

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2018

MEMORIA DEL PROYECTO Nº 27

1. DATOS DEL PROYECTO

Título: **Biodetección mediante nanopartículas magnéticas y de oro**

Investigador/a/es responsable/es: **Montserrat Rivas Ardisana**

Tfno: **985182387**

E-mail: **rivas@uniovi.es**

Otros investigadores: **José Carlos Martínez García, Carmen Blanco López, Luis García Flórez**

Empresas o instituciones colaboradoras: **Dismed S.A. y Fundación Prodiotec**

2. MEMORIA DESCRIPTIVA DEL PROYECTO

2.1 Resumen ejecutivo

El resumen ejecutivo del Proyecto debe ser una síntesis clara y concisa del trabajo realizado, describiendo brevemente los motivos que justifican su realización, los beneficiarios, los objetivos específicos y su grado de consecución, la metodología aplicada y los resultados obtenidos.

Extensión: unas 500-600 palabras (limitado a un máximo de 4000 caracteres, incluidos espacios).

Los continuos avances en el campo de la Inmunología han impulsado la investigación en tecnologías biosensoras, gracias a la unión específica del analito-diana a la etiqueta que lo hace detectable mediante el uso de su anticuerpo. Aunque las etiquetas más utilizadas en biosensores han sido etiquetas que producen señales visibles (como partículas de látex), en los últimos años se han usado con gran éxito nanopartículas magnéticas, que añaden ventajas tales como la posibilidad de pre-concentrar la muestra por medio de un imán y la cuantificación de la señal mediante un sensor magnético.

En los últimos años venimos desarrollando, con el apoyo del IUTA un método biosensor para cuantificación de biomarcadores cancerígenos (hemos llegado a cuantificar la proteína PSA, utilizada en diagnóstico de cáncer de próstata en rangos de interés clínico con sensibilidad y límites de detección comparables o ligeramente mejores que los métodos comerciales) y troponina (biomarcador cardiopático muy útil para el diagnóstico urgente de infarto de miocardio e isquemia cardíaca). El sistema combina un sensor de nanopartículas magnéticas (NanoSensor) con inmunoensayos magnéticos en tiras de papel (del tipo del conocido test de embarazo).

En el estado de desarrollo actual, las líneas de mejora a investigar son las siguientes:

- Superación de la sensibilidad del dispositivo NanoSensor mediante mejores técnicas de impresión de las micropistas sensoras.
- Mejora de las propiedades magnéticas de las nanopartículas para incrementar su señal.
- Ensayo de distintos recubrimientos, metálicos y poliméricos, para facilitar la unión partícula-anticuerpo.

Para lograr dichos objetivos planteamos las siguientes estrategias:

- (i) Aprovechar la cualidad demostrada por el oro de unirse electrostáticamente gracias a la nube plasmónica de su superficie y, dado que NanoSensor es sensible al magnetismo que el oro no posee, recubrir nanopartículas de magnetita con una fina capa de oro que permita su enlace electrostático al anticuerpo.
- (ii) Explorar otros núcleos magnéticos de las partículas además de la magnetita utilizada hasta ahora. Se sintetizarán distintas ferritas con estructura espinela (cobalto, zinc y manganeso) persiguiendo un aumento de la imanación a saturación de las partículas y con ello un incremento de la señal en el NanoSensor.
- (iii) Se utilizarán las técnicas combinadas de litografía y pulverización catódica para la realización de circuitos sensores con anchuras y espesores más reducidos con el fin de aumentar la señal sobre ruido en la cuantificación de las partículas mediante el NanoSensor.

El proyecto pretende valorar la eficacia de las estrategias propuestas mediante nuevos ensayos inmunomagnéticos de distintas proteínas de interés clínico (especialmente histamina) su correspondiente calibración con el NanoSensor, siendo los resultados esperables más destacados la mejora de la sensibilidad y el límite de detección hasta alcanzar valores de interés clínico.

Se espera que sean beneficiarios directos de este proyecto nuestros estudiantes de investigación que podrán acceder a una formación multidisciplinar en un campo tecnológico en auge, así como las empresas de nuestro entorno directa o indirectamente relacionadas con la biotecnología y los sensores, que podrán aprovechar esta cantera de alta cualificación. Indirectamente, todos somos beneficiarios como sociedad de los avances relacionados con la salud y el medio ambiente y, muy en particular, los sectores empresariales relacionados con la biomedicina y la industria alimentaria.

La metodología a seguir pasa por las siguientes:

- (i) Síntesis de nanopartículas de magnetita y ferritas mediante los métodos de co-precipitación de sales y poliol. Caracterización estructural y magnética.
- (ii) Recubrimiento de las nanopartículas con una fina capa de oro que le proporcione mayor visibilidad y más fácil funcionalización. Se utilizará para ello el protocolo conocido como de Lo & Choi. Caracterización de las partículas core/shell mediante difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión, dispersión dinámica de luz y espectroscopía de infrarrojo.
- (iii) Funcionalización de las mismas y conjugación con proteína G para crear un compuesto genérico que sirva para diversas proteínas de interés.
- (iv) Preparación de inmunoensayos en tiras de flujo lateral mediante la impresión de los anticuerpos correspondientes.
- (v) Lectura y calibración de las líneas de test mediante el NanoSensor.

2.2 Objetivos iniciales del proyecto y grado de consecución

- Mejora de la eficiencia del marcaje mediante la modificación de la superficie de las nanoesferas .

Grado de consecución: 100%

Estrategia: se recubrieron las nanoesferas con una doble capa de ácido oléico que permitió formar aglomerados de tamaño controlado aumentándose considerablemente el número de nanoesferas por proteína y, con ello, la señal medida.

- Obtención de un producto genérico, conjugado de nanopartícula y proteína G que permita ensayos inespecíficos con una gran variedad de analitos (este tipo de proteína no es específica pero sí de bajo coste y este resultado intermedio tendría gran interés en el marco de la investigación).

Grado de consecución: 80%

Gracias a que la doble capa la superficie dispone de grupos carboxílicos se logró con las nanoesferas magnéticas una excelente conjugación a la proteína G, lográndose el producto deseado. En contra de todo pronóstico, la conjugación de la proteína y el oro resultó ineficaz. El oro suele ser mucho más fácil de bioconjugarse que las magnéticas, sin embargo, las magnéticas son mucho más interesantes ya que permiten la cuantificación magnética. Dado que las partículas de oro no presentaban ninguna ventaja en estos ensayos, se descartaron para el resto de la investigación.

- Conjugación eficiente nanopartícula-proteína G y realización de los correspondientes ensayos inmunomagnéticos específicos para histamina en tiras de nitrocelulosa.

Grado de consecución: 100%

Se realizaron ensayos con partículas recubiertas de doble capa de ácido graso, utilizándose ácido oléico, laúrico y mistérico. El primero fue el que arrojó mejores resultados, si bien en todos los casos se logró un resultado positivo.

- Calibración de las líneas de test mediante el NanoSensor y valoración del método.

Grado de consecución: 80%

Se realizó la calibración de las tiras de flujo lateral de histamina en el rango de concentración habitual para los vinos comerciales e incluso por debajo del mismo. Tanto el límite de detección como la resolución fueron muy satisfactorios y comparables a técnicas mucho más costosas y sofisticadas como el HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia).

Se realizó la medida en tres muestras de vinos reales. En dos de ellas los resultantes fueron coincidentes con las medidas de HPLC. En el tercer caso, el error fue del 50%. Se exploró la posible explicación y se llegó a la conclusión de que se debe a una reacción cruzada con otras aminas (también causantes de intolerancias). Estamos trabajando para hacer el ensayo más específico para histamina.

2.3 Tareas realizadas

Síntesis de nanoesferas de magnetita y recubrimiento con tres tipos de ácidos grasos (doble capa).

Síntesis de nanoesferas de oro de 30 nm.

Funcionalización de las nanoesferas con proteína G e inmovilización en tiras de nitrocelulosa.

Valoración de las tiras con NanoSensor y selección de las mejores partículas.

Inmunoensayos competitivos para histamina.

Valoración de las tiras con NanoSensor y calibración del método de cuantificación para histamina.

Medida de tres muestras reales de vino tinto.

2.4 Resultados obtenidos

El trabajo se desarrolló y completó con resultados muy satisfactorios.

Las partículas que proporcionaron mejor señal óptica y magnética fueron las nanoesferas de magnetita recubiertas de doble capa de ácido oléico. Con ellas se diseñaron inmunoensayos de flujo lateral para detección de histamina en los rangos habituales en vinos comerciales y por debajo de ellos. Los ensayos se calibraron y dicha calibración se usó para medir tres muestras de vinos reales.

Los resultados obtenidos se compararon con las medidas realizadas por HPLC, siendo coincidentes en dos de ellas y obteniendo un error del 50% en la tercera. Se demostró que dicho error provenía de reacciones cruzadas con otras aminas biógenas presentes en el vino (dichas aminas también producen reacciones

alérgicas y toxicológicas). Hay que destacar que los niveles desaconsejados de histamina en vino son de 5-8 ng/mL y en los vinos analizados las medidas resultaron de 0,2-0,8 ng/mL, es decir, considerablemente más exigentes que la detección umbral.

Puede concluirse que hemos desarrollado un sistema de análisis de histamina en vino tinto de uso tan sencillo y rápido como una prueba de embarazo, apto para ser realizado en entornos y por personal no especializados.

La estudiante becada por el IUTA participó en todas las tareas mencionadas, de forma muy satisfactoria y proactiva, demostrando iniciativa y enormes ganas de aprender, además de gran capacidad de esfuerzo y dedicación.

Además de en el trabajo del laboratorio, la estudiante se integró en otras actividades de divulgación a la sociedad (Noche de los Investigadores) y formación transversal (Medialab, donde participó en un taller de comunicación oral y en el Editatión Medialab).

2.5 Trabajos o necesidades futuras

En el futuro el sistema de análisis de histamina se refinará haciéndolo más específico, de forma que otras aminas no se detecten.

Además, nuestra investigación se dirige hacia el diseño de un sensor que sea portátil con un posicionador de muestras automático. De esta forma el sistema podría ser usado, no sólo en el laboratorio de la bodega, sino incluso en el punto de consumo. Es un diseño aprovechable además para cualquier otro tipo de molécula de interés, no sólo en alimentos, si no de aplicación clínica.

2.6 Divulgación de los resultados (publicaciones, artículos, ponencias...)

Divulgación en la Sociedad

La Noche de los Investigadores 2018

"El nanomundo"

Seminario Medialab

"Nanomateriales y medicina: un matrimonio de conveniencia".

Congresos y seminarios

JEMS 2018

Organización del simposio "Biomagnetism and medical applications" en la conferencia Joint European Magnetism Symposia JEMS que se celebró en Mainz (Alemania) en septiembre de 2018.

Presentación del trabajo (póster) "Advantageous performance of carbon-coated superparamagnetic nanoflowers for paper-based immunoassays"

XLI Congreso de la SEBBM 2018

Organización del simposio "Nanomaterials for Bioapplications" en el XLI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular SEBBM que se celebrará en Santander en septiembre de 2018.

Charla invitada "Nanoparticles for Point-of-Care diagnostic tests".

IEEE Magnetism Society-CEMAG

Organización de la reunión conjunta de la IEEE Magnetic Society (capítulo español) y el Club Español de Magnetismo CEMAG que se celebró en Gijón en noviembre de 2018.

Organización de la Jornada de Jóvenes Investigadores en Magnetismo de la Sociedad Magnética de la IEEE en la Universidad Laboral.

Conferencia "Detection and quantification of exosomes by means of carbon-coated superparamagnetic nanoflowers".

Conferencia "A magnetic field gradient to enhance the signal in magnetic lateral flow immunoassays".

Intermag 2018

Organización del simposio "Magnetism in medicine: Where next?" en la conferencia INTERMAG 2018 que se celebrará en Singapur en abril de 2018.

Póster "Histamine magnetic test for wine".

ESRW 2018 IMdea Nanociencia

Póster "Advantages of carbon-coated superparamagnetic nanoflowers for lateral flow immunoassays"

Póster "Enhancement of magnetic lateral flow immunoassays by means of a magnetic field gradient".

ISMANAM Rome International Symposium on Metastable and Amorphous Materials

Conferencia "Biodetection of histamine in wine: magnetic versus plasmonic labels"

NanoSpain 2018

Conferencia "Designing and reading magnetic lateral flow strips for point-of-use food and clinical applications".

SBAN 2018 Spanish Bioapplied Nanoparticles

Poster "How to use magnetic nanoparticles for lateral flow point-of-use bioanalysis".

International Conference on Complex and Functional Materials, Calcuta

Conferencia invitada "Paper magnetic immunoassays: An affordable and fast solution for point-of-use bioanalysis".

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kalinigrado

Seminario "Basics on FORC analysis and interpretation".

Seminario "Paper magnetic bioanalysis for point-of-use".

Publicaciones

"Analytical techniques for exosome quantification", enviado a Bioengineering.

"Synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: SWOT analysis towards their conjugation to biomolecules", review aceptado para publicación en Journal of Nanoscience and Nanotechnology.

"Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine", enviado a Analytical and Bioanalytical Chemistry.

Trabajo Fin de Grado

"Mejora de un sensor de nanopartículas superparamagnéticas para biodetección", de Elena Álvarez Fernández.

3. MEMORIA ECONÓMICA

Financiación		Personal	Inventariable	Fungible	Otros gastos
IUTA	SV-18-GIJÓN-1.27	4800 €			
Otras fuentes	MAT2017-84959-C2-1-R	3500 €		6700 €	5500 €
Estudiante con ayuda a la investigación	Nombre	Beatriz Meana Baamonde			
	Tareas	Colaboración en todas las mencionadas			
	Período	1 de julio a 31 de diciembre de 2018			

4. OTROS PROYECTOS Y CONTRATOS CON FINANCIACIÓN EXTERNA

Título del proyecto/contrato	BIOSENSOR BASADO EN NANOPARTICULAS SUPERPARAMAGNETICAS PARA EL DIAGNOSTICO PRECOZ Y NO INVASIVO DE CANCER COLORRECTAL
Referencia	MAT2017-84959-C2-1-R
Investigador/a/es principal/es	Montserrat Rivas Ardisana y M. Carmen Blanco López
Equipo investigador	José Carlos Martínez, María Matos, Gemma Gutiérrez
Periodo de vigencia	2018-2020
Entidad financiadora	MINECO
Cantidad subvencionada	121000 €