

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2022

INFORME DEL PROYECTO REF. SV-22-GIJON-18

1. Datos del proyecto

Título: Nanopartículas magnéticas para tests rápidos de anticuerpos de SARS-CoV-2

Fechas inicial y final del proyecto: 1-1-2022 al 30-12-2022

Investigador/a Principal: Montserrat Rivas Ardisana

Otros investigadores: Pedro Gorria Korres y María Salvador Fernández

Personal contratado: Leyre Bei Fraile Aguirre

Fechas inicial y final de contratación: 4-7-2022 al 30-12-2022

Empresas o instituciones colaboradoras: Táctica Desarrollo Industrial SL

Redes sociales de investigadores y empresas (Linkedin, Twitter, Instagram):

2. Resumen Gráfico

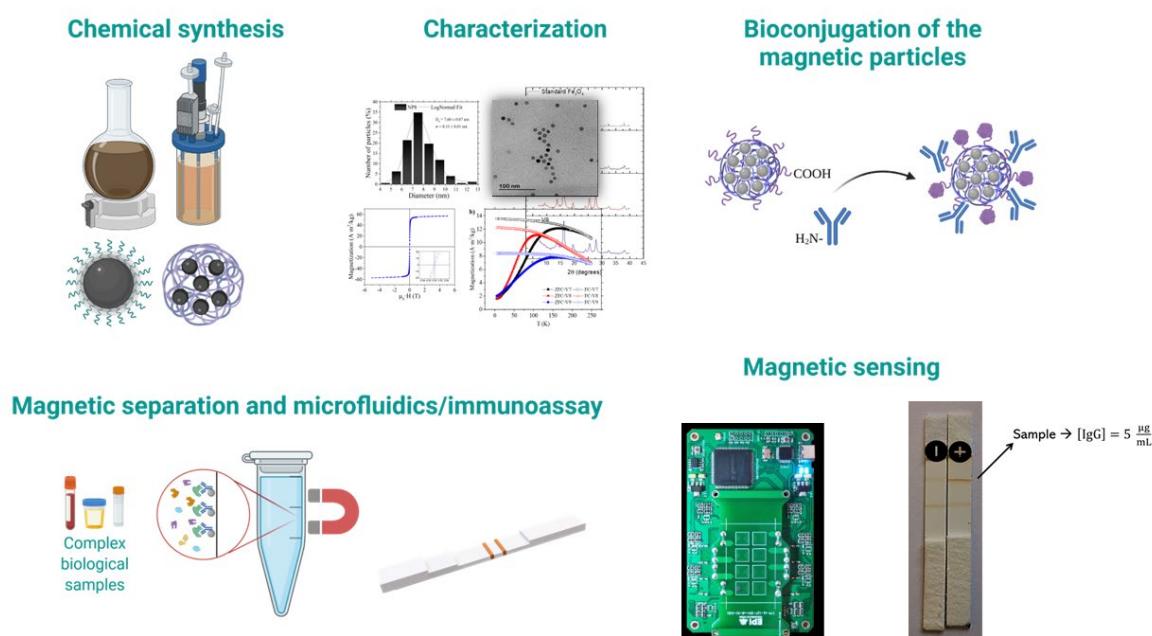


Fig. 1: El proceso seguido en el proyecto comienza con la síntesis de nanopartículas magnéticas por distintas rutas, su posterior caracterización magnética y estructural, su bioconjugación con anticuerpos contra los IgG producidos tras la infección por SARS-CoV2, los ensayos de separación y concentración magnéticas (en este caso se realizaron con otra molécula por la dificultad de obtener los anticuerpos de COVID-19 a tiempo), la calibración de las partículas en el sensor magnético y la

obtención de las primeras tiras de flujo lateral magnético que prueban la capacidad de detección del anticuerpo IgG en el rango de interés clínico.

3. Memoria descriptiva del proyecto

3.1 Resumen ejecutivo

En tiempos de crisis pandémica las palabras “tests serológicos de anticuepos” se han hecho familiares. Su objetivo es conocer la presencia en sangre de anticuerpos contra el coronavirus SARS-CoV-2. La aparición de inmunoglobulina IgM indica que es probable que el sujeto esté padeciendo la enfermedad o la haya padecido muy recientemente, mientras que IgG señala un contacto anterior con el virus (ver gráfico). El test más fiable y cuantitativo se realiza mediante un análisis de sangre cuyos resultados se demoran varias horas o días. Los tests rápidos de flujo lateral son una alternativa, pero tienen menos sensibilidad y carecen de respuesta cuantitativa (dan un resultado positivo/negativo).

En este proyecto pretendemos desarrollar inmunoensayos de flujo lateral en los que las partículas que hacen detectable el anticuerpo sean magnéticas. Perseguimos un doble objetivo:

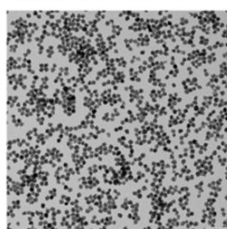
- 1) Las partículas magnéticas se pueden concentrar mediante un imán, lo que las hace más fáciles de detectar.
- 2) Se detectan con un sensor magnético que arrojará una respuesta proporcional al número de partículas, por tanto, cuantitativa.

El fin último sería el desarrollo de una técnica de tests rápidos de anticuerpos para monitorizar la respuesta inmune de personas vacunadas o que han superado la enfermedad y guiar las dosis de refuerzo y el desarrollo de nuevas vacunas.

TAMAÑOS DE PARTÍCULAS OBTENIDOS POR ANÁLISIS DE IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Nanoflores de magnetita recubiertas de ácido cítrico

TAMAÑO – uso del programa ImageJ. Distribución lognormal.
De cada imagen se tomaron 100 medidas

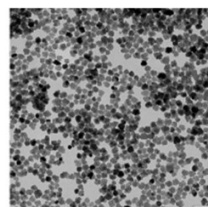


Nº de imágenes analizadas: 3
Tamaños: (nm)

Media	Desviación
40,7326	0,1006
38,3484	0,1217
42,3669	0,0843

Nanoflores de magnetita sinterizadas

TAMAÑO – uso del programa ImageJ. Distribución lognormal.
De cada imagen se tomaron 100 medidas

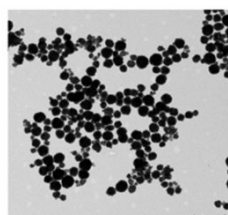


Nº de imágenes analizadas: 8
Tamaños: (nm)

Media	Desviación
27,6113	0,1465
27,4424	0,1482
28,2768	0,1367
27,1141	0,1677
26,8107	0,1762
30,9118	0,1533
28,4872	0,1414
30,9118	0,1533

Nanoflores de magnetita recubiertas de PVP

TAMAÑO – uso del programa ImageJ. Distribución lognormal.
De cada imagen se tomaron 100 medidas



Nº de imágenes analizadas: 7
Tamaños: (nm)

Media	Desviación
170,6817	0,3996
173,3888	0,2888
172,0463	0,3583
185,3359	0,3041
158,7109	0,7171
184,3102	0,2752
197,2552	0,2203

Nanoflores de magnetita ensambladas en ácido poliacrílico

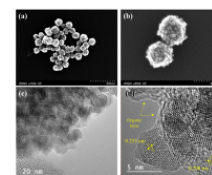
TAMAÑOS

Partículas individuales: 12 nm

Clúster de NPs:

Media: 89 ± 2 nm

Desviación estándar: 0.12 ± 0.03 nm.



Datos obtenidos de:
Salvador M, et al. *Nanomaterials*.
2022; 12(12):2044

La beneficiaria de esta ayuda IUTA ha participado en todas las etapas del proyecto bajo la supervisión de los profesores implicados y ha destacado por su capacidad y autonomía en la caracterización y análisis de las nanopartículas obtenidas de la síntesis (ver figura superior), lo que ha guiado la optimización de los nuevos protocolos.

Resumen tamaños y calibración en los sensores magnéticos

	Sensor de impedancia (dispositivo de sobremesa)		Sensor de resonancia (dispositivo portátil) NANOSS RV0.2		Tamaños de cluster	
	Media (Ohm·mm/mg)	Desviación (Ohm·mm/mg)	Media (Un. Arb.)	Desviación (Un. Arb.)	Media (nm)	Desviación (nm)
NF de Fe ₃ O ₄ recubiertas de cítrico	0,6883	0,102	2386	461,9	40,48	0,10
Sinterizadas	0,487	0,051	1281	230,1	28,45	0,15
Recubiertas de poliacrílico	0,6468	0,021	2158	202,5	89,00	0,12
Recubiertas de PVP	No hay señal	No hay señal	No hay señal	No hay señal	177,39	0,36
Ferritas de Mn	1,2982	0,025	2670	276,7	10	0,3
Ferritas de Mn-Zn	0,65	0,04	1305	299,7	10	0,2

Se han realizado síntesis de nanoflores (partículas de unos 10 nm ensambladas en un polímero) de magnetita, recubiertas de PVP y de ácido cítrico. Se han utilizado nanoflores procedentes de colaboraciones con investigadores extranjeros recubiertas de ácido poliacrílico. Finalmente se han

valorado las nanopartículas de ferritas de manganeso-zinc y de manganeso, sintetizadas en nuestro laboratorio en el transcurso del proyecto con la colaboración de Leyre. Estas últimas son las que mejor señal han proporcionado en los sensores magnéticos (ver tabla adjunta) y, por tanto, las más prometedoras para esta aplicación. Sin embargo, aún trabajamos para ensamblarlas en nanoflores y conseguir así aumentar la señal por unidad de anticuerpo. Por ello, las primeras pruebas de concepto del potencial del sistema para detectar y cuantificar el anticuerpo IgG se realizó con las nanoflores recubiertas de ácido poliacrílico, las segundas en cuanto a señal por unidad de masa. Como puede verse en el resumen gráfico, conseguimos distinguir perfectamente 5 µg por mL de muestra, cantidad que se encuentra en el centro del rango de interés clínico.

3.2 Objetivos iniciales del proyecto y grado de consecución

O1- Estudiar nuevas nanoestructuras magnéticas, tanto monopartículas como multipartículas, para optimizar la señal de detección en un sensor magneto-inductivo. 100% conseguido

O2- Biofuncionalizar las nanoestructuras para realizar inmunoensayos de flujo lateral magnéticos. 50% conseguido (se logró con los anticuerpos de IgG pero no con los de IgM que no pudieron obtenerse comercialmente debido a su escasez en buena parte de la duración del proyecto).

O3- Evaluar la eficacia de las técnicas de manipulación de las partículas mediante gradientes magnéticos para incrementar la sensibilidad de los tests. 75% (se realizó con moléculas de pneumolisina con gran éxito; queda comprobar su eficacia con los anticuerpos del proyecto, si bien el resultado debería ser muy similar al depender esencialmente de las características de las partículas).

O4- Validar la utilidad de los inmunoensayos magnéticos para obtener resultados cuantitativos. 50 % (se obtuvo una prueba de validez del método pero nos falta realizar una curva de calibración con distintas concentraciones estándar y utilizar también IgM).

3.3 Tareas realizadas

En la tabla siguiente, T1, T2, T3 y T4 se refieren a los cuatro trimestres del año 2022; el personal incluye a investigadores que se incorporaron al proyecto después de su solicitud y apoyaron a la estudiante dado que la investigadora principal del proyecto estuvo gran parte del tiempo de baja por enfermedad (7 de marzo al 15 de septiembre).

Actividad	Personal	T1	T2	T3	T4
Síntesis de nanopartículas de ferritas	Vanessa Pilati, Montserrat Rivas, Rodica Turcu, Puerto Morales y Leyre Bei Fraile	X poliacrílico	X ferritas de manganeso y manganeso-zinc	X PVP y sinterizadas	X cítrico
Caracterización estructural (TEM e ICP)	María Salvador y Leyre Bei Fraile	X		X	X
Calibración en los sensores	María Salvador, Leyre Bei Fraile y JL Marqués	X		X	X
Tiras de Flujo Lateral	María Salvador y Leyre Bei Fraile	X			X
Informes de resultados	Leyre Bei Fraile			X	X

•

3.4 Resultados obtenidos

Ejemplo de una lista numerada:

1. Nanopartículas multicore de magnetita de 7-10 nm ensambladas en ácido cítrico, PVP y PVP sinterizadas.
2. Nanopartículas monocore de ferritas de manganeso y manganeso-zinc.
3. Medidas de tamaños del core y del cluster a partir de análisis de imagen de micrografías TEM.
4. Calibración en los sensores magnéticos desarrollados en nuestro laboratorio para esta aplicación.

5. Estudio de la capacidad de las partículas multicore (nanoflores) para su aplicación en preconcentración inmunomagnética de moléculas (se realizó este estudio con la proteína pneumolisina).
6. Obtención de tiras de flujo lateral para detección y cuantificación del anticuerpo IgG generado por el SAR-CoV2 en el rango de interés clínico (no se realizó la calibración en diluciones estándar, pero sí se obtuvo una prueba de concepto que muestra la viabilidad del método).
7. Informe realizado por la estudiante del conjunto de actividades del proyecto; ella participó en tareas relativas a la síntesis, caracterización estructural y magnética, desarrollo de la microelectrónica y se responsabilizó del análisis de tamaños por TEM, calibración de las partículas en el sensor y su correlación.

3.5 Trabajos o necesidades futuras

El éxito del método en la detección del anticuerpo IgG en el rango deseado, nos impulsa a realizar una calibración más completa con distintas concentraciones de este anticuerpo.

Nos gustaría aplicar el método a la detección y cuantificación del anticuerpo IgM, con la idea de una futura detección multiplex (varios analitos en la misma tira).

Buscaremos la forma de ensamblar las nanopartículas de ferrita de manganeso ya que, debido a su menor anisotropía magnética y mayor susceptibilidad, proporcionan mejor señal en los sensores.

3.6 Divulgación de los resultados

A continuación, se detallan las actividades de divulgación de 2022 relacionadas con este proyecto y con subvenciones de los dos años anteriores del IUTA.

Artículos en revistas científicas

1. New Perspective of Planar Inductive Sensors: Radiofrequency Refractometry for Highly Sensitive Quantification of Magnetic Nanoparticles. Jose Luis Marqués-Fernández, María Salvador, José Carlos Martínez-García, Pablo Fernández-Miaja, Alfredo García and Montserrat Rivas. Sensors. Fecha de Envío: 22 Diciembre 2022.

Scopus metrics: Citescore: 6.4; Highest percentile 91% (Q1), 12/136 (Instrumentation); JCR category rank: Q2: Instruments & Instrumentation | Q2: Chemistry, Analytical | Q2: Engineering, Electrical & Electronic; Current Impact Factor: 3.847

2. Magnetic Nanoclusters Increase the Sensitivity of Lateral Flow Immunoassays for Protein Detection: Application to Pneumolysin as a Biomarker for Streptococcus pneumoniae. (Editor's choice) María Salvador, José Luis Marqués-Fernández, Alexander Bunge, José Carlos Martínez-García, Rodica Turcu, Davide Peddis, María del Mar García-Suárez, María Dolores Cima-Cabal and Montserrat Rivas, Nanomaterials, 14 Junio 2022.

Scopus metrics: Citescore: 6.6; Highest percentile: 80% (Q1), 55/280 (General Chemical Engineering); JCR category rank: Q1: Physics, Applied | Q2: Chemistry, Multidisciplinary | Q2: Materials Science, Multidisciplinary | Q2: Nanoscience & Nanotechnology; Current Impact Factor: 5.719

3. Double-Layer Fatty Acid Nanoparticles as a Multiplatform for Diagnostics and Therapy. María Salvador, José Luis Marqués-Fernández, José Carlos Martínez-García, Dino Fiorani, Paolo Arosio, Matteo Avolio, Francesca Brero, Florica Balanean, Andrea Guerrini, Claudio Sangregorio, Vlad Socoliuc, Ladislau Vekas, Davide Peddis and Montserrat Rivas. Nanomaterials, 8 Enero 2022.

Scopus metrics: Citescore: 6.6; Highest percentile: 80% (Q1), 55/280 (General Chemical Engineering); JCR category rank: Q1: Physics, Applied | Q2: Chemistry, Multidisciplinary | Q2: Materials Science, Multidisciplinary | Q2: Nanoscience & Nanotechnology; Current Impact Factor: 5.719

Presentaciones en congresos científicos

Título: Magnetic Nanoparticles and Sensors for Better Rapid Diagnostic Tests

Autores: M. Rivas, M. Salvador, J.L. Marqués, and J.C. Martínez-García

Participación: Charla Plenaria

Congreso: 15th International Symposium on Nanomedicine

Lugar y fecha: Tokushima (Japan), December 2022.

Título: Magnetic Nanoparticles and Sensors for Better Rapid Diagnostic Tests

Autores: M. Rivas, M. Salvador, J.L. Marqués, and J.C. Martínez-García

Participación: Charla Invitada

Congreso: 15th International Symposium on Nanomedicine

Lugar y fecha: Tokushima (Japan), December 2022.

Título: Magnetic nanoclusters ability to increase the sensitivity of lateral flow assays for pneumococcal pneumonia rapid non-invasive diagnosis

Autores: M Salvador, JL Marqués-Fernández, A Bunge, JC Martínez-García, R Turcu, D Peddis, M García-Suárez, MD Cima-Cabal, Montserrat Rivas

Participación: Presentación oral

Congreso: 11th International Conference on Fine Particle Magnetism

Lugar y fecha: Yokohama (Japan), October 2022.

Título: Magnetic Nanoparticles and Sensors for Rapid Diagnostic Testing for Health Care: Application to Pneumonia, Histamine, and COVID Antibodies Detection

Autores: M Rivas, M Salvador, JC Martínez-García, JL Marqués-Fernández, A Bunge, R Turcu, D Peddis, MM García-Suárez, MD Cima-Cabal

Participación: Charla Invitada

Congreso: 6th 3NANO (Nanomaterials, Nanotechnology and Nanomedicine)

Lugar y fecha: Rome (Italy), September 2022.

Título: Magnetic Techniques for Rapid Diagnostic Testing for Health Care and Environmental Monitoring

Autores: M Rivas, M Salvador, JC Martínez-García, JL Marqués-Fernández, A Bunge, R Turcu, D Peddis, MM García-Suárez, MD Cima-Cabal.

Participación: Charla Invitada

Congreso: 15th Joint MMM-Intermag Conference.

Lugar y fecha: New Orleans (USA), January 2022.

Título: Self-resonant frequency of inductors for quantification of magnetic nanoparticles.

Autores: J.L. Marqués, F. Brero, F. G. da Silva, J.C. Martínez-García, M. Mariani, M. Rivas

Participación: Comunicación oral.

Congreso: MMM 2022

Lugar y fecha: Minneapolis, noviembre 2022

Título: Radio frequency impedance monitoring of inductive sensors for quantification of COVID-19 immunoresponse.

Autores: J.L. Marqués, M. Salvador, F. Brero, F. G. da Silva, J.C. Martínez-García, M. Mariani, M. Rivas

Participación: Comunicación oral.

Congreso: SBAN 2022

Lugar y fecha: Madrid, septiembre 2022

Título: Device for quantification of superparamagnetic particles.

Autores: J.L. Marqués, J.C. Martínez-García, M. Salvador, P. Fernández-Miaja, J. Sebastián, M.C. Blanco, M. Rivas.

Participación: Póster

Congreso: 3rd International Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences NALS 2022

Lugar y fecha: Santander, abril de 2022.

Título: Inductive refractometry at radio frequency for magnetic nanoparticle quantification.

Autores: J.L. Marqués, J.C. Martínez-García, M. Salvador, P. Fernández-Miaja, A. García, M. Rivas.

Participación: Comunicación oral. Premio a la mejor presentación oral.

Congreso: EMSA 2022

Lugar y fecha: Madrid Julio 2022.

Título: Test rápido diagnóstico para neumonía bacteriana

Autores: Jose Luis Marqués Fernández, María Salvador Fernández, Montserrat Rivas Ardisana, Jose Carlos Martinez García

Participación: Presentación oral

Congreso: Jornadas de Proyectos del Instituto Universitario de Tecnología de Asturias

Lugar y fecha: Gijón, mayo de 2022

Otras actividades de divulgación

1- Premio al mejor vídeo sobre un proyecto de tesis doctoral: "Magnetism has an impact":

<https://www.youtube.com/watch?v=5yq-VKDabhM>

Entidad: IEEE Magnetics Society, capítulo español

Lugar y fecha: Cádiz, 18 de noviembre de 2022

2- Minicharlas para estudiantes en Magnetismo

Organizadores: María Salvador, José Luis Marqués y José Carlos Martínez

Lugar y fecha: EPIGijón, 2 de diciembre de 2022

4. Memoria económica

4.1 Gastos:

Incluir los gastos asociados al proyecto: personal del contratado IUTA u otras personas colaboradoras, materiales utilizados, amortización de equipos durante el proyecto,...

Concepto	Gasto
Personal	3551
Fungibles	2500
Amortización	1000
Medidas de caracterización	1000
Viajes y dietas	3000
Inscripciones a congresos	2000
TOTAL GASTOS	13051 €

4.2 Ingresos:

Incluir la financiación del proyecto: ayuda del IUTA, ingresos aportados por entidades colaboradoras, financiación propia,...

Entidad/Empresa financiadora Ref. Proyecto/Contrato	Concepto	Ingreso
Ayuda IUTA	Personal	3551
Proyecto AYUD/2021/51822	Otros	9500

TOTAL INGRESOS	13051 €
----------------	---------

5. Bibliografía

- [1] Huang, X.; Aguilar, Z.P.; Xu, H.; Lai, W.; Xiong, Y. Membrane-Based Lateral Flow Immunochromatographic Strip with Nanoparticles as Reporters for Detection: A Review. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 75, 166–180.
- [2] Chun, P. Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. In *Lateral Flow Immunoassay*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; pp. 1–19.
- [3] Moyano, A.; Serrano-Pertierra, E.; Salvador, M.; Martínez-García, J.C.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C. Magnetic Lateral Flow Immunoassays. *Diagnostics* 2020, 10, 288.
- [4] Huang, Z.; Hu, S.; Xiong, Y.; Wei, H.; Xu, H.; Duan, H.; Lai, W. Application and Development of Superparamagnetic Nanoparticles in Sample Pretreatment and Immunochromatographic Assay. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2019, 114, 151–170. [CrossRef]
- [5] Lago-Cachón, D.; Rivas, M.; Martínez-García, J.; Oliveira-Rodríguez, M.; Blanco-López, M. High Frequency Lateral Flow Affinity Assay Using Superparamagnetic Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2017, 423, 436–440.
- [6] Rivas, M.; Lago-Cachón, D.; Martínez-García, J.; Calleja, A. Eddy-Current Sensing of Superparamagnetic Nanoparticles with Spiral-like Copper Circuits. *Sensors Actuators A Phys.* 2014, 216, 123–127.
- [7] Bunge, A.; Porav, A.S.; Borodi, G.; Radu, T.; Pîrnu, A.; Berghian-Grosan, C.; Turcu, R. Correlation between Synthesis Parameters and Properties of Magnetite Clusters Prepared by Solvothermal Polyol Method. *J. Mater. Sci.* 2018, 54, 2853–2875.