potassi, clorur i calci. Les interaccions entre els canals iònics i les bombes d'ions produeixen una diferència de tensió entre la membrana, típicament una mica menys d'1/10 d'un volt a la línia base. Aquest voltatge té dues funcions: en primer lloc, proporciona una font d'alimentació per a un assortiment de maquinària de proteïna depenent de la tensió incrustada a la membrana; en segon lloc, proporciona una base per a la transmissió del senyal elèctric entre diferents parts de la membrana. Això, entre altres coses permet transmetre corrent elèctric per la neurona, de tal forma que indirectament també s'afavoreix la quantitat de sinapsis que tenen lloc per neurona.

5.1.2. Histologia i estructura interna

El cos cel·lular d'una neurona està recolzat per una complexa malla de proteïnes estructurals anomenades neurofilaments, que juntament amb els neurotúbuls (microtúbuls neuronals) s'uneixen en neurofibril·les més grans.



Imatge 16. Estructura dels neurofilaments. *Font:*
<https://jnnp.bmj.com/content/jnnp/90/8/870/F1.large.jpg>

Curiosament, aquests neurofilaments que intervenen a mantenir l'estabilitat estructural de la neurona s'assemblen bastant als CNTs i això, com veurem més endavant, afectarà pel que fa al punt essencial de la 'regeneració' de les neurones, en un sentit orientat més a la productivitat pel que fa a les sinapsis. Algunes neurones també contenen grànuls de pigment, com ara la neuromelanina (un pigment de color negre marró que és producte de la síntesi de catecolamines) i lipofusina (un pigment marró groguenc), que s'acumulen amb l'edat. Altres proteïnes estructurals importants per a la funció neuronal són l'actina i la tubulina dels microtúbuls. L'actina es troba principalment a la punta dels axons i les dendrites durant el desenvolupament neuronal. Allà, la dinàmica d'actina es pot modular mitjançant una interacció amb microtúbul. Hi ha diferents característiques estructurals internes entre axons i dendrites. Els axons típics gairebé mai contenen ribosomes, excepte alguns segments inicials. Les dendrites contenen reticle endoplasmàtic granular o ribosomes, en quantitats que disminueixen a mesura que augmenta la distància del cos cel·lular. Una altra part que cal conèixer de les

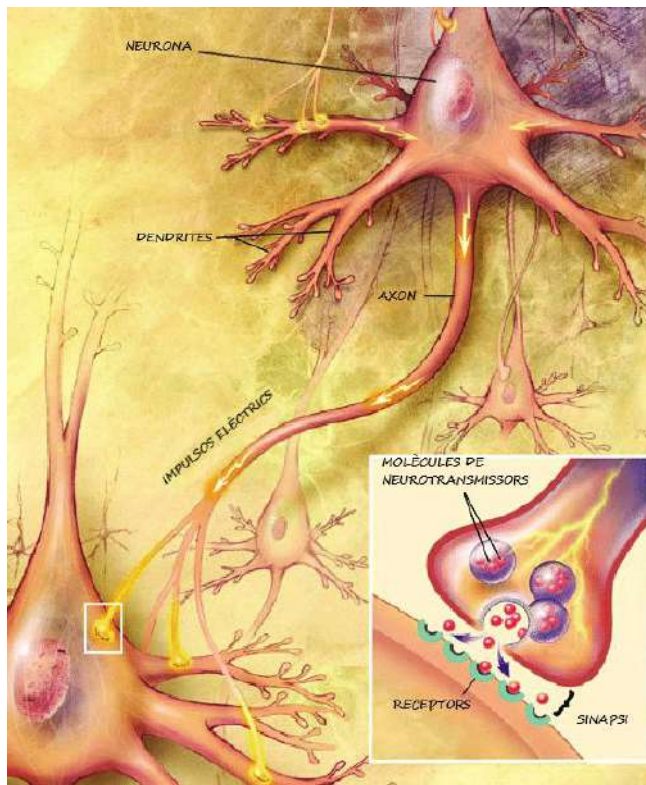
neurones són les beines de mielina que envolten l'axó de les neurones. A la imatge 16, la mielina es troba representada en color blau.

5.2. Connectivitat

Les neurones es comuniquen entre si mitjançant les sinapsis, on el terminal de l'axó d'una cèl·lula contacta amb la dendrita, el soma o, menys freqüentment, l'axó de la següent neurona. La neurona té una maquinària cel·lular que li permet generar descarregues súbites i breus (potencials d'acció), utilitzant aquestes descàrregues com a resposta a diferents estímuls elèctrics. Quan una neurona posa en marxa el seu potencial d'acció, transmet aquesta senyal a altres neurones veïnes o postsinàptiques, a través de l'anteriorment anomenat contacte químic (sinapsi).

Les neurones com les cèl·lules de Purkinje del cerebel poden tenir més de 1000 branques dendrítiques, connectant-se amb desenes de milers d'altres cèl·lules; altres neurones, com les neurones magnocel·lulars del nucli supraòptic³⁹, tenen només una o dues dendrites, cadascuna de les quals rep milers de sinapsis. Les sinapsis poden ser excitadores o inhibidores, respectivament, augmentant o disminuint l'activitat en la neurona diana, respectivament. Algunes neurones també es comuniquen mitjançant sinapsis elèctriques, que són unions directes i elèctriques conductores entre cèl·lules.

³⁹ nucli supraòptic: zona situada a l'hipotàlem.



Quan un potencial d'acció arriba al terminal de l'axó, obre canals de calci amb tensió, permetent que els ions de calci entrin al terminal. El calci fa que les vesícules sinàptiques plenes de molècules de neurotransmissors es fusionin amb la membrana, alliberant el seu contingut a la zona sinàptica.

Imatge 17. Propagació del senyal per l'axó fins a la zona sinàptica. Font: https://www.researchgate.net/figure/A-signal-propagating-down-an-axon-to-the-cell-body-and-dendrites-of-the-next-cell_fig1_283208422

Els neurotransmissors es difonen a través de la fenda sinàptica i activen els receptors de la neurona postsinàptica. Un alt calci citosòlic en el terminal de l'axó desencadena la presa de calci mitocondrial que, al seu torn, activa el metabolisme de l'energia mitocondrial per produir ATP per donar suport a la neurotransmissió contínua.

L'escorça cerebral es caracteritza per una alta densitat de connexions sinàptiques entre les neurones del circuit local. Si aquesta connectivitat és bastant forta i densa, l'activació transitòria del circuit pot portar a un estat en què les neurones de la xarxa es retroalimentin contínuament i portin a un estat d'activitat persistent sostingut autònomament pel circuit. Aquesta activitat persistent que es manté en el circuit

local de l'escorça prefrontal causa de la seva densa connectivitat pot ser per tant el substrat neural de la memòria de treball a nivell de circuit.

5.3. Desordres neuronals

La majoria de desordres neuronals greus que avui dia es coneixen s'originen o bé per una desmielinització o bé per una degeneració axonal. Algunes d'aquestes malalties que s'ocasionen com a conseqüència dels anteriors fenòmens, són per exemple l'Alzheimer i el Parkinson.

5.3.1. Desmielinització

La desmielinització és l'acte de desmielinitzar o la pèrdua de la beina de mielina que aïlla els nervis [vegeu apartat 5.1.2.]. Quan la mielina es degrada, la conducció de senyals al llarg del nervi pot veure's deteriorada o perduda, i el nervi s'asseca ja que la beina de mielina permet una propagació més ràpida del potencial d'acció fent que aquest salti abans d'arribar a cada beina. Per fer-nos a la idea, la majoria sabem que les conduccions de corrent elèctric s'han d'aïllar, perquè de manera contrària es poden produir cortocircuits, doncs de manera molt similar reacciona el nostre sistema nerviós però per altres raons quan no hi ha mielina. Això condueix a certs trastorns neurodegeneratius com l'esclerosi múltiple i la polineuropatia desmielinitzant inflamatòria crònica. Les causes de la desmielinització poden ser diverses. Per exemple, en el cas de l'esclerosi múltiple, malgrat que la causa concreta de la malaltia és desconeguda, se sap que, a causa de factors ambientals, la persona que es troba en un estat de certa predisposició genètica es veu afectada per una resposta immune abnormal, on aquest sistema immune detecta com a estranya una proteïna en la persona, fet que aniquila la mielina de les neurones del pacient.

5.3.2. Degeneració axonal

Les lesions axonals inicialment condueixen a una degeneració axonal aguda, que és una separació ràpida dels extrems proximals i distals en els 30 minuts posteriors a la lesió. La degeneració segueix amb la inflamació de l'axolemma (la membrana cel·lular que envolta un axó). La desintegració granular del citoesquelet axonal i dels orgànuls interiors es produeix després de la degradació de l'axolemma. Els primers canvis inclouen acumulació de mitocondris a les regions paranodals al lloc de la lesió. El reticle endoplasmàtic es degrada i els mitocondris s'inflen i finalment es desintegren. La desintegració depèn de la proteïna de la ubiquitina i la calpaina (causada per l'afluència d'ions de calci), cosa que suggereix que la degeneració axonal és un procés actiu que produeix una fragmentació completa. El procés té, aproximadament, 24 hores al sistema nerviós perifèric i més al sistema nerviós central. Es desconeixen encara les vies de senyalització que condueixen a la degeneració de l'axolemma.

6. Regeneració neuronal amb CNTs

Després d'haver vist i cercat sobre aspectes tant neuronals com referents al nanomaterial en qüestió, podré parlar a continuació del fonament del treball. Com he dit al principi d'aquest projecte, segons el treball realitzat pel grup d'investigadors, on destaquen Maurizio Prato i Laura Ballerini, s'ha observat que, després d'haver fet cultius de neurones en un substrat de nanotubs de carboni, el comportament de les neurones canviava notablement, pel que fa al nombre de sinapsis que es duen a terme i la manera en què es desenvolupa el creixement d'aquest tipus cel·lular. A continuació, exposaré els aspectes rellevants que tenen a veure amb aquesta reacció peculiar de les neurones.

6.1. Enginyeria de teixits

La regeneració de neurones després de lesions cerebrals a portat a investigar la restauració d'una connexió complexa entre les neurones per a les vies del senyal cerebral. Com que els CNTs són elèctricament conductors i posseeixen un diàmetre inferior a 100 nm i una relació d'aspecte (alçada i diàmetre) propera a la de les fibres nervioses, són candidats potencials per al rebrot o la remodelació de neurones. Primerament, s'ha estat investigant el creixement de neurones en MWCNTs modificats amb 4-hidroxynonenal (4-HNE) dipositats sobre cobertes recobertes de polietilè amina. Es va comprovar que les neurones hipocampals⁴⁰ de rata embrionària són capaces de connectar-se a la superfície del nanotub i la presència de 4-HNE afavoreix el creixement de neurites i a la ramificació de neurites en comparació amb els nanotubs no modificats que només admeten el desembarcament. Els CNTs obren així la possibilitat d'incorporar una o més molècules bioactives a la seva superfície per desenvolupar una xarxa de neurones regulada en matrius seleccionades.

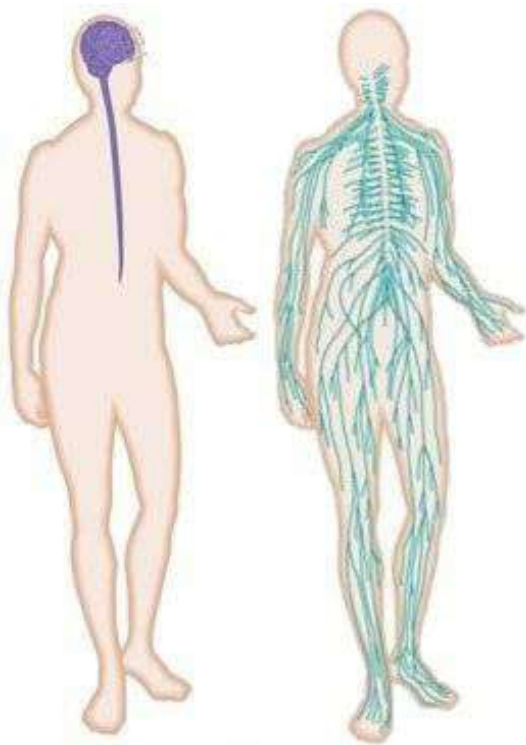
A més, durant els últims anys, es va mostrar la possibilitat d'utilitzar MWCNTs com a dispositius potencials per millorar la transferència del senyal neuronal. Aquests MWCNTs van ser funcionalitzats amb grups pirrollidona tant en puntes com en els laterals per millorar la solubilitat. Els nanotubs funcionalitzats es van dissoldre en dimetilformamida i es van dipositar a la superfície del vidre. Després de l'evaporació del dissolvent, els MWCNTs es van disfuncionar posant el vidre en un forn a 350 ° C sota atmosfera de nitrogen durant 15 min. Amb aquest procediment s'obté una capa estable de nanotubs purificats no funcionalitzats. Després, les neurones hipocampals s'inoculen i creixen a la superfície del vidre i es controla l'aparició de corrents post-sinàptics espontanis (PSC). Es va trobar que la xarxa neuronal cultivada es distribueix de manera discontinua en pel·lícules de nanotubs dispersos i els substrats de CNTs augmenten l'activitat sinàptica espontània i el tret de

⁴⁰ hipocamp: és una estructura del cervell dels vertebrats que té un rol important en la consolidació de la memòria a curt i a llarg termini.

neurones hipocampals; tot i que no es va produir cap canvi significatiu en el potencial d'acció d'aquestes cèl·lules neuronals.

6.2. Regeneració nerviosa perifèrica y central

Primerament, cal destacar que les següents són dos tipus de regeneració natural, és a dir, no es duu a terme de manera artificial sinó que és el propi organisme, el nostre propi cos, qui les realitza.



Tot seguit, cal fer una petita explicació bàsica del que són el sistema nerviós central (SNC) i el perifèric (SNP). El sistema nerviós central fa referència a les diferents parts o segments que componen l'encèfal i també a la medulla òssia. El que principalment diferencia el SNC del SNP és que el SNP es troba estès més enllà de la barrera hematoencefàlica i, a més, no es troba protegit per ossos.

Imatge 18. Representació gràfica del SNC i SNP. Font: <https://www.psicoactiva.com/blog/sistema-nervioso-somatico-sns-anatomia-funcion/>

La neuroregeneració del sistema nerviós perifèric (PNS) es produeix fins a un nivell important. Posteriorment a una lesió axonal, les neurones perifèriques activen una varietat de vies de senyalització que activen gens pro-creixement, donant lloc a la reforma d'un con de creixement funcional i regeneració. El creixement d'aquests axons també es regeix per factors quimiotàctics segregats per les cèl·lules de Schwann⁴¹. La lesió al sistema nerviós perifèric provoca immediatament la migració de fagòcits, cèl·lules de Schwann i macròfags al lloc de la lesió per tal d'eliminar les deixalles com el teixit danyat que és inhibidor de la regeneració. Quan es trenca un axó nerviós, l'extrem unit encara al cos cel·lular s'anomena segell proximal, mentre que l'altre extrem s'anomena segment distal. Després de la lesió, l'extrem proximal s'infla i experimenta alguna degeneració retrògrada, però un cop esborrades les deixalles, comença a brotar axons i es pot detectar la presència de cons de creixement. Les taxes de creixement de l'axó humà poden arribar a 2 mm / dia en nervis petits i 5 mm / dia en nervis grans. El segment distal, però, experimenta una degeneració a les hores posteriors a la lesió; els axons i la mielina es degeneren, però l'endoneuri⁴² es manté.

A diferència de les lesions del sistema nerviós perifèric, existeix una limitació per les influències inhibidores de l'entorn glial i extracel·lular i, per tant, la lesió al sistema nerviós central no va seguida d'una regeneració extensiva.

D'altra banda, una degeneració més lenta del segment distal que la que es produeix en el sistema nerviós perifèric també contribueix al medi inhibidor, ja que la mielina inhibidora i les restes axonals no s'eliminen tan ràpidament. Tots aquests factors contribueixen a la formació del que es coneix com a cicatriu glial, que els axons no poden créixer. El segment proximal intenta regenerar-se després de lesions, però el seu creixement és obstaculitzat pel medi ambient. És important tenir en compte que s'ha demostrat que els axons del sistema nerviós central creixen en entorns permissius; per tant, el principal problema per a la regeneració axonal del sistema

⁴¹ cèl·lules de Schwann: són cèl·lules que envolten l'axó (la prolongació) d'una neurona.

⁴² endoneuri: revestiment que envolta els nervis.

nerviós central és creuar o eliminar el lloc de lesió inhibidora. Un altre problema és que la morfologia i les propietats funcionals de les neurones del sistema nerviós central són altament complexes, per això una neurona funcionalment idèntica no es pot substituir per una altra.

6.3. Aplicació dels CNTs en regeneració i estimulació nerviosa

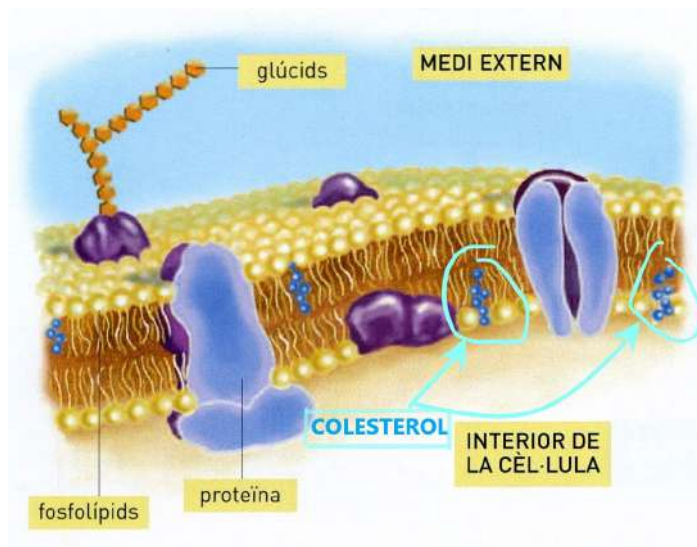
Les neurones es troben exposades contínuament a senyals que provenen del medi extracel·lular, on s'inclouen també indicis físics genuïns (com ara ones mecàniques o topogràfiques) a una nanoescala. Són moltes les estratègies que s'han intentat portar a terme per tal de decorar les bio-interfícies amb característiques de tipus nanomètric i la incorporació de nanomaterials s'ha tornat una de les més prometedores. Segons l'estudi que va realitzar el grup d'investigadors on s'inclou a Prato i a Ballerini el 2018, s'ha pogut comprovar que els CNTs afecten positivament en el creixement dels axons de les neurones (d'aquí la idea de regeneració amb aquests nanomaterials) i en la millora en la construcció de connexions sinàptiques de les neurones. Parant l'atenció a la precisió, el medi extracel·lular, quan artificialment és reconstruït amb MWCNTs, indueix una sinaptogènesi⁴³ en les neurones cultivades.

La majoria dels estudis actuals sobre l'estabilitat de la membrana biològica en resposta a nanomaterials es centren en la influència de la funcionalització o en la forma i mida dels materials en els mecanismes. En aquest marc, s'ha demostrat que les membranes neuronals es recuperen, fins i tot, quan es donen perforacions transitòries o deformades per agulles (nano) o altres sistemes de lliurament intracel·lulars (nano). Els SWCNTs solubles en aigua que es van empeltar amb una deficiència de poli-etilenglicol (un tipus de funcionalització), quan s'afegeixen al medi de cultiu, presumiblement afecten l'endocitosi (introducció de les vesícules que s'arriben d'una neurona en una altra) de les vesícules alliberades al lloc pre-sinàptic. No obstant això, manca informació més específica sobre l'estabilitat de la membrana

⁴³ sinaptogènesi: generació de sinapsis (estructures mitjançant les quals es comuniquen les neurones)

neuronal quan s'interconnecta crònicament amb substrats de creixement. Les membranes cel·lulars estan exposades directament als MWCNTs però no hi ha informes sobre els efectes que exerceixen les interfícies amb MWCNTs sobre l'equilibri de la membrana neuronal. Estudis recents van orientar la interacció entre membranes lipoides⁴⁴ i MWCNTs en suspensió. Les simulacions moleculars van mostrar que es van observar canvis significatius en l'estructura de les molècules de lípids individuals i en el seu embalatge bidimensional quan es van absorbir MWCNTs a les membranes cel·lulars i posteriorment van perforar la bicapa lipídica.

L'estudi de Prato i companyia va consistir essencialment en els següents procediments. Aquí, mitjançant electrofisiologia unicel·lular i microscopia d'immunofluorescència, van fer un seguiment de la dinàmica de la transmissió excitatòria mediada pel receptor del glutamat⁴⁵ en les neurones hipocampals cultivades connectades a MWCNTs. Principalment, es van adreçar específicament a si els MWCNTs, un cop connectats a neurones, van influir en la transmissió sinàptica modulant l'estructura i la dinàmica de la membrana lipídica.



El projecte es va centrar en particular en el colesterol, un lípid representat en gran part a les membranes neuronals conegudes per regular l'alliberament de vesícules presinàptiques.

Imatge 19. Colesterol a la membrana cel·lular. Font: <https://www.enciclopedia.cat/ec-gec-0153684.xml>

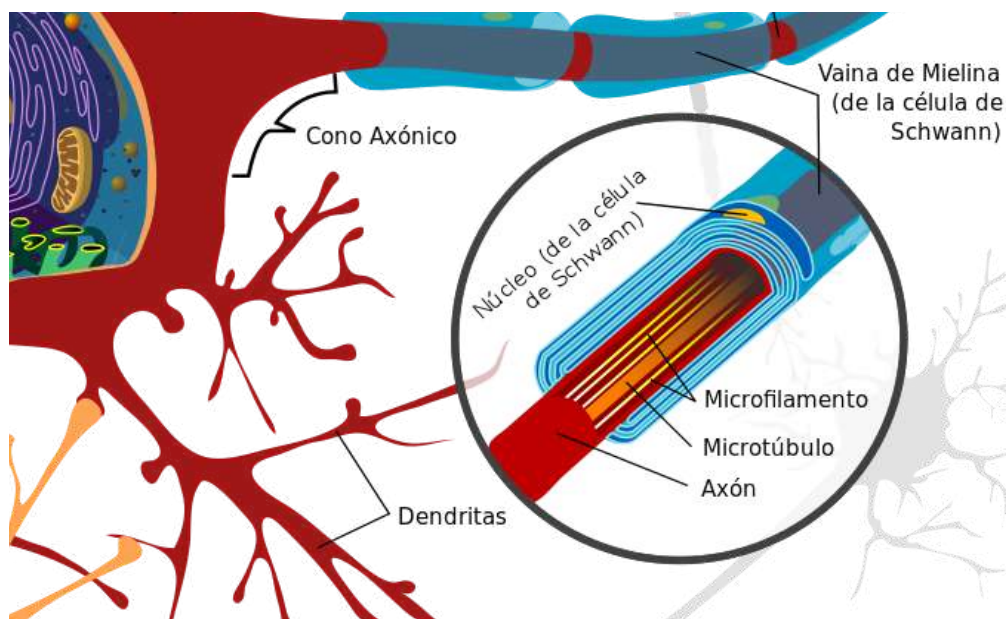
⁴⁴ lipoides: fa referència als lípids.

⁴⁵ glutamat: molècula clau en el metabolisme cel·lular.

Per a una primera avaluació general, es van utilitzar membranes lipídiques artificials que, en connectar-se a MWCNTs, van ser més estables, pel que fa als controls, a un agent d'esgotament del colesterol, és a dir, a una ciclodextrina⁴⁶. D'altra banda, en les neurones cultivades, les interfícies de MWCNTs no van alterar la distribució de colesterol de la membrana ni van impedir el seu posterior esgotament per ciclodextrina. Inesperadament, mitjançant l'eliminació del colesterol, van desemmascarar la capacitat que tenen els MWCNTs de donar forma a poblacions de vesícules presinàptiques (les vesícules que passen d'una neurona a una altra).

7. Solució de l'adequació dels nanotubs de carboni a les neurones

Ara que ja hem parlat dels CNTs per un costat i de les neurones per un altre, com podem relacionar els CNTs amb la possible regeneració que poden tenir aquests en les neurones? Quines són les propietats dels CNTs rellevants que els confereixen aquesta capacitat regenerativa?



Imatge 20. Representació gràfica dels microfilaments que conformen l'interior de les neurones. Font: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1c/Complete_neuron_cell_diagram_es.svg/1024px-Complete_neuron_cell_diagram_es.svg.png

⁴⁶ ciclodextrina: amb estructura similar a la glucosa.

És peculiar que els microfilaments de les neurones que tenen la funció de conferir-li l'estructura que té la neurona i que també intervenen en la seva extensió i, per tant, en el seu creixement s'assemblin tant als MWCNTs. [vegeu imatge 20] És molt probable que la interacció entre MWCNTs i neurones es vegi afavorida a causa d'aquesta similitud estructural.

Pel que fa a les propietats necessàries per dur a terme la correcta compatibilitat neuronal, sabem que les neurones es troben en una zona on hi ha una gran activitat elèctrica. Aquesta activitat elèctrica i els canvis de potencial al llarg de les neurones són els que fan que es pugui transmetre correctament el missatge d'una neurona a una altra. Però en ocasions aquesta transmissió es veu interrompuda per la degradació de, per exemple, les aglomeracions de mielina que es troben en els axons (que obliga a la neurona a accelerar la transmissió del potencial elèctric). Aquesta degeneració pot derivar en moltes malalties degeneratives, com ara l'esclerosi múltiple, on es va perdent gradualment la mobilitat. No obstant això, si hi hagués al medi neuronal nanotubs de carboni aquesta degeneració probablement es compensaria mitjançant l'alta conductivitat elèctrica que tenen els nanotubs de carboni (una conductivitat molt més alta que la del coure). A més, gràcies a la conductivitat bal·lística dels MWCNTs, la propagació d'aquest potencial seria immediata i, per tant, la reacció a fenòmens com ara el dolor seria molt més immediata que la que hi hauria si no hi hagués nanotubs de carboni. Una altra propietat que beneficia la regeneració neuronal és l'alta flexibilitat dels MWCNTs, que no forçaria les neurones físicament (evitant la seva mort). Però, podríem també pensar que si tenen una gran flexibilitat, la fragilitat també ho serà. De fet, no és així ja que com he dit en els anteriors apartats, els MWCNTs i, en general, tots els CNTs tenen una gran resistivitat mecànica.

Com a resultat d'això, podem pensar en la possibilitat d'aplicar CNTs (exactament MWCNTs) a les neurones de rosegadors i, posteriorment, a neurones humanes in vitro (al laboratori) i, si la resposta és l'esperada, potser seria possible plantejar-nos un futur on els MWCNTs siguin un mètode de teràpia més.

8. Conclusió

En perspectiva del que he cercat i exposat, anteriorment, puc determinar que els nanotubs de carboni (CNTs), gràcies a les propietats extraordinàries que presenten, que fins i tot suposen una millora respecte d'altres materials que coneixem a l'àmbit quotidià, esdevenen perfectes per a interactuar amb les neurones ja que es troben en una zona d'alta activitat elèctrica. Però, alhora, l'aplicació de nanotubs de carboni a les neurones humanes esdevé una decisió precipitada ja que hem de tenir en compte molts aspectes com ara la toxicitat dels nanotubs que, com hem dit abans, presenta un paper letal en rates quan aquests són inhalats o mantenen contacte amb determinats òrgans.

Malgrat aquests perills, això no significa que s'hagi d'abandonar els nanotubs de carboni per a l'aplicació neuronal o biològica en general, sinó que s'ha de fomentar la investigació dels nanotubs de carboni per a aquesta aplicació en específic. Per aquesta raó, he dut a terme també una part experimental per al meu treball de recerca.

PART PRÀCTICA

És veritat que ja s'ha parlat en profunditat dels CNTs per separat, de les neurones per separat i també, finalment, de la relació que mantenen pel que fa al comportament de les neurones quan es troben en contacte amb els CNTs. Però, realment podem afirmar quelcom que es troba en dubte amb una simple explicació teòrica? Malgrat que l'estudi teòric de la realitat pot ser molt profitós, un problema no ha de dependre excusivament d'aquest. La majoria d'estudis científics, per no dir tots, tenen com a objectiu la possible aplicació del que s'està estudiant en la vida pràctica, per tant, és indispensable la comprovació de la funcionalitat dels objectes d'estudi per mitjà de l'experimentació.

La part experimental del meu treball de recerca té com a objectiu comprovar la relació entre substrat i comportament cel·lular, utilitzant fibroblasts de rata com a model cel·lular i àcid polilàctic com a substrat. Aquest treball pràctic em servirà com a modelització experimental davant la impossibilitat de treballar amb neurones i nanotubs de carboni. Tal i com he explicat en la introducció del treball, la part experimental l'he dut a terme al Parc Científic de Barcelona (PCB) amb la tutoria d'Adrián López Canosa.

1. Formulació del problema

Al final d'aquesta pràctica espero poder respondre la següent pregunta: Quin canvi experimentarà el citoesquelet dels fibroblasts si els exposem a una bastida biomimètica alliberadora de lactat disposada com a una estructura lineal?

2. Hipòtesi

Potser, si exposem els fibroblasts a una bastida de fibres d'àcid polilàctic alineades (una mateixa direcció), podrem observar que el citoesquelet dels fibroblasts s'adapta a aquestes estructures de tal forma que s'aprecia una prolongació en aquest.

3. Objectiu i enfocament

En la realització de la part experimental m'he proposat els següents objectius:

- Fabricar una bastida d'àcid polilàctic adaptable al creixement cel·lular mitjançant la tècnica d'*electrospinning*.
- Caracteritzar morfològicament la bastida d'àcid polilàctic per determinar la seva adequació al creixement cel·lular.
- Realitzar un cultiu de fibroblasts de rata, caracteritzar morfològicament les cèl·lules i fer un marcatge per fluorescència.
- Avaluar la interacció entre el tipus de substrat (vidre o àcid polilàctic) i comportament cel·lular dels fibroblasts.

4. Justificació del treball

Aquest projecte s'ha dut a terme principalment amb el propòsit de constatar com la tecnologia i la biologia poden ser potencialment revolucionàries si s'associen, originant el que avui dia anomenem biotecnologia. Amb aquest treball es mostra clarament com tot el que coneixem, tots els aspectes que conformen la nostra realitat mantenen relacions que, malgrat que a nosaltres ens sembla estrany, són molt pròximes. Avui dia sentim com una mena d'obligació constant per classificar el que ens envolta, però, de fet, no hauria d'haver-hi cap ja que el coneixement és una unitat on tot es relaciona, una classificació dels aspectes suposa una individualitat mutua entre els temes i, en conseqüència, comencem a creure que res està relacionat amb res, que cada aspecte és únic i diferent de l'altre; i això principalment afecta a l'hora d'establir quina és la resposta a moltes qüestions, que per si soles no tenen sentit però que si es relacionen presenten una única resposta comuna, la veritat.

5. Marc teòric

5.1. Obtenció de làcid poli-làctic

L'àcid poli-làctic o també conegut amb el nom de PLA és un polièster termoplàstic⁴⁷ que s'ha estudiat durant més de quaranta anys a l'àmbit científic i industrial, ja que presenta bones propietats d'enginyeria. La seva característica més interessant és la biodegradabilitat i que prové de recursos naturals. Malgrat això, el polímer presenta una sèrie de deficiències com una temperatura de transició vítria⁴⁸ baixa i una resistència tèrmica dolenta que ha limitat l'ús del biopolímer en algunes aplicacions. Malgrat això, ofereix també una gran disponibilitat i compatibilitat en altres aplicacions o usos.

5.2. Tècnica d'*electrospinning*

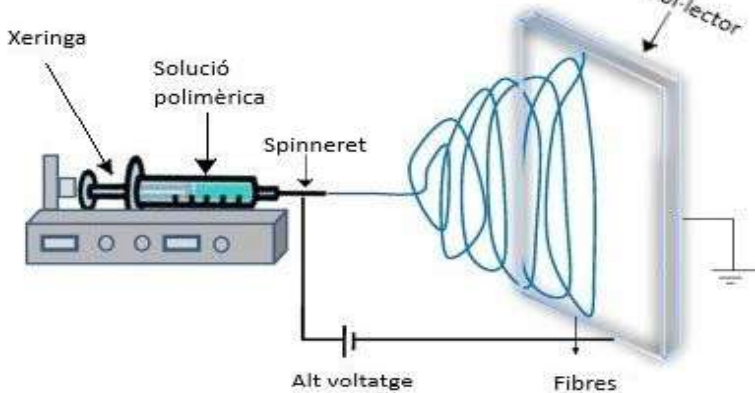
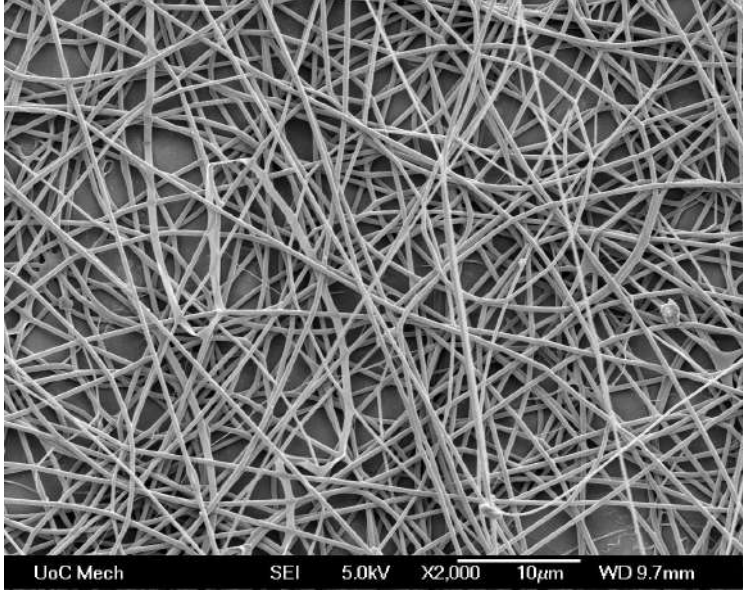
Al llarg de l'experimentació utilitzarem diferents procediments i tècniques per tal d'arribar a obtenir els resultats desitjats. Una de les tècniques utilitzades és la de l'*electrospinning*. La tècnica d'*electrospinning*, ha estat àmpliament estudiada durant els últims anys gràcies a la possibilitat de crear fibres en escala micro i nanomètrica per a una gran varietat d'aplicacions biomèdiques, aquesta tècnica aporta als elements desenvolupats diverses característiques com: àmplia superfície per unitat d'àrea, porositat i una sèrie de propietats mecàniques, esdevenint atractiva a nivell biotecnològic. Bàsicament, el que fa aquesta tècnica és que a partir d'una solució d'un polímer pot fabricar nanofibres/bastides. L'estructura de la màquina d'*electrospinning* està formada per una bomba injectora on es troba col·locada la solució polimèrica, una font d'alt voltatge i un col·lector, on s'acaben dipositant els fils polimèrics. El tipus de fibres a les quals pot donar lloc poden ser de dos tipus depenent de l'estructura que tenen. Es pot donar lloc a fibres amb una estructura

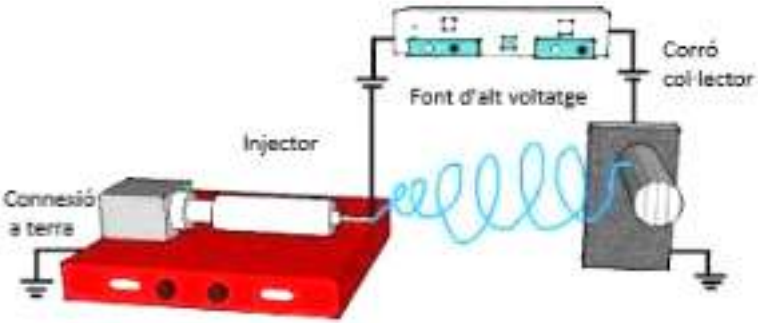
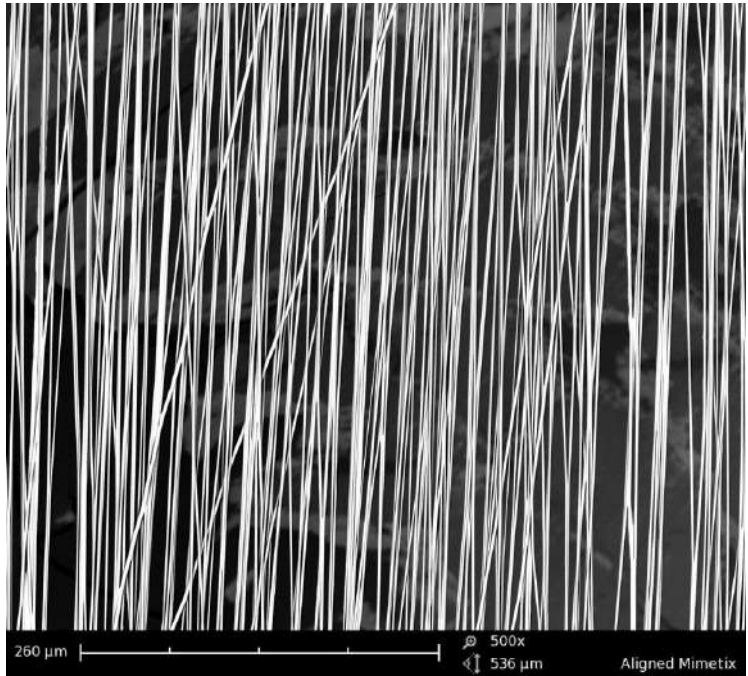
⁴⁷ termoplàstic: qualitat d'alguns materials com l'àcid poli-làctic en vers la qual aquest polímer és rígid a temperatura ambient i mal·leable a altes temperatures.

⁴⁸ temperatura de transició vítria: és la temperatura a la qual un polímer deixa de ser rígid i comença a estovar-se. [la del PLA és baixa]

random (aleatòria) o alineada. La diferència entre un tipus i un altre depèn exclusivament de la forma d'electrospinning que s'ha utilitzat.

→ La següent figura mostra clarament la diferència entre els dos tipus:

METODOLOGIA PER FABRICAR O DISSERNYAR FIBRES RANDOM (aleatòries)	 Imatge 21. Procés de fabricació de les fibres RANDOM. Font: http://polybiolab.ippt.pan.pl/images/electrospinning.jpg
MICROSCOPIA -RANDOM-	 Imatge 22. Fibres RANDOM observades al microscopi a 2000 augments. Font: http://sites.ieee.org/gold/files/2015/11/ivo-wit_hmag-image16_e.jpg

METODOLOGIA FIBRES ALINEADES	 Imatge 23. Procés de fabricació de fibres alineades. Font: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSOmzNPFu_z-iqAXa1eFht0jqcJRzv4h0ycFmYd3xHry7NTxEIlgng
MICROSCOPIA -ALINEACIÓ-	 Imatge 24. Fibres alineades observades al microscopi a 500 augments. Font: https://www.electrospinning.co.uk/wp-content/uploads/2018/07/Aligned-fibres-964x1024.jpg

Es pot observar, per mitjà de les dues primeres imatges, que, quan es realitza la tècnica d'*electrospinning* on el col·lector és una superfície plana i simple, el resultat al microscopi és que les nanofibres del polímer presenten una estructura aleatòria i desordenada mentre que, en les dues altres imatges, s'observa com, utilitzant un

corró col·lector, s'obtenen bastides amb una estructura lineal on les fibres presenten una alineació molt ben aconseguida.

5.3. Marcatge fluorescent

La immunofluorescència és un conjunt de tècniques on s'utilitzen anticossos per detectar i localitzar els antígens específics en les cèl·lules i els teixits. La immunofluorescència consisteix en quatre passos essencials (si algun dels passos es duu a terme erròniament o no es realitza, es pot conduir a resultats poc relatius i lògics):

*Fixació: és un procés que intenta preservar la localització, la composició i l'estructura del material biològic (cèl·lules) a analitzar, preservant el màxim possible la situació que s'hauria desenvolupat in vivo⁴⁹. Existeixen diferents maneres i formes de realitzar la fixació (això dependrà del tipus de microscopia que es vagi a utilitzar i de l'estructura subcel·lular que es vol detectar). En el nostre cas volem detectar l'actina (proteïna globular molt abundant al citoesquelet de les cèl·lules) i, per tant, utilitzarem el paraformaldehid. És una substància molt utilitzada en estudis de immunofluorescència (com aquest) i penetra més ràpidament dintre de les cèl·lules en comparació amb altres processos.

*Permeabilització: procés que produeix uns porus en les membranes de les cèl·lules de tal forma que es permet l'entrada dels anticossos a la cèl·lula (ja que l'actina és una proteïna que es troba a l'interior de les cèl·lules, al citoesquelet). Nosaltres utilitzarem el Triton-X-100, NP40.

*Bloqueig: la seva funció és la d'evitar interaccions inespecífiques dels anticossos amb el material biològic a analitzar, de tal forma que es

⁴⁹in vivo: = en un organisme viu.

redueix la marcació inespecífica. Nosaltres utilitzarem l'Albúmina bovina sèrica.

*Immunodetecció: és quan els anticossos ja han reconegut els antígens i es produeix la immunofluorescència.

6. Metodologia aplicada

La metodologia utilitzada està basada en el procediment atent dels passos que s'han d'utilitzar per aconseguir una conclusió que respongui els objectius proposats. Tot aspecte que sigui necessari per a concloure el treball (normes, pautes, etc) formarà part del mètode o procediment aplicat en l'experimentació. Amb l'absència de qualsevol aspecte del treball o la seva incorrecta efectuació donaria lloc a possibles efectes negatius a l'hora de conèixer els resultats de l'experiment.

7. Materials (rellevants)

EQUIP D'ELECTROSPINNING



Imatge 25. Equipació d'electrospinning utilitzat durant l'estança al PCB. Font: pròpia.

AGENT D'ENTRECREUAMENT - component del plàstic



Imatge 26. Agent d'entrecreuament. Font: <http://m.sanjichem.com/crosslinking-agent/>

POLIDIMETILSILOXÀ (PDMS) - component del plàstic



Imatge 27. Polidimetilsiloxà (PDMS) [component del plàstic]. Font: https://www.alibaba.com/product-detail/CAS-9016-00-6-Dimethylpolysiloxane-PDMS_60701421309.html

HÒSTIA DE SILICI



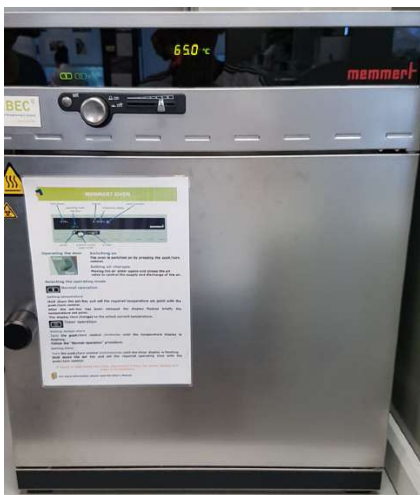
Imatge 28. Hòstia de Silici. *Font: pròpia*

CÀPSULA DE BUIDAT



Imatge 29. Càpsula o cambra de buidat. *Font: pròpia*

FORN



Imatge 30. Forn de laboratori. *Font: pròpia*

TRIPSINA



Imatge 31. Tripsina⁵⁰. Font: pròpia

PBS (tampó fosfat salí)



Imatges 32. PBS (tampó fosfat salí). Font: pròpia

CAMBRA ESTERILITZADA



Imatge 33. Cambra esterilitzada. Font: pròpia

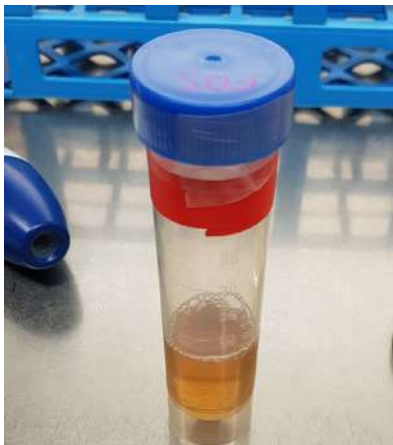
⁵⁰ tripsina: enzim que trenca proteïnes i que, per tant, s'utilitza per trencar les unions entre les cèl·lules en un cultiu d'aquestes.

MAJOR CONSTITUENT DEL MEDI DE CULTIU (Advanced DMEM)



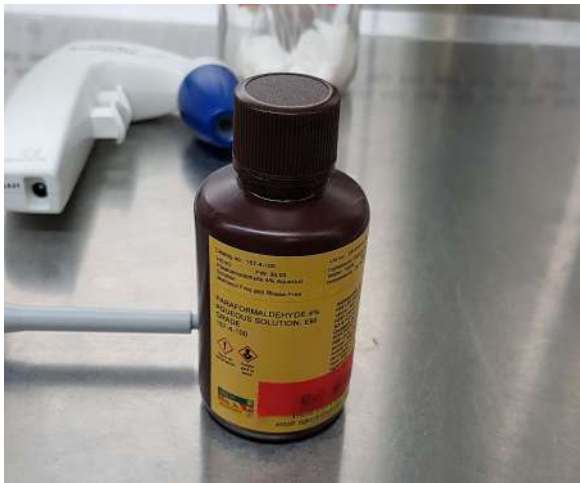
Imatge 34. Medi de cultiu. *Font: pròpia*

FBS (sèrum boví fetal)



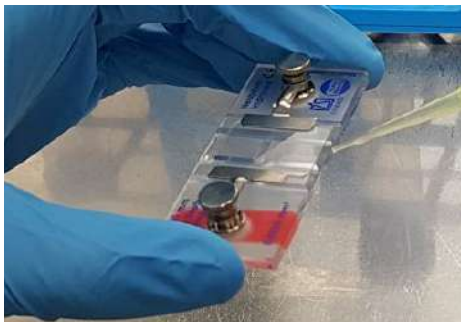
Imatge 35. Sèrum boví fetal. *Font: pròpia*

PARAFORMALDEHID (per matar les cèl·lules)



Imatge 36. Paraformaldehid. Font: pròpia

Cambra de Neubauer (comptador manual de cèl·lules)



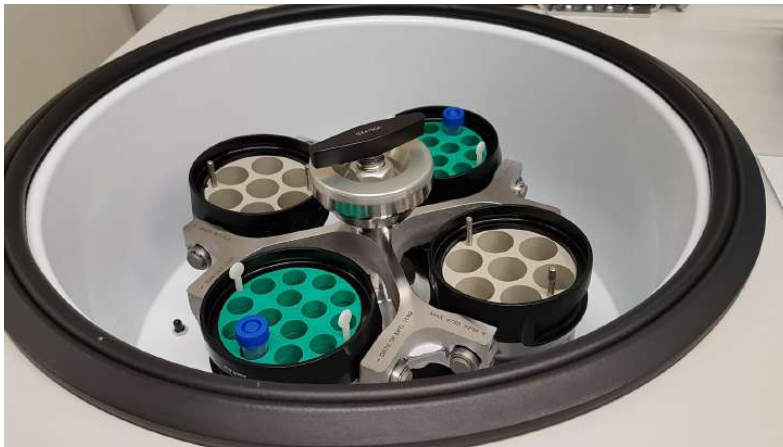
Imatge 37. Cambra de Neubauer. Font: pròpia

MINICENTRIFUGADORA



Imatge 38. Minicentrifugadora. Font: pròpia

CENTRIFUGADORA



Imatge 39. Centrifugadora. *Font: pròpia*

8. Procediment pas a pas

8.1. Muntatge de l'experiència

Al llarg d'aquesta part del projecte es procedirà a realitzar tots aquells procediments que ens permetran observar, finalment, si el citoesquelet dels fibroblasts interacciona d'alguna forma amb el polímer. A continuació s'exposaran tres pràctiques o procediments al laboratori del PCB:

-Síntesi de la scaffold o bàstida a partir del polímer: el que es farà és sintetitzar la base o substrat que actuarà com a biomaterial. Aquesta superfície es construirà amb l'àcid poli-làctic⁵¹ que és la solució polimèrica.

-Fabricació del plàstic: és probablement el procediment més simple i senzill. Consisteix a crear una barreja amb polidimetilsiloxà (pdms) i l'agent d'entrecreuament que posteriorment es dipositarà en els motlles de les hòsties de silici.

⁵¹ àcid poli-làctic: d'ara endavant l'anomenarem PLA.

-Marcatge fluorescent dels fibroblasts: és el procediment més llarg i potser més complex. Primerament, s'hauran de cultivar les cèl·lules amb una renovació del medi constant i una vegada ja hagin crescut les cèl·lules es duu a terme una sèrie de processos a través dels quals es podrà realitzar el marcatge amb faloïdina-Alexa 488 i amb DAPI. La faloïdina-Alexa 488 és una sonda d'actina filamentosa, és a dir, detecta l'actina i manifesta la seva presència de forma fluorescent. L'actina és una proteïna globular que forma els microfilaments (un dels components del citoesquelet cel·lular). D'aquesta manera quan s'apliqui aquest marcatge fluorescent, al microscopi esperarem poder observar com és la disposició espacial del citoesquelet dels fibroblasts en funció de l'estructura del substrat. D'altra banda, el DAPI és un marcador fluorescent que s'uneix fortament a regions enriquides amb grans quantitats d'adenina i timina. Com que l'adenina i la timina són bases nitrogenades molt abundants en l'ADN, llavors quan s'aplica el DAPI a una cèl·lula, no és difícil d'entendre que la part que es trobarà marcada és el nucli (lloc on es troba l'ADN de les cèl·lules).

8.2. Execució de l'experiència

8.2.1. Síntesi de la scaffold

Durant aquesta part de l'experiència el que vam fer va ser sintetitzar per mitjà de la tècnica de l'*electrospinning* (una tècnica on es poden sintetitzar bastides -superfície on es disposaran les cèl·lules posteriorment- a partir d'una solució polimèrica que en aquest cas és l'àcid polilàctic). El que vam fer abans de posar en funcionament l'equip d'*electrospinning* va ser tallar una làmina de paper d'alumini amb una mesura una mica major a la d'un full de paper DIN A4 (21 x 32 cm).



Imatge 40. Làmina amb 3 portaobjectes.

Font: pròpia

A continuació, a sobre d'aquesta làmina vam enganxar 3 cobreobjectes amb una separació igual entre ells. Aquests cobreobjectes els vam disposar en sèrie entre ells. L'estructura final que es va obtenir es la que s'observa en la imatge del costat. Es van enganxar amb cinta per poder desenganxar els portaobjectes posteriorment, després d'haver realitzat la tècnica de l'*electrospinning*. L'objectiu és que la bastida, els filaments polimèrics, es dipositin de forma lineal sobre els els tres cobreobjectes.

Tot seguit d'haver realitzat l'anterior, el que vam fer és embolcallar el rotor de l'equip d'*electrospinning* (una mena de corró) amb la làmina d'alumini procurant no trencar els cobreobjectes (que són molt fràgils). A la següent imatge es troba marcat el rotor de l'equip en vermell:



Imatge 41. Senyalització del recol·lector cilíndric a l'equip d'*electrospinning*. Font: pròpia

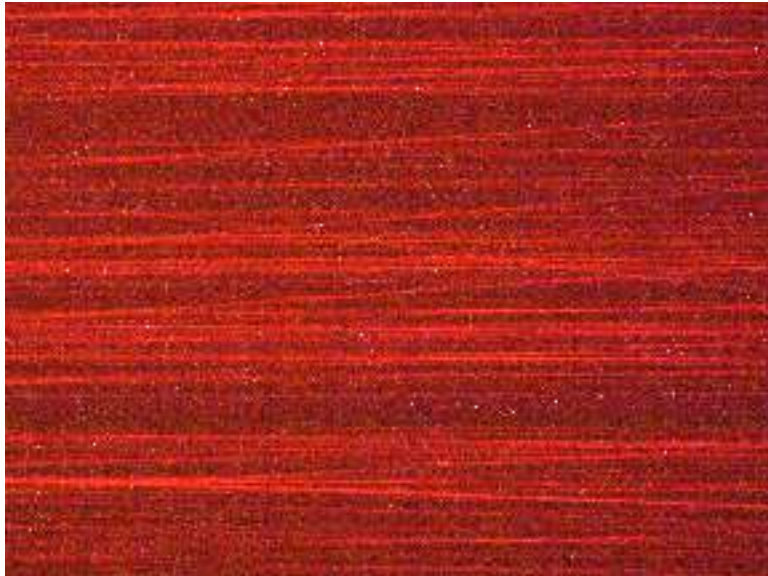
Una vegada ja fixada la làmina vam accionar l'equip d'*electrospinning* i el cilindre va començar a recol·lectar els filaments. Aquests filaments arribaven fins al cilindre a causa d'una diferència de càrrega que es crea al voltant de la gota que surt de la xeringa i que fa que aquesta es vagi allargant cada vegada més fins formar un fil. És important que l'equip estigui embolcallat mínimament amb poliestirè expandit ja que funciona com aïllant. També evita que el fil produït es vegi afectat per la màquina que permet el funcionament del rotor. El fil que anava des de la xeringa amb la solució polimèrica fins al cilindre es podia apreciar a simple vista.



Imatge 42. Xeringa plena amb solució polimèrica. Font: pròpia

A la imatge 42, s'observa la xeringa plena amb la solució polimèrica.

El voltatge al qual es sotmet el conjunt és de 18 kw i el flux de la bomba (que te adherida la xeringa amb la solució polimèrica) és de 0.5ml/h. El fet de fer girar el cilindre i no simplement dipositar fils a sobre de la làmina es fa per evitar que els filament no surtin alineats. Després de deixar l'equip actiu durant uns quants minuts el vam aturar. Tot seguit vam obtenir el que es veu a la següent imatge del microscopi:



Imatge 43. Observació de les fibres d'àcid polilàctic al microscopi.

Font: pròpia [Augments: 20x] [Microscopi de fluorescència Leica DM IL LED]

Es pot apreciar l'alineació que tenen els filaments dipositats. La gran majoria de filaments tenen la mateixa direcció. Tot seguit d'haver efectuat amb èxit la tècnica de l'*electrospinning* vam haver de desenganxar els cobreobjectes de la làmina d'alumini, i per evitar que el procés afecti als filaments dipositats vam dissoldre les vores de cada cobreobjectes.

8.2.2. Fabricació del plàstic

La fabricació del plàstic consisteix en crear una mena de massa gelatinosa (similar a la silicona) que servirà per crear uns chips (que serà el lloc on dipositarem les cèl·lules), a partir de les hòsties de silici prèviament dissenyades i fabricades. Aquests chips arriben a ser una mena de cambra on les cèl·lules es col·loquen. Per a la fabricació del plàstic hem de crear una barreja formada per polidimetilsiloxà (pdms) i un agent d'entrecreuament. La proporció és la següent: per cada 10 grams de pdms s'ha de posar 1 gram d'agent d'entrecreuament. Com que necessitem 37 g de pdms llavors dipositarem 3.7 g d'agent d'entrecreuament. Una vegada feta la barreja i ben homogeneïtzada, la buidem a l'hòstia de silici:

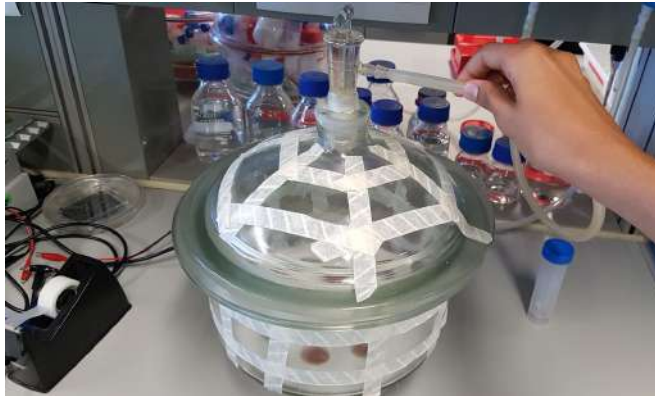


Imatge 44. Hòsties de silici plenes amb el plàstic.

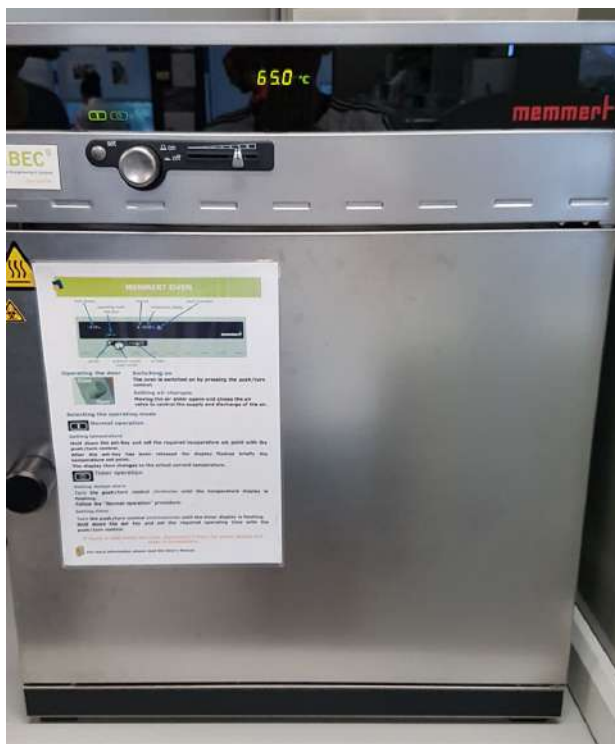
Font: pròpia

Malgrat que no s'aprecia a la imatge, després d'haver buidat el contingut dintre les hòsties de silici, hi van quedar un munt de bombolles submergides dintre de la massa i, per tant, per poder desfer-nos d'elles s'ha hagut de sotmetre el conjunt a un buidatge total, és a dir, vam haver d'introduir l'hòstia a una

càpsula o cambra de buit, on s'extreu tot gas que es trobi dintre. Això es pot apreciar a la següent imatge:



Imatge 45. Hòstia de silici amb el contingut ficada a la cambra de buidat. *Font: pròpia*



Una vegada que ja havien desaparegut les bombolles, vam introduït el conjunt en un forn a 65 °C durant 8 hores (overnight) per tal de solidificar la massa:

Imatge 46. Hòstia de silici amb el seu contingut ficats al forn del laboratori. *Font: pròpia*

Com a següent pas vam procedir al tall de la massa ja solidificada, segons la forma del chip que pertoca. Com a resultat final hem obtingut el següent chip, format per 4 reservoris on dipositarem diferents substàncies:



Imatge 47. Chip. Font: pròpia

Per al desenvolupament de la pràctica utilitzarem dos *chips*⁵² com el que s'observa a la imatge superior: un s'enganxarà a la bastida de les fibres alineades (PLA) que vam fer en el procés d'electrospinning i l'altre chip s'enganxarà a un vidre pla, és a dir, sense fibres alineades. En tots dos el que es farà és realitzar un marcatge del citoesquelet amb faloidina-Alexa 488 que, com s'ha dit abans, detecta l'actina, proteïna abundant al citoesquelet de les cèl·lules, i es manifesta de forma fluorescent; i un marcatge del nucli dels fibroblasts amb DAPI que es un marcador que s'uneix, com s'ha anomenat anteriorment, a regions enriquides amb adenina i timina (l'ADN). [vegeu apartat 8.1. de la part pràctica]

⁵² Chips: el terme correcte i adequat seria sistema microfisiològic o MPS, no obstant això, des d'aquest mateix instant ens limitarem a anomenar-los chips.

8.2.3. Marcatge fluorescent de les cèl·lules

Al llarg d'aquesta part de la pràctica vam procedir a realitzar el marcatge del fibroblasts, és a dir, tenim com a objectiu introduir la immunofluorescència en aquestes cèl·lules perquè posteriorment en el microscopi puguem veure com varia l'estructura interna de la cèl·lula (citoesquelet) en funció de l'estructura que tingui el substrat (RANDOM o alineat).

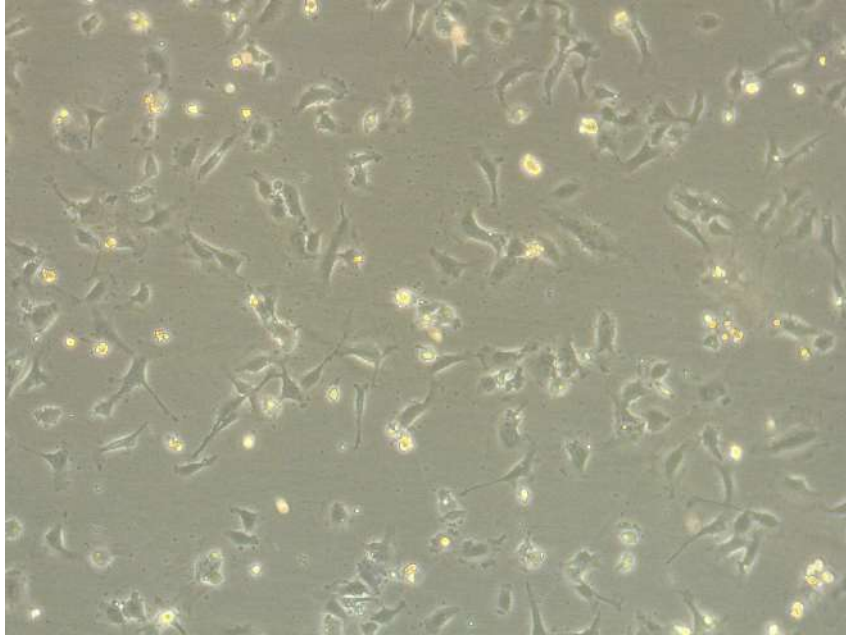
Primerament, el que vam fer va ser un cultiu de cèl·lules, precisant una mica més, es tractava de fibroblasts de pell de rata. Aquestes cèl·lules les vam cultivar en un flask de 75 ml de capacitat. Tot seguit, vam afegir 10 ml de medi de cultiu que té com a components en proporció: 88% Advanced DMEM, 10% FBS, 1% L-glutamina, 1% estreptomicina. El medi s'ha de canviar cada 2-3 dies.



Imatge 48. Cultiu de cèl·lules en el medi. *Font: pròpia*

Seguit de l'anterior, vam tripsinitzar les cèl·lules. Això el que comporta és al desenganxament de les cèl·lules del substrat. Per dur a terme aquest procés de tripsinització primer s'aspira el medi de cultiu, es neteja amb PBS la zona i s'introdueixen 5 ml de tripsina. Es deixa al voltant de 5 min dintre de

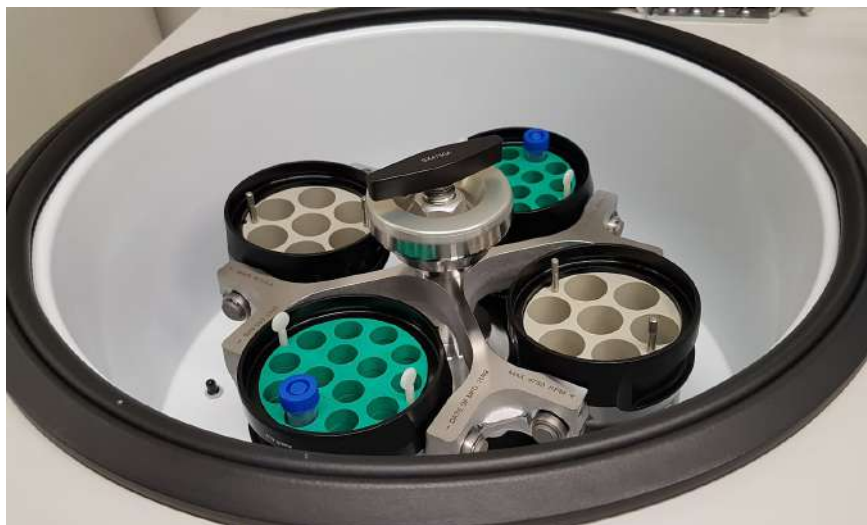
l'incubador a 37 °C i es comprova al microscopi que s'hagin desenganxat totes (queden amb una forma esfèrica quan es troben en suspensió).



Imatge 49. Cèl·lules adherides al flask, abans de la suspensió. *Font: pròpia.*

[Augments: 20x]

Tot el contingut de cèl·lules en suspensió en tripsina es traspasa a un tub falcon de 15 ml i s'afegeix la quantitat equivalent de FBS per inhibir l'efecte de la tripsina.

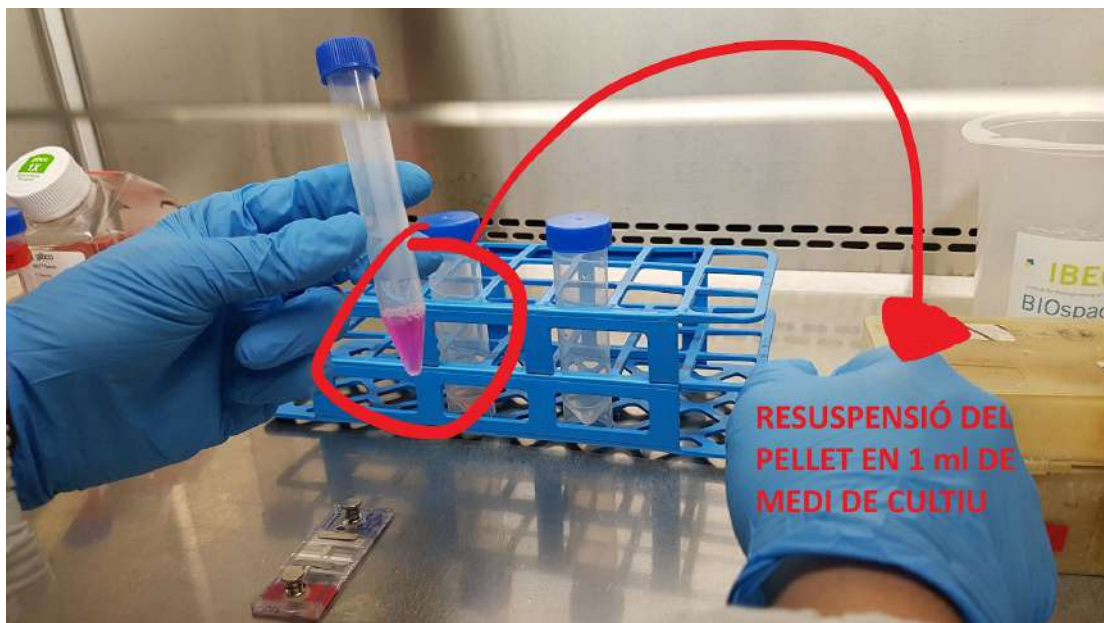


En el nostre cas, hem afegit 5 ml de FBS. Posteriorment, centrifuguem el tub Falcon a 300 G durant 5 min.

Imatge 50. Centrifugació del Falcon amb cèl·lules en suspensió en tripsina i en FBS. *Font: pròpia.*

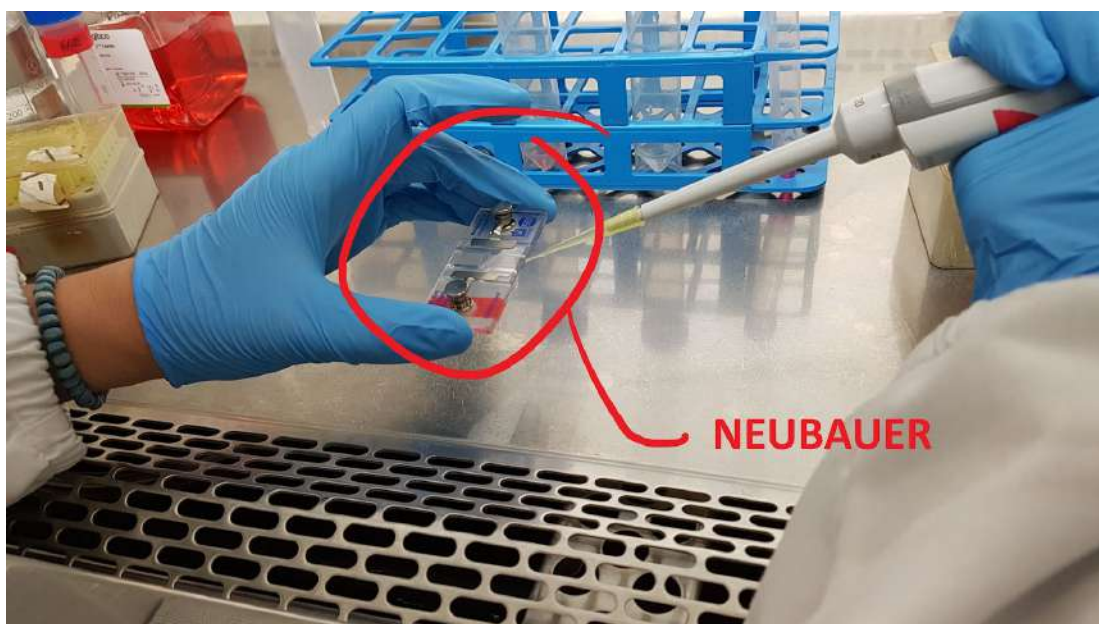
A la imatge de la centrifugació de dalt, apareixen dos Falcon perquè a l'hora de centrifugar s'ha de posar un Falcon amb la mateixa quantitat de substància al lloc oposat del Falcon d'interès, en cas contrari el procés es veuria afectat.

El procés fa que les cèl·lules quedin aglomerades al fons del Falcon, formant el que es coneix com a “pellet”. El líquid que queda per sobre del pellet s'anomena sobrenedant. El que fem, a continuació, és aspirar el sobrenedant deixant únicament el pellet i, tot seguit, tornem a suspendre el pellet amb 1 ml de medi de cultiu.



Imatge 51. Procés de resuspensió del pellet. *Font: pròpia.*

A continuació, vam portar a terme el comptatge cel·lular. Per fer-ho, vam agafar 10 microlitres de la suspensió i els vam introduir en la cambra de Neubauer (aquest dispositiu ens permet realitzar un recompte de cèl·lules aproximat).



Imatge 52. Introducció de 10 μ L de la resuspensió a la cambra de Neubauer. *Font: pròpia.*

Després, vam portar el dispositiu al microscopi per realitzar el recompte. Es tracta de quatre quadrants. En aquests quadrants, es troba una quantitat de cèl·lules determinada, per tant, haurem de realitzar el recompte de les cèl·lules de cada quadrant, sumar les quatre quantitats entre elles i dividir-les entre quatre (fer la mitjana). Una vegada obtinguda la mitjana, es multiplica aquesta per 10.000 i pel volum de la resuspensió. Els càlculs realitzats són els següents:

CÈL·LULES AL QUADRANT 1: 34

CÈL·LULES AL QUADRANT 2: 49

CÈL·LULES AL QUADRANT 3: 32

CÈL·LULES AL QUADRANT 4: 23

$$\text{Mitjana del nombre de cèl·lules} = \frac{34 + 49 + 32 + 23}{4} = 34,5$$

$$34,5 \times 10.000 \times 1 \text{ ml (volum de la resuspensió)} = 345.000 \text{ cèl·lules/ml}$$

D'aquesta forma obtenim la concentració de cèl·lules en un mililitre.

Tot seguit de trobar la concentració, el que fem és separar en 2 Eppendorfs de 0.5 ml la quantitat equivalent a 150.000 cèl·lules. Això és fer simplement un factor de conversió:

$$150.000 \text{ cèl·lules} \times \frac{1 \text{ ml}}{345000 \text{ cèl·lules}} = 0,435 \text{ ml}$$



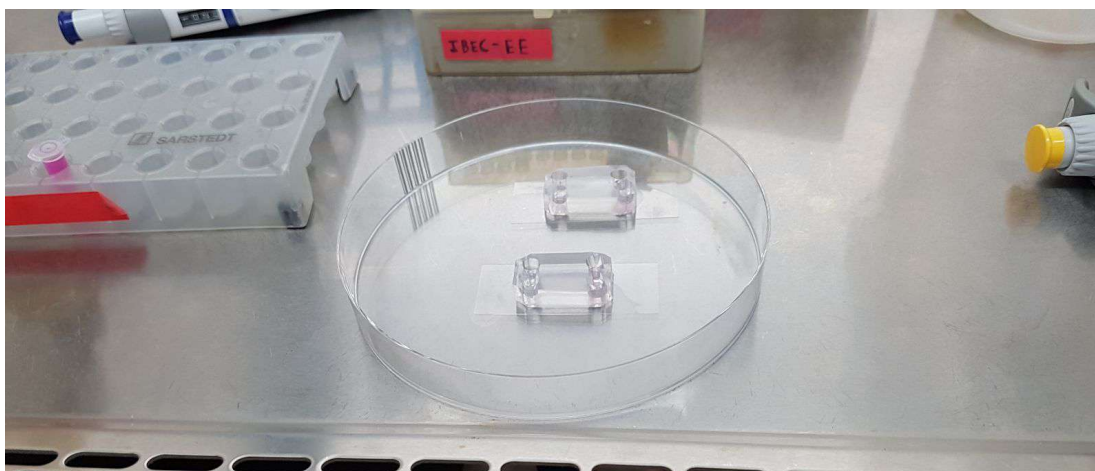
Imatge 53. Eppendorf buit. *Font: pròpia.*

Una vegada introduïts els 0,435 ml en els dos Eppendorfs, centrifuguem una altra vegada a 300 G i durant 5 min.



Imatge 54. Centrifugació dels dos Eppendorfs. *Font: pròpia.*

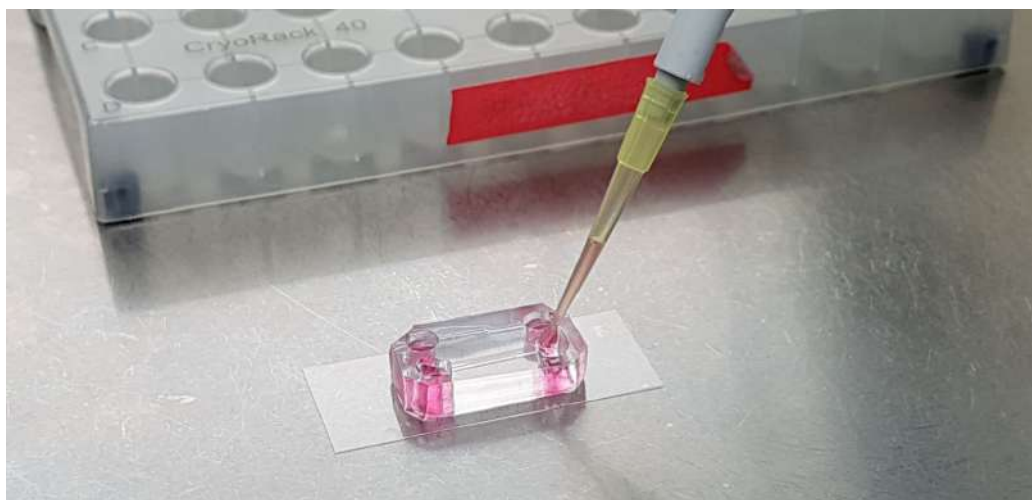
Després d'acabar la centrifugació, extraiem el sobrenedant i resuspenem una altra vegada els pellets amb 10 microlitres en aquesta ocasió.



Imatge 55. Dos chips. *Font: pròpia.*

Posteriorment, injectem les cèl·lules als dos chips, fem els chips a la placa de petri i els deixem a l'incubador durant aproximadament 1 hora per permetre que les cèl·lules s'enganxin al substrat.

A continuació, introduïm 100 microlitres de medi de cultiu a cada reservori⁵³ dels chips.



Imatge 56. Introducció del medi de cultiu a cada reservori del chip. *Font: pròpia.*

Com a últim pas, vam realitzar la tinció per tal d'observar la morfologia cel·lular. Per fer-ho vam realitzar una solució de DAPI i faloïdina-Alexa 488 en PBS-gly. Les proporcions en què el vam fer van ser d'1:1000 i d'1:150 respectivament en 500 microlitres, és a dir, 0,5 microlitres de DAPI i 3,33 microlitres de faloïdina.

El procés de tinció va constar dels següents passos:

1. Vam netejar amb PBS estèril normal durant 10 min.
2. Després es fixen les cèl·lules amb Paraformaldehid (PFA al 4%) durant 15 min.
3. A continuació, netegem amb PBS-gly durant 5 min.
4. Tot seguit, vam permeabilitzar la membrana cel·lular amb PBS-gly + Triton-X-100 al 0,1 % durant 10 min.
5. Tornem a netejar amb PBS-gly durant 5 min

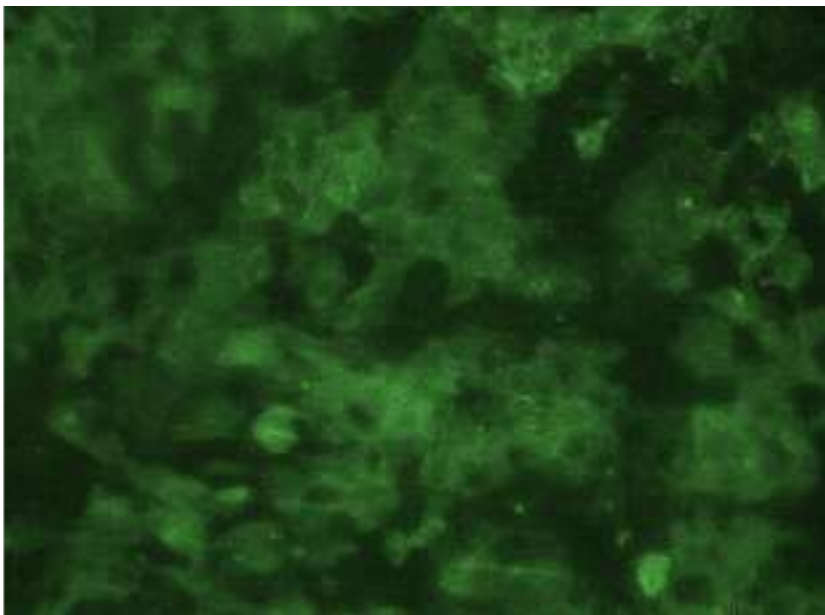
⁵³ reservori: els reservoris són els forats grans que tenen els chips. Hi ha quatre reservoris en aquest cas.

6. Seguit de l'anterior, vam afegir la solució DAPI/faloïdina i la vam deixar durant 2 hores a temperatura ambient⁵⁴
7. Passat aquest temps, vam realitzar la neteja amb PBS-gly durant 10 min.

ATENCIÓ: durant tot el procés de tinció, el canvi de substància al chip sempre s'ha fet buidant els reservoris de cada chip i emplenant-los amb la nova substància d'interès.

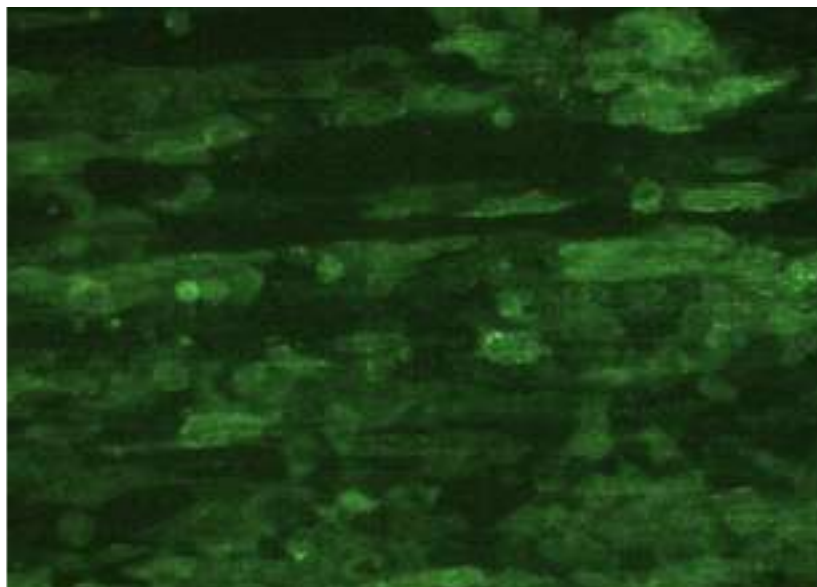
9. Interpretació i aplicació dels resultats

9.1. Taula de resultats

CHIP (tipus d'estructura o marcatge)	IMATGE OBSERVADA AL MICROSCOPI (apreciació visual de la immunofluorescència i dels citoesquelets o, en l'últim cas, del nucli)
CITOESQUELET DELS FIBROBLASTS EN SUBSTRAT DE VIDRE PLA AMB MARCATGE DE FALOIDINA (color verd)	 Imatge 57. Citoesquelet dels fibroblasts en fibres RANDOM amb marcatge observat al microscopi. Font: pròpia. [Augments: 20x] [Microscopi de fluorescència Leica DM IL LED]

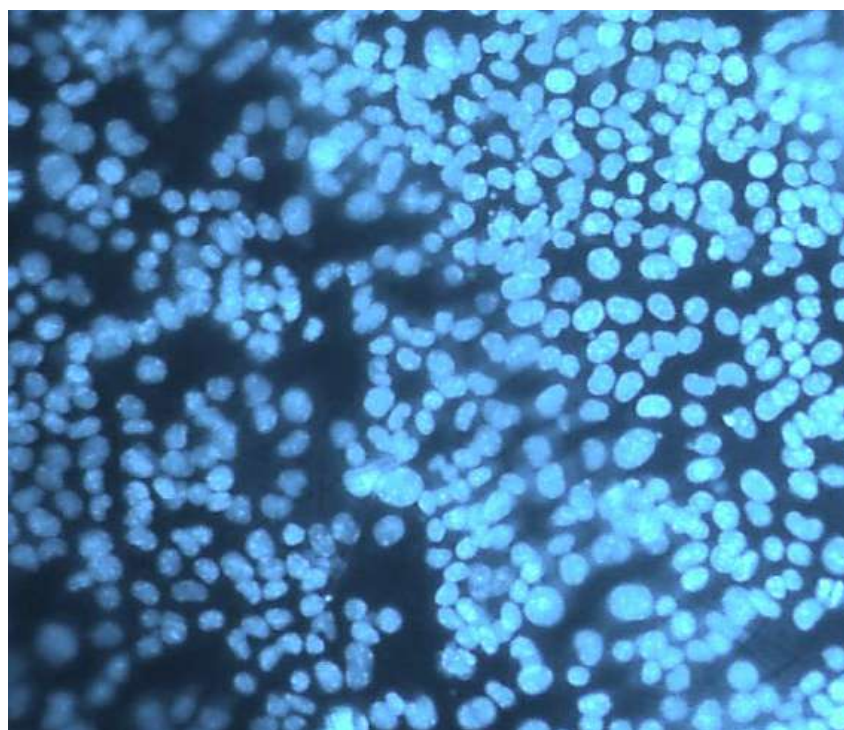
⁵⁴ La placa de petri que conté els dos chips ha d'estar coberta per paper d'alumini per protegir les cèl·lules de la llum exterior.

**CITOESQUELET
DELS
FIBROBLASTS
EN FIBRES
ALINEADES
AMB
MARCATGE DE
FALOIDINA**
(color verd)



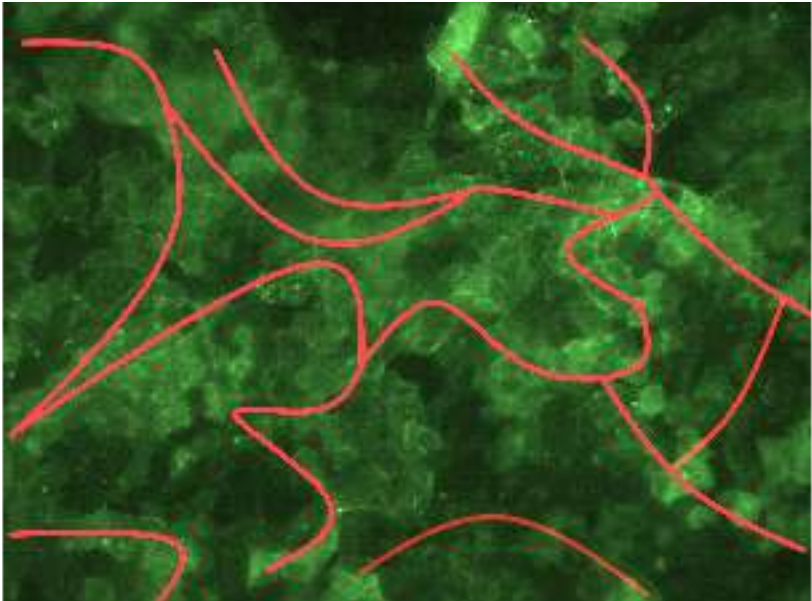
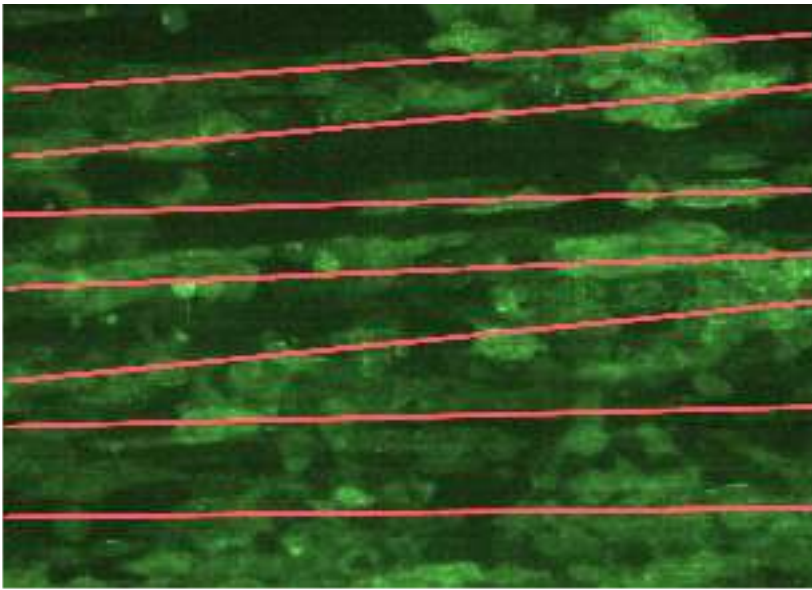
Imatge 58. Citoesquelet dels fibroblasts en fibres alineades amb marcatge observat al microscopi. *Font: pròpia. [Augments: 20x] [Microscopi de fluorescència Leica DM IL LED]*

**NUCLI DELS
FIBROBLASTS
AMB EL
MARCATGE
DAPI**
(color blau)



Imatge 59. Nuclis dels fibroblasts amb marcatge DAPI observats al microscopi. *Font: pròpia. [Augments: 20x] [Microscopi de fluorescència Leica DM IL LED]*

9.2. Esquematització dels resultats

CHIP (tipus d'estructura o marcatge)	IMATGE OBSERVADA AL MICROSCOPI (apreciació visual de la immunofluorescència i dels citoesquelets o, a l'últim cas, del nucli)
CITOESQUELET DELS FIBROBLASTS EN SUBSTRAT DE VIDRE PLA AMB MARCATGE DE FALOIDINA (estructura marcada en vermell)	 Imatge 60. Apreciació visual de l'aleatorietat. Font: pròpia. [Augments: 20x] [Microscopi de fluorescència Leica DM IL LED]
CITOESQUELET DELS FIBROBLASTS EN FIBRES ALINEADES AMB MARCATGE DE FALOIDINA (estructura marcada en vermell)	 Imatge 61. Apreciació de l'alineació. Font: pròpia. [Augments: 20x] [Microscopi de fluorescència Leica DM IL LED]

9.3. Justificació dels resultats

Els resultats obtinguts a partir de la microscopia del marcatge dels fibroblasts mostren diferents estructures en el citoesquelet d'aquestes cèl·lules en funció de l'estructura del polímer. En el primer cas, en el cas de la imatge dels citoesquelets dels fibroblasts disposats en una bastida feta amb fibres RANDOM, (no hi ha fibres, però també considerariem estructura random les fibres dipositades sobre el vidre sense l'ús del cilindre o rotor de la màquina d'electrospinning) el que es pot observar és que les cèl·lules no conformen una estructura lineal o regular ja que no troben cap suport estructural sobre el qual disposar-se fet que fa que, quan es veuen els seus citoesquelets, ens adonem que no segueix cap patró. En canvi, en el cas de la segona situació/imatge, observem que es tracta de citoesquelets disposats sobre fibres alineades, fet que afavoreix una conformació espacial lineal de les cèl·lules que es manifesta a través del marcatge de l'actina del citoesquelet. Les diferències són molt clares entre ambdues imatges ja que en la segona situació, a diferència de la primera, es presenta una estructura lineal (= una estructura lògica pel que fa a les intencions i els objectius).

10. Conclusió

En definitiva, amb l'observació de la idoneïtat del polímer àcid polilàctic per a la formació de bastides que mantenen contacte amb els fibroblasts anteriorment anomenats, podem concloure que la interacció polímer-cèl·lula és òptima. A més, a partir d'aquest aspecte podem confirmar el correcte comportament d'entitats biològiques (cèl·lules) davant d'estructures artificials (polímers).

Després de la realització del treball pràctic, he arribat a les següents conclusions:

- La bastida d'àcid polilàctic dissenyada permet la interacció amb els fibroblasts de rata que es verifica amb l'observació dels citoesquelets.

- El biomaterial utilitzat presenta biocompatibilitat amb les cèl·lules i aquestes poden adherir-se i sobreviure.
- El tipus de suport condiciona l'activitat cel·lular, en aquest cas, mesurada a partir de l'alineació del citoesquelet.

Conclusions finals

Amb els resultats exitosos que s'han obtingut de l'experiment de la part pràctica, realment considero que no seria perdre el temps el fet d'investigar i invertir (temps i diners) en la recerca de novetats actualitzades referents a l'aplicació dels nanotubs de carboni per a la construcció de suports que fomentin la regeneració neuronal.

A més, al llarg del treball de recerca he anat assolint els objectius que m'he plantejat al principi: conèixer les propietats rellevants dels CNTs per a les neurones, aprendre mètodes i tècniques noves referents a l'enginyeria de teixits, conèixer la interacció substrat-cèl·lula i valorar la importància de la biocompatibilitat condicionada per la toxicitat.

En afegit, el meu treball de recerca m'ha permès veure que la combinació de biologia i tecnologia (una combinació que, en ocasions, sembla impossible) no és tan fràgil com sembla. A més, he pogut observar que materials o elements completament diferents (neurones i nanotubs de carboni) poden arribar a treballar segons un objectiu, un propòsit comú: la coexistència.

Bibliografia/Webgrafia

-Pàgines web:

Alexa Fluor® 488 Phalloidin #8878 (2013). Recuperat de: <https://www.cellsignal.com/products/buffers-dyes/alexa-fluor-488-phalloidin/8878?site-search-type=Products>

Brain may grow new cells daily (15 d'octubre de 1999). Recuperat de: <https://www.nytimes.com/1999/10/15/us/brain-may-grow-new-cells-daily.html>

Castaños, E. *Estructura de los nanotubos de carbono* (4 de setembre de 2015) Recuperat de: <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/09/04/estructura-de-los-nanotubos-de-carbono/>

Fernández Muñoz, A. (2014) *Síntesis de sistemas multivalentes basados en C₆₀: estudio de sus propiedades biomédicas y electrónicas* (Tesi doctoral). Universidad Complutense de Madrid.

Milestones in Neuroscience Research. Recuperat de: <http://faculty.washington.edu/chudler/hist.html>

Nanotub. Recuperat de: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Nanotub>

Nanotubos de Carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. Recuperat de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000300002

Neuron. Recuperat de: <https://en.wikipedia.org/wiki/Neuron>

Sumio Iijima: 2007 Balzan Prize for Nanoscience. Recuperat de: <https://www.balzan.org/en/prizewinners/sumio-ijima/the-discovery-of-carbon-nanotubes-ijima>

Timeline of Carbon Nanotubes. Recuperat de: https://en.wikipedia.org/wiki/Timeline_of_carbon_nanotubes

-Articles i tesis doctorals:

Demczyk, B. ., Wang, Y. ., Cumings, J., Hetman, M., Han, W., Zettl, A. i Ritchie, R. . (2002). Direct mechanical measurement of the tensile strength and elastic modulus of multiwalled carbon nanotubes. *Materials Science and Engineering: A*, 334(1-2), 173–178. doi:10.1016/s0921-5093(01)01807-x

Guillery, R. W. (2005). *Observations of synaptic structures: origins of the neuron doctrine and its current status*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1458), 1281–1307. doi:10.1098/rstb.2003.1459

Harris-Warrick, R. M. (2011). Neuromodulation and flexibility in Central Pattern Generator networks. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(5), 685–692. doi:10.1016/j.conb.2011.05.011

Hwang, J.-Y., Shin, U. S., Jang, W.-C., Hyun, J. K., Wall, I. B. i Kim, H.-W. (2013). *Biofunctionalized carbon nanotubes in neural regeneration: a mini-review*. *Nanoscale*, 5(2), 487–497. doi:10.1039/c2nr31581e

Jeon, I.-Y., Wook, D., Ashok, N. i Baek, J.-B. (2011). *Functionalization of Carbon Nanotubes. Carbon Nanotubes - Polymer Nanocomposites*. doi:10.5772/18396

Kempermann, G., Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., ... Frisé, J. (2018). *Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. Cell Stem Cell, 23(1), 25–30*. doi:10.1016/j.stem.2018.04.004

Pampaloni, N. P., Scaini, D., Perissinotto, F., Bosi, S., Prato, M., i Ballerini, L. (2017). *Sculpting neurotransmission during synaptic development by 2D nanostructured interfaces. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. doi:10.1016/j.nano.2017.01.020

Postius Artesero, X. (2018) *Obtenció de materials estereocomplexes de PLA i estudi de propietats* (treball de final de grau). Recuperat de <http://hdl.handle.net/2117/114904>

Rauti, R., Musto, M., Bosi, S., Prato, M. i Ballerini, L. (2018). Properties and behavior of carbon nanomaterials when interfacing neuronal cells: how far have we come? *Carbon*. doi:10.1016/j.carbon.2018.11.026

Sánchez Molina, A. (2018) *Neurorregeneración con nanotubos de carbono*. Universidad Pablo de Olavide

Shi Kam, N. W., O'Connell, M., Wisdom, J. A. i Dai, H. (2005). *Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(33), 11600–11605*. doi:10.1073/pnas.0502680102

Veetil, J. V. i Ye, K. (2009). *Tailored carbon nanotubes for tissue engineering applications. Biotechnology Progress, 25(3), 709–721*. doi:10.1002/btpr.165

Yiu, G. i He, Z. (2006). *Glial inhibition of CNS axon regeneration*. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8), 617–627. doi:10.1038/nrn1956

Zhu, L., Chang, D. W., Dai, L., & Hong, Y. (2007). *DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells*. *Nano Letters*, 7(12), 3592–3597. doi:10.1021/nl071303v