

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2017

MEMORIA DEL PROYECTO Nº SV-17-GIJÓN-1-19

1. DATOS DEL PROYECTO

Título: Nuevas rutas de síntesis de nanopartículas para optimizar la biodetección mediante marcaje magnético

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

Tfno: 985182387 **E-mail:** rivas@uniovi.es

Otros investigadores: José Carlos Martínez García, José Ángel García Díaz, Carmen Blanco López

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 avances en Inmunología han impulsado la investigación en tecnologías biosensoras, gracias a la unión específica del analito-objetivo a una etiqueta que lo hace detectable. Nuestra estrategia en este proyecto pasa por utilizar como etiquetas nanopartículas magnéticas, que añaden otras funcionalidades como la pre-concentración magnética del analito y la cuantificación de la señal mediante un sensor magnético (en etapas anteriores de este proyecto se desarrolló un sensor magnético adaptado a este fin que llamamos NanoSensor).

Uno de los pasos fundamentales de la técnica es la unión de la nanopartícula a un anticuerpo, que determina la unión final nanopartícula-analito. Los mecanismos de la conjugación dependen fundamentalmente del acabado superficial de la nanopartícula. Por ello, objetivo principal de este trabajo ha sido la síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas con distintos recubrimientos.

Se plantearon dos estrategias de mejora de la eficacia del marcaje:

- (i) Explorar un recubrimiento diferente del utilizado hasta la fecha, concretamente un polímero ramificado con grupos amino (polietilenimina PEI).
- (ii) 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.

En referencia a la primera estrategia planteada, el nuevo enlace covalente implicaba la unión de los grupos amina del nuevo polímero (PEI) con los residuos carboxílicos del anticuerpo anti-troponina. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. La síntesis de magnetita recubierta de PEI producía unos aglomerados demasiado grandes para poder circular por la tira, impidiendo el correcto funcionamiento del inmunoensayo. Como solución práctica, y dado que estos aglomerados estaban formados por pequeñas partículas entrelazadas por las cadenas poliméricas, se probó la rotura mediante sonicación. Sin embargo, aunque se disminuía el tamaño de los aglomerados el recubrimiento se dañaba. Además, durante el proceso de activación de los grupos funcionales responsables de la unión con el anticuerpo, se formaban de nuevo aglomeraciones inestables, produciéndose precipitados e impidiendo por tanto su unión posterior al antígeno cuando se llevaba a cabo el inmunoensayo.

En relación con la segunda estrategia, se ha desarrollado un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de histamina usando como marca nanopartículas de oro recubiertas con proteína G. En este apartado los resultados fueron exitosos logrando detectar diferentes concentraciones de histamina en los rangos deseados. Como resultado del éxito logrado al unir la proteína G al oro, se decidió sintetizar nanopartículas de magnetita recubiertas con una fina capa de oro para su posterior uso como marca en el inmunoensayo y su detección con el NanoSensor. El método utilizado para su síntesis es la coprecipitación de sales de Fe^{+2} y Fe^{+3} para obtener las nanopartículas de magnetita, y a continuación su posterior recubrimiento de oro usando un precursor. Las nanopartículas obtenidas son estables en disolución y tienen señal en el sensor.

Los resultados en el ámbito de la formación han sido claros, beneficiando particularmente a Amanda Moyano Artime, estudiante de doctorado que, además de implicarse hasta el punto de liderar las actividades de investigación mencionadas, ha tenido en este último año las experiencias de colaborar con una empresa (DOP Vinos de Cangas), de realizar una estancia de tres meses en la Universidad de la Ciudad de Dublín (DCU) y de trabajar muy activamente como miembro del Comité Organizador del congreso NALS2017 (Nanomateriales Aplicados a Ciencias de la Vida) celebrado en Gijón.

2.2 Objetivos iniciales del proyecto y grado de consecución

Se analiza a continuación el grado de consecución de los objetivos planteados en la solicitud del proyecto:

- *Mejora de la eficiencia del marcaje mediante la modificación de la superficie de las nanoesferas magnéticas.* Se realizaron síntesis de nanoesferas de magnetita recubiertas de PEI así como de otras recubiertas de oro.
- *Obtención de un producto genérico, conjugado de nanopartícula y proteína IgG que permita ensayos inespecíficos con una gran variedad de analitos.* Se realizó con las nanopartículas de oro sintetizadas.
- *Conjugación eficiente nanopartícula-troponina y realización de los correspondientes ensayos inmunomagnéticos específicos en tiras de nitrocelulosa.* Dado que en el momento de ejecución del proyecto no se disponía de suficiente anticuerpo anti-troponina, se realizaron los experimentos de conjugación e inmunoensayo con histamina y nanopartículas de oro.
- *Calibración de las líneas de test mediante el NanoSensor y valoración del método.* Todas las nanopartículas magnéticas sintetizadas, tanto las recubiertas de PEI como las recubiertas de una fina capa de oro dieron buena señal en el sensor.

2.3 Tareas realizadas

Las tareas realizadas durante el desarrollo del proyecto se resumen a continuación:

Tarea 1: Síntesis de nanopartículas de magnetita superparamagnéticas mediante coprecipitación recubiertas de polietilenimina (PEI): se llevó a cabo mediante la coprecipitación de sales de hierro (Fe^{2+} , Fe^{3+}) en atmósfera reductora (ausencia de O_2), evitando de esta forma la oxidación del ion Fe^{2+} . La incorporación del polímero se realizó *in situ* durante la síntesis, controlando de esta forma el tamaño de los núcleos que forman las nanopartículas obtenidas y confiriendo a las mismas los grupos amina necesarios para la posterior funcionalización con el anticuerpo.

Tarea 2: Caracterización de las nanopartículas sintetizadas: se llevó a cabo mediante DLS (*Dynamic Light Scattering*), que permite obtener el radio hidrodinámico, y el potencial Z, que permite estimar la carga superficial que tienen, así como su estabilidad. También se observaron al microscopio electrónico de transmisión para valorar la morfología y el tamaño.

Tarea 3: Realización de tests de flujo lateral.

Tarea 4: Calibración de las partículas y los tests en el NanoSensor.

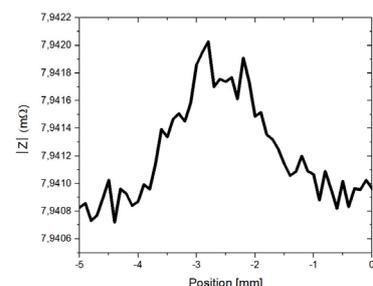
Tarea 5: Desarrollo del inmunoensayo de flujo lateral para la detección de histamina usando oro de 40 nm recubierto de proteína G como marca.

Tarea 6: Síntesis de nanopartículas superparamagnéticas mediante coprecipitación de sales de hierro +2 y +3, y su posterior recubrimiento con oro usando un precursor HAuCl_4 . Las nanopartículas son estabilizadas en una disolución de citrato.

Tarea 7: Las nanopartículas sintetizadas se caracterizaron usando diferentes técnicas: microscopio electrónico de transmisión, DLS, potencial Z e infrarrojo. Además se han calibrado en el Nanosensor.

2.4 Resultados obtenidos

- El recubrimiento de las nanopartículas de magnetita con PEI no produjo resultados positivos ya que da lugar a una aglomeración de las mismas que impide que circulen por la membrana del inmunoensayo.
- La unión exitosa de las nanopartículas de oro sintetizadas a proteína G permitió los inmunoensayos para la detección de histamina. Esto abre además la puerta a su utilización con otras moléculas de interés analítico.
- Dado que en el momento de ejecución del proyecto no se disponía de suficiente anticuerpo anti-troponina, se realizaron los experimentos de conjugación e inmunoensayo con histamina y nanopartículas de oro. Estos ensayos fueron exitosos permitiendo la detección inequívoca de histamina en las muestras. En la imagen derecha se muestra un test positivo (dos líneas) de histamina.
- Todas las nanopartículas magnéticas sintetizadas, tanto las recubiertas de PEI como las recubiertas de una fina capa de oro dieron buena señal en el sensor. En la imagen derecha se muestra el resultado de escanear una muestra de nanopartículas bicapa $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$.



2.5 Trabajos o necesidades futuras

Los resultados de investigación nos llevan a plantearnos objetivos más ambiciosos en la dirección de la cuantificación de troponina, histamina y biomarcadores cancerígenos. La troponina es un biomarcador de riesgo cardiopático. La histamina es una sustancia presente en algunos alimentos que presenta problemas de toxicidad (por ejemplo, sus niveles están regulados en el pescado) o alergias (en vinos). Los biomarcadores cancerígenos de interés vienen dados por la participación de inmunólogos y médicos en nuestro proyecto. En este momento colaboramos con especialistas en cáncer colorrectal del Hospital Universitario San Agustín y el Hospital Universitario Central de Asturias. Estamos dando los pasos, con la ayuda de la oficina de Gijón Impulsa, para colaborar con especialistas del Hospital de Cabueñes.

Los trabajos futuros irán en tres direcciones:

- Mejora de la sensibilidad de NanoSensor mediante el uso combinado de litografía y pulverización catódica para la realización del elemento sensor.
- Síntesis de nanopartículas magnéticas de magnetita y distintas ferritas (de cobalto, zinc y manganeso) con mejores propiedades magnéticas.
- Recubrimientos poliméricos y de oro de las partículas anteriores para facilitar la unión a los anticuerpos.
- Inmunoensayos con las moléculas mencionadas.

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

Celebración del Congreso sobre Nanomateriales Aplicados a Ciencias de la Vida NALS2017 en Gijón

Esta fue sin ninguna duda la principal actividad divulgativa que nuestro grupo ha organizado en el año 2017 con el apoyo del IUTA. Se creó el congreso NALS al que asistieron 126 participantes procedentes de 10 países. La información relativa al congreso se puede consultar en la página web: www.nals2017.es Dado que el IUTA fue uno de los patrocinadores del congreso, se ha remitido ya un informe sobre el mismo donde se pueden encontrar más detalles.



Nuestro proyecto en los medios

[Banner de la Universidad de Oviedo](#) durante la semana del 15 al 22 de diciembre de 2017.

[Noticia y entrevista en la TPA](#)

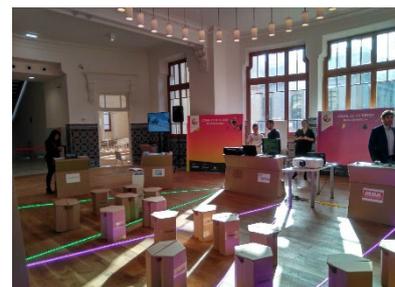
[Artículo en El Comercio](#)

[Artículo en La Nueva España 1](#)

[Artículo en La Nueva España 2](#)

Movimiento Equilibria Gijón

Nuestro grupo de investigación participó en esta actividad divulgativa organizada por Gijón Impulsa y dirigida a empresas y público general en la ciudad de Gijón. La participación tuvo lugar por dos medios: una charla divulgativa y un stand en el que se hicieron demostraciones y se invitó al público a manipular las nanopartículas magnéticas.



Publicaciones en revistas JCR

- 1.- María Salvador, Amanda Moyano, José Carlos Martínez-García, María Carmen Blanco-López, Montserrat Rivas, *Synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: SWOT analysis towards their conjugation to biomolecules for molecular recognition applications*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology (under review).
- 2.- David Lago-Cachón, Myriam Oliveira-Rodríguez, Montserrat Rivas, María C. Blanco-López, José C. Martínez-García, Amanda Moyano, María Salvador, and José A. García, *Scanning Magneto-Inductive Sensor for Quantitative Assay of Prostate-Specific Antigen*, IEEE Magnetics Letters **8** 1506305 (2017). <http://dx.doi.org/10.1109/LMAG.2017.2702108>
- 3.- Montserrat Rivas, Pedro Gorria, Cristina Muñoz-Gómez, José C. Martínez-García, *Quasistatic AC FORC measurements for soft magnetic materials and their differential interpretation*, IEEE Trans Magn **53** 2003606 (2017). <http://dx.doi.org/10.1109/TMAG.2017.2696165>

Comunicaciones a congresos

- 1.- *Fast, cheap, and quantitative analytical screening by magnetic lateral flow immunoassay*, M. Rivas, J.C. Martínez-García, D. Lago-Cachón, A. Moyano, M. Salvador, M. Oliveira-Rodríguez, M.C. Blanco-López.
Frontiers on Biomagnetic Particles. Ashville (EEUU), Junio de 2017.
- 2.- *Magnetic biosensor based on lateral flow immunoassays*, D. Lago-Cachón, M. Oliveira-Rodríguez, M.C. Blanco-López, M. Rivas, J. C. Martínez-García, A. Moyano, M. Salvador, J.A. García.
VIII International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology. Barcelona, Julio de 2017.
- 3.- *Three steps to interpret First Order Reversal Curves in soft magnetic samples*, M. Rivas and J. C. Martínez-García.
23rd Conference on Soft Magnetic Materials. Sevilla, Septiembre de 2017.
- 4.- *Fourier-based construction of FORC diagrams for soft magnetic materials*, J. C. Martínez-García and M. Rivas.
23rd Conference on Soft Magnetic Materials. Sevilla, Septiembre de 2017.
- 5.- *Quasistatic AC FORC Measurements for Soft Magnetic Materials and Their Differential Interpretation*, M. Rivas and J. C. Martínez-García.
Intermag 2017—IEEE International Magnetics Conference. Dublín (Irlanda), abril de 2017.
- 6.- *Fast, cheap, and quantitative analytical screening by magnetic lateral flow immunoassay*
M. Rivas, J.C. Martínez-García, D. Lago-Cachón, A. Moyano, M. Salvador, M. Oliveira-Rodríguez, M.C. Blanco-López.
New Trends in Nanoscience & Nanotechnology. Noviembre de 2017.
- 7.- *Synthesis of gold coated superparamagnetic nanoparticles*, S. Andreas, A. Moyano, A. Presa, P. Quirnbach, M. Rivas, M. C. Blanco-López
1st Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences, NALS2017. Gijón, Diciembre de 2017.
- 8.- *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles with extraordinary properties for biodetection*, María Salvador, Amanda Moyano, J.C. Martínez-García, Vlad Socoliuc, Ladislau Vékás, Montserrat Rivas, Davide Peddis.
1st Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences, NALS2017. Gijón, Diciembre de 2017.

9.- *A rapid, cheap, and simple lateral flow immunoassay test for the detection of Histamine*, A. Moyano, M.C. Blanco-López, M. Rivas, M. Salvador, J. C. Martínez-García, M. Fernández.

1st Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences, NALS2017. Gijón, Diciembre de 2017.

10.- *When a problem meets its solution: Superparamagnetic lateral flow immunoassay for cancer screening*, M. Salvador, L. J. G. Flórez, J. C. Martínez-García, A. Moyano, M.C. Blanco-López, M. Rivas.

1st Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences, NALS2017. Gijón, Diciembre de 2017.

11.- *Choosing the best method for enrichment, characterization, observation, and detection of plasma-derived extracellular vesicles*, Esther Serrano-Pertierra, Myriam Oliveira-Rodríguez, Montserrat Rivas, Pedro Oliva, Javier Villafani, Ana Navarro, M. Carmen Blanco-López, Eva Cernuda-Morollón.

1st Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences, NALS2017. Gijón, Diciembre de 2017.

12.- *Analytical techniques for extracellular vesicles characterization and quantification: a review*, Esther Serrano-Pertierra, Myriam Oliveira-Rodríguez, María Matos, Montserrat Rivas, Carmen Blanco-López.

1st Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences, NALS2017. Gijón, Diciembre de 2017.

3. MEMORIA ECONÓMICA

Financiación		Personal	Inventariable	Fungible	Otros gastos
IUTA	SV-17-GIJÓN-1.	4.500 €			
Principado	FC-15-GRUPIN14-037	18664 €		4300 €	6000 €
Estudiante con ayuda a la investigación	Nombre	Amanda Moyano Artime			
	Tareas	Síntesis, inmunoensayos, calibración en Nanosensor.			
	Período	Año 2017.			

4. OTROS PROYECTOS Y CONTRATOS CON FINANCIACIÓN EXTERNA

Título del proyecto/contrato	NANOPARTÍCULAS PARA BIOAPLICACIONES NANOBIOP
Referencia	MAT2016-81955-REDT
Investigador/a/es principal/es	Carmen Blanco y Montserrat Rivas
Equipo investigador	+ 70 investigadores
Periodo de vigencia	2017-2019
Entidad financiadora	MINECO
Cantidad subvencionada	18500 €