



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**Departamento de Química Física y Analítica**

**Programa Oficial de Doctorado en Análisis Químico,  
Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional**

**CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA Y VESÍCULAS  
EXTRACELULARES MEDIANTE INMUNOENSAYOS  
MAGNÉTICOS DE FLUJO LATERAL**

**Tesis doctoral**

**Amanda Moyano Artime**

**Oviedo, 2020**



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español/Otro Idioma: <b>Cuantificación de histamina y vesículas extracelulares mediante inmunoensayos magnéticos de flujo lateral.</b>	Inglés: <b>Quantification of histamine and extracellular vesicles by magnetic lateral flow immunoassays.</b>
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: <b>Amanda Moyano Artime</b>	DNI/Pasaporte/NIE: .
Programa de doctorado: <b>Análisis químico, bioquímico y estructural y modelización computacional.</b>	
Órgano responsable: <b>Centro internacional de postgrado.</b>	

### RESUMEN (en español)

En las últimas décadas existe una demanda creciente de sistemas de detección descentralizados que permitan un análisis rápido e *in situ* de analitos de interés en diferentes campos de aplicación, como puede ser el sanitario, alimentario o medioambiental. El uso de dispositivos bio-analíticos o biosensores portátiles, de fácil uso, rápidos y robustos para tomar decisiones “en el punto de atención” hace frente a esta demanda creciente.

Los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) se encuentran entre los tests descentralizados (que pueden utilizarse fuera de laboratorios especializados) más utilizados. El ejemplo más relevante y utilizado por la población es el test de embarazo. Para extender el uso de este tipo de ensayos, es necesario superar algunas limitaciones, mejorando su sensibilidad y dotándolos de capacidad cuantificadora. En este trabajo se han afrontado estos dos retos usando nanopartículas superparamagnéticas como marcas de detección. El objetivo general de esta tesis es el desarrollo de inmunoensayos magnéticos de flujo lateral para la detección y cuantificación de moléculas y proteínas de interés en diferentes ámbitos de aplicación como es el biosanitario y alimentario. La cuantificación de las nanopartículas superparamagnéticas se llevó a cabo con un sensor inductivo desarrollado por nuestro grupo de investigación.

En primer lugar, se describe un estudio con nanopartículas multi-core magnéticas (nanoflowers) recubiertas de una capa de carbono para su utilización como marca de detección en inmunoensayos de flujo lateral. Este trabajo incluye diferentes técnicas para la caracterización de las nanopartículas, tanto, en disolución como en la tira de flujo lateral. Con el sistema modelo de afinidad biotina-neutravidina se demuestra el potencial de estas nanopartículas como marca de detección óptica para este tipo de inmunoensayos. Como prueba de concepto, se utiliza esta marca de detección para el desarrollo de un LFIA para la determinación de vesículas extracelulares en plasma. Si bien las propiedades ópticas de estas nanopartículas son muy buenas para su detección por reflectancia, las características magnéticas de los núcleos de magnetita resultan insuficientes para una detección magnética óptima. Para mejorar esta última, se sustituyeron las nanoflores de carbono por otro sistema en el que el núcleo de magnetita está formado por nanopartículas con mayor imanación a saturación. Al mismo tiempo, se persiguió evaluar un recubrimiento consistente en una doble capa de ácido oleico. Con el uso de estas nanopartículas se ha abordado el desarrollo de un LFIA magnético con formato sándwich para la determinación de vesículas extracelulares aisladas de plasma de pacientes con cáncer colorrectal. Estudios recientes muestran que el número



de vesículas por encima de un valor umbral se puede relacionar con la presencia de tumores, por lo que un biosensor para su cuantificación tendría gran impacto para diagnóstico. Este tipo de nanopartículas superparamagnéticas permiten una buena detección magnética gracias a las características de estas.

Promovido por los buenos resultados obtenidos con este tipo de nanopartículas, se han empleado para el desarrollo de un LFIA magnético con formato competitivo para la determinación de la amina biógena histamina, analito de interés en el campo de seguridad alimentaria por su acción alérgica. Se ha aplicado este sistema a muestras reales de vino tinto. Los resultados han sido validados mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los datos obtenidos en varios vinos en distinto punto de su elaboración muestran la utilidad de este biosensor para monitorizar histamina en bodegas sin necesidad de un laboratorio central.

El último capítulo recoge resultados preliminares sobre varias líneas de investigación que se han identificado durante la realización de este trabajo. Por un lado, los primeros resultados, desarrollados en una breve estancia en Dublin City University, hacen referencia al diseño de una plataforma electroquímica para la cuantificación de nanovesículas. Se han utilizado liposomas y niosomas como estándar analítico mimético para vesículas extracelulares. Por otro lado, la necesidad de mejoras de sensibilidad identificadas durante este trabajo podría abordarse mediante sistemas de amplificación química relacionados con las nanopartículas magnéticas (MNP) utilizadas como marca de detección. La actividad enzimática peroxidasa de las partículas magnéticas se ha comprobado que puede mejorar la señal óptica en las tiras de flujo lateral. Para mejorar la señal magnética se han encapsulado MNP en liposomas como sistema de múltiples marcas de detección.

Finalmente se incluye una sección que engloba una discusión conjunta, las conclusiones y los posibles trabajos futuros.

### **RESUMEN (en Inglés)**

In recent decades there is a growing demand for decentralized detection systems that allow rapid and in situ analysis of analytes of interest in different fields of application, such as health, food or the environment. The use of portable, easy-to-use, fast and robust bio-analytical devices or biosensors to make decisions “at the point of care” addresses this growing demand.

Lateral flow immunoassays are among the most widely used decentralized tests (which can be used outside specialized laboratories). The most relevant example used by the population is the pregnancy test. To extend the use of this type of assay, it is necessary to overcome some limitations, improving their sensitivity and providing them a quantifying capacity. In this work, these two challenges have been addressed using superparamagnetic nanoparticles as labels. The general objective of this thesis is the development of magnetic lateral flow immunoassays for the detection and quantification of molecules and proteins of interest in different fields of application such as biosanitary and food safety. The quantification of the superparamagnetic nanoparticles was carried out with an inductive sensor developed by our research group.

First, a study with magnetic multi-core nanoparticles (nanoflowers) coated with a carbon layer is described for their use as labels in lateral flow immunoassays. This work includes different techniques for the characterization of nanoparticles, both in solution and in the lateral flow strip. With the biotin-neutravidin affinity model system, the potential of these nanoparticles as optical labels for this type of immunoassay is demonstrated. As proof of concept, this detection label is used for the development of a lateral flow immunoassay for the determination of extracellular vesicles in plasma.



Although the optical properties of these nanoparticles are very good for their detection by reflectance, the magnetic characteristics of the magnetite core are not suitable for an optimal magnetic detection. To improve the latter, the carbon nanoflowers were replaced by another system in which the magnetite cores have a higher saturation magnetization. At the same time, the aim was to evaluate a coating consisting of a double layer of oleic acid. With these nanoparticles, the development of a lateral flow immunoassay with sandwich format for the determination of extracellular vesicles isolated from plasma of patients with colorectal cancer has been addressed. Recent studies show that the number of vesicles above a threshold value can be related to the presence of tumours, so a biosensor for its quantification would have a great impact for diagnosis. This type of superparamagnetic nanoparticles allows a good magnetic detection thanks to their characteristics.

Promoted by the good results obtained with this type of nanoparticles, they have been used for the development of a magnetic lateral flow immunoassay with a competitive format for the determination of the biogenic amine histamine, an analyte of interest in the field of food-safety. This system has been applied to samples of red wine. The results have been validated using high-performance liquid chromatography. The data obtained in various wines at different points in their production show the usefulness of this biosensor to monitor histamine in small cellar without the need for a central laboratory.

The last chapter presents preliminary results on various lines of research that have been identified during the performance of this thesis. On the one hand, the first results, developed in a brief research stay at Dublin City University, include the design of an electrochemical platform for the quantification of nanovesicles. For the development of this platform, liposomes and niosomes have been used as an analytical mimetic standard for extracellular vesicles. On the other hand, the current need for sensitivity improvements identified during this work could be addressed through chemical amplification systems based on magnetic nanoparticles used as labels. The peroxidase enzyme activity of magnetic particles can improve the optical signal in lateral flow strips. Regarding the magnetic signal, the possibility of improving sensitivity has been studied by increasing the number of magnetic cores per analyte unit. And for this, magnetic nanoparticles are encapsulated in liposomes as a multi-label system. Finally, an overall discussion, the conclusions and possible future works are included.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN  
COMPUTACIONAL.**



# TABLA DE CONTENIDOS

---

Estructura de la memoria .....	v
Resumen.....	vii
SUMMARY .....	xi
Lista de abreviaturas y acrónimos.....	xv
Índice de tablas y figuras.....	xix
<b>PARTE A.....</b>	<b>1</b>
A.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
A.1.1 Motivación.....	5
A.1.2 Estado del arte y antecedentes.....	9
A.1.2.1 Vesículas extracelulares y exosomas.....	9
A.1.2.2 Histamina.....	25
A.2 OBJETIVOS .....	31
A.2.1 Objetivos .....	33
A.2.2 Objectives .....	35
A.3 FUNDAMENTOS DE LOS INMUNOENSAYOS DE FLUJO LATERAL..	37
A.3.1 Inmunoensayos de flujo lateral .....	39
A.3.1.1 Materiales para la construcción de LFIA estándar .....	41
A.3.1.2 Procedimiento de fabricación de una tira de flujo lateral ....	43
A.3.1.3 Formatos de las tiras de flujo lateral .....	45
A.3.1.4 Elementos de reconocimiento.....	53
A.3.1.5 Marcas de detección.....	62
A.3.1.6 Estrategias de mejora para los LFIA.....	69
A.3.1.7 Sistemas y dispositivos de detección de LFIA .....	75
A.4 INMUNOENSAYOS MAGNÉTICOS DE FLUJO LATERAL.....	87

A.4.1	Nanopartículas superparamagnéticas como marca de detección en los LFIA	89
A.4.1.1	Ventajas que aporta el magnetismo a las marcas de detección en los LFIA	89
A.4.1.2	Nanopartículas superparamagnéticas .....	90
A.4.1.3	Magnetita y maghemita .....	93
A.4.1.4	Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro .....	94
A.4.1.5	Modificación superficial de las MNPs .....	97
A.4.2	Sensor inductivo .....	98
A.4.3	Review: Magnetic lateral flow immunoassay.....	103
<b>PARTE B: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>135</b>
Capítulo B.1:	Nanoflores como marca de detección en MLFIAs .....	137
B.1.1	Introducción y motivación .....	137
B.1.2	Artículo científico .....	139
Capítulo B.2:	Cuantificación de vesículas extracelulares mediante inmunoensayos magnéticos de flujo lateral. Aplicación a la determinación de biomarcadores de cáncer colorrectal .....	169
B.2.1	Introducción y motivación .....	169
B.2.2	Artículo científico (formato borrador) .....	171
Capítulo B.3:	Desarrollo de ensayos inmunocromatográficos para la determinación de histamina en vino .....	189
B.3.1	Introducción y motivación .....	189
B.3.2	Artículo científico .....	191
Capítulo B.4:	OTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN INICIADAS.....	215
B.4.1	Introducción y motivación .....	215
B.4.2:	Desarrollo de una plataforma electroquímica para la caracterización y cuantificación de EVs .....	217
B.4.3:	Efecto peroxidasa de las nanopartículas superparamagnéticas..	229

B.4.4: Encapsulación de nanopartículas magnéticas con el uso de liposomas 231

**PARTE C: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO..... 233**

C.1 Conclusiones..... 235

C.2 Conclusions..... 239

C.3 Perspectivas de futuro..... 241

C.4 Future prospects ..... 243

**ANEXOS ..... 245**

Anexo I: Técnicas de caracterización de nanopartículas para marcas de detección de inmunoensayos..... 247

Anexo II: Producción científica:..... 257

Anexo III: Facsímiles de las publicaciones científicas derivadas de esta tesis doctoral 261

**REFERENCIAS**





# ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

Esta memoria de tesis se estructura en tres partes.

Antes de la primera parte, el lector encontrará el resumen de la tesis, la lista de todas las abreviaturas, y las listas de tablas y figuras (presentes en toda la tesis, excepto en los artículos).

A continuación, el núcleo de la tesis doctoral se divide en las partes A, B y C como sigue.

La **parte A** de la memoria, introducción, fundamentos básicos y objetivos, se divide en cuatro secciones. En la primera la introducción general sitúa y da explicación a la motivación y estado del arte de la tesis y los objetivos. La segunda sección recoge los objetivos de la tesis. La tercera sección está dedicada a los fundamentos de los inmunoensayos de flujo lateral, explicando las consideraciones básicas del trabajo desarrollado. La cuarta sección estrecha el foco sobre los inmunoensayos magnéticos de flujo lateral, contextualizando todo el trabajo desarrollado durante la tesis.

En la **parte B** se exponen y discuten los **resultados de la tesis**, organizados en cuatro capítulos.

A lo largo de esta Tesis se ha estudiado el uso de diferentes tipos de nanopartículas superparamagnéticas como marca de detección en tiras de flujo lateral, además se han desarrollado varios inmunoensayos magnéticos de flujo lateral para diferentes aplicaciones (ámbito biosanitario y alimentario) siguiendo diferentes tipos de formatos. Por tanto, el apartado Resultados y Discusión se divide en cuatro capítulos, atendiendo al tipo de nanopartícula utilizada, analito detectado y formato de inmunoensayo empleado. Estos capítulos son los siguientes:

- Capítulo B.1: Nanoflores como marca de detección de inmunoensayos magnéticos de flujo lateral. Dentro de este capítulo se encuentran el siguiente artículo ya publicado:
  1. Carbon-coated superparamagnetic nanoflowers for biosensors based on lateral flow immunoassays.

- Capítulo B.2: Cuantificación de vesículas extracelulares mediante inmunoensayos magnéticos de flujo lateral. Aplicación a la determinación de biomarcadores de cáncer colorrectal. Dentro de este capítulo se encuentra el siguiente artículo (en preparación):
  1. Magnetic lateral flow immunoassay for extracellular vesicles quantification. Application to colorectal cancer biomarker detection.
- Capítulo B.3: Desarrollo de ensayos inmunocromatográficos para la determinación de histamina en vino. En este capítulo se presenta un artículo ya publicado:
  1. Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine
- Capítulo B.4: Líneas de investigación a desarrollar:
  - B.4.1.: Introducción y motivación
  - B.4.2.: Desarrollo de una plataforma electroquímica para la caracterización y cuantificación de vesículas extracelulares.

En esta parte del capítulo se presentan los resultados preliminares obtenidos en una breve estancia en *Dublin City University*. Estos resultados no han sido publicados, pero se presentan en formato artículo.
  - B.4.3.: Efecto peroxidasa de las nanopartículas magnéticas
  - B.4.4.: Encapsulación de nanopartículas superparamagnéticas con el uso de liposomas

Todos los artículos que se integran en este trabajo se presentan en los correspondientes capítulos en un formato unificado con el resto de la Memoria para que su lectura sea más cómoda.

En la **parte C** del documento se recogen las conclusiones derivadas de esta investigación de tesis y las perspectivas de continuación.

Finalmente, tres **anexos** detallan respectivamente las técnicas de caracterización utilizadas, la producción científica de la doctoranda y los facsímiles de los artículos científicos directamente derivados de esta tesis.

La sección de **Referencias** incluye todas aquellas citadas fuera de los artículos. Estos últimos incluyen sus referencias en el formato original.

## RESUMEN

En las últimas décadas existe una demanda creciente de sistemas de detección descentralizados que permitan un análisis rápido e *in situ* de analitos de interés en diferentes campos de aplicación, como puede ser el sanitario, alimentario o medioambiental. El uso de dispositivos bio-analíticos o biosensores portátiles, de fácil uso, rápidos y robustos para tomar decisiones “en el punto de atención” hace frente a esta demanda creciente. Este tipo de plataformas son, por ejemplo, de gran utilidad en países en vías de desarrollo donde no existen las condiciones adecuadas para el almacenamiento de dispositivos sofisticados, o la situación económica no es suficiente para tener un laboratorio centralizado. Otro ejemplo más concreto de gran aplicabilidad para este tipo de dispositivos son los servicios de emergencia de una ambulancia donde no se cuenta con las condiciones necesarias, de tiempo y situación, para realizar un análisis más sofisticado, y es de vital importancia la obtención rápida de resultados de una forma sencilla para tomar decisiones inmediatas.

Los inmunoensayos de flujo lateral se encuentran entre los tests descentralizados (que pueden utilizarse fuera de laboratorios especializados) más utilizados. El ejemplo más relevante y utilizado por la población es el test de embarazo. Es una plataforma basada en papel de detección binaria (positivo/negativo) que confirma si una mujer está embarazada cuando se detecta en su orina la presencia de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG). Para extender el uso de este tipo de ensayos, es necesario superar algunas limitaciones, mejorando su sensibilidad y dotándolos de capacidad cuantificadora. En este trabajo se han afrontado estos dos retos usando nanopartículas superparamagnéticas como marcas de detección. El objetivo general de esta tesis es el desarrollo de inmunoensayos magnéticos de flujo lateral para la detección y cuantificación de moléculas y proteínas de interés en diferentes ámbitos de aplicación como es el biosanitario y alimentario. La cuantificación de las nanopartículas superparamagnéticas se llevó a cabo con un sensor inductivo desarrollado por nuestro grupo de investigación.

En primer lugar, se describe un estudio con nanopartículas multi-core magnéticas (nanoflowers) recubiertas de una capa de carbono para su utilización

como marca de detección en inmunoensayos de flujo lateral. Este trabajo incluye diferentes técnicas para la caracterización de las nanopartículas, tanto, en disolución como en la tira de flujo lateral, y con el sistema modelo de afinidad biotina-neutravidina se demuestra el potencial de estas nanopartículas como marca de detección óptica para este tipo de inmunoensayos. Como prueba de concepto, se utiliza esta marca de detección para el desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral para la determinación de vesículas extracelulares en plasma. Si bien las propiedades ópticas de estas nanopartículas son muy buenas para su detección por reflectancia, las características magnéticas de los núcleos de magnetita resultan insuficientes para una detección magnética óptima. Para mejorar esta última, se sustituyeron las nanoflores de carbono por otro sistema en el que el núcleo de magnetita está formado por nanopartículas con mayor imanación a saturación. Al mismo tiempo, se persiguió evaluar un recubrimiento consistente en una doble capa de ácido oleico. Con el uso de estas nanopartículas se ha abordado el desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral con formato sándwich para la determinación de vesículas extracelulares aisladas de plasma de pacientes con cáncer colorrectal. Estudios recientes muestran que el número de vesículas por encima de un valor umbral se puede relacionar con la presencia de tumores, por lo que un biosensor para su cuantificación tendría gran impacto para diagnóstico. Este tipo de nanopartículas superparamagnéticas permiten una buena detección magnética gracias a las características de estas.

Promovido por los buenos resultados obtenidos con este tipo de nanopartículas, se han empleado para el desarrollo de un inmunoensayo magnético de flujo lateral con formato competitivo para la determinación de la amina biógena histamina, analito de interés en el campo de seguridad alimentaria por su acción alérgica. La curva de respuesta obtenida para los inmunoensayos magnéticos de flujo lateral es muy similar a la correspondiente obtenida con nanopartículas de oro, marca de detección convencional en estos tests. Se ha aplicado este sistema a muestras reales de vino tinto. Las medidas ópticas y magnéticas, correspondientes a las nanopartículas superparamagnéticas, siguen la misma tendencia, y los resultados han sido validados mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los datos obtenidos en varios vinos en distinto punto de su elaboración muestran la utilidad de este

biosensor para monitorizar histamina en bodegas sin necesidad de un laboratorio central.

El último capítulo recoge resultados preliminares sobre varias líneas de investigación que se han identificado durante la realización de este trabajo. Por un lado, los primeros resultados, desarrollados en una breve estancia en Dublin City University, hacen referencia al diseño de una plataforma electroquímica para la cuantificación de nanovesículas. Para el desarrollo de esta plataforma se han utilizado liposomas y niosomas como estándar analítico mimético para vesículas extracelulares. Estas vesículas artificiales permiten el control del tamaño de las partículas mediante la optimización de diferentes parámetros durante la síntesis. Por otro lado, la necesidad de mejoras de sensibilidad identificadas durante este trabajo podría abordarse mediante sistemas de amplificación química relacionados con las nanopartículas magnéticas (MNPs) utilizadas como marca de detección. La actividad enzimática peroxidasa de las partículas magnéticas se ha comprobado que puede mejorar la señal óptica en las tiras de flujo lateral. En cuanto a la señal magnética, se ha estudiado la posibilidad de mejorar la sensibilidad aumentando el número de núcleos magnéticos por unidad de analito. Y para ello se han encapsulado MNPs en liposomas como sistema de múltiples marcas de detección.

Finalmente se incluye una sección que engloba una discusión conjunta, las conclusiones y los posibles trabajos futuros.



## SUMMARY

In recent decades there is a growing demand for decentralized detection systems that allow rapid and in situ analysis of analytes of interest in different fields of application, such as health, food or the environment. The use of portable, easy-to-use, fast and robust bio-analytical devices or biosensors to make decisions “at the point of care” addresses this growing demand. This type of platform is, for example, very useful in developing countries where there are not adequate conditions for the storage of sophisticated devices, or the economic situation is not enough to have a centralized laboratory. Another more concrete example is the emergency services of an ambulance where there are not the necessary conditions, of time and situation, to carry out a more sophisticated analysis, and it is essential to obtain quick results to make immediate decisions.

Lateral flow immunoassays are among the most widely used decentralized tests (which can be used outside specialized laboratories). The most relevant example used by the population is the pregnancy test. It is a binary (positive / negative) screening paper-based platform that confirms whether a woman is pregnant when the presence of hCG is detected in her urine. To extend the use of this type of assay, it is necessary to overcome some limitations, improving their sensitivity and providing them a quantifying capacity. In this work, these two challenges have been addressed using superparamagnetic nanoparticles as labels. The general objective of this thesis is the development of magnetic lateral flow immunoassays for the detection and quantification of molecules and proteins of interest in different fields of application such as biosanitary and food safety. The quantification of the superparamagnetic nanoparticles was carried out with an inductive sensor developed by our research group.

First, a study with magnetic multi-core nanoparticles (nanoflowers) coated with a carbon layer is described for their use as labels in lateral flow immunoassays. This work includes different techniques for the characterization of nanoparticles, both in solution and in the lateral flow strip. With the biotin-neutravidin affinity model system, the potential of these nanoparticles as optical labels for this type of immunoassay is demonstrated. As proof of concept, this



detection label is used for the development of a lateral flow immunoassay for the determination of extracellular vesicles in plasma. Although the optical properties of these nanoparticles are very good for their detection by reflectance, the magnetic characteristics of the magnetite core are not suitable for an optimal magnetic detection. To improve the latter, the carbon nanoflowers were replaced by another system in which the magnetite cores have a higher saturation magnetization. At the same time, the aim was to evaluate a coating consisting of a double layer of oleic acid. With these nanoparticles, the development of a lateral flow immunoassay with sandwich format for the determination of extracellular vesicles isolated from plasma of patients with colorectal cancer has been addressed. Recent studies show that the number of vesicles above a threshold value can be related to the presence of tumours, so a biosensor for its quantification would have a great impact for diagnosis. This type of superparamagnetic nanoparticles allows a good magnetic detection thanks to their characteristics.

Promoted by the good results obtained with this type of nanoparticles, they have been used for the development of a magnetic lateral flow immunoassay with a competitive format for the determination of the biogenic amine histamine, an analyte of interest in the field of food-safety. The response curve obtained for magnetic lateral flow immunoassays is very similar to the corresponding obtained with gold nanoparticles, a conventional label in these tests. This system has been applied to samples of red wine. Optical and magnetic measurements, corresponding to superparamagnetic nanoparticles, follow the same trend, and the results have been validated using high-performance liquid chromatography. The data obtained in various wines at different points in their production show the usefulness of this biosensor to monitor histamine in small cellar without the need for a central laboratory.

The last chapter presents preliminary results on various lines of research that have been identified during the performance of this thesis. On the one hand, the first results, developed in a brief research stay at Dublin City University, include the design of an electrochemical platform for the quantification of nanovesicles. For the development of this platform, liposomes and niosomes have been used as an analytical mimetic standard for extracellular vesicles.

These artificial vesicles allow the control of the particle size by optimizing different parameters during the synthesis. On the other hand, the current need for sensitivity improvements identified during this work could be addressed through chemical amplification systems based on magnetic nanoparticles used as labels. The peroxidase enzyme activity of magnetic particles can improve the optical signal in lateral flow strips. Regarding the magnetic signal, the possibility of improving sensitivity has been studied by increasing the number of magnetic cores per analyte unit. And for this, magnetic nanoparticles are encapsulated in liposomes as a multi-label system.

Finally, an overall discussion, the conclusions and possible future works are included.



## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>AB / BAs</b>	Aminas biógenas	<i>Biogenic amines</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>AFB<sub>1</sub></b>	Estriol no conjugado	<i>Aflatoxin B<sub>1</sub></i>
<b>AFM</b>	Microscopia/microscopio de fuerza atómica	<i>Atomic Force microscopy/microscope</i>
<b>AIV H7</b>	Virus de la influenza aviar subtipo H7	<i>Avian influenza virus subtype H7</i>
<b>AOZ</b>	Metabolito de furazolidona de 3-amino-2-oxazolidinona	<i>Furazolidone metabolite of 3-amino-2-oxazolidinone</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>ARNm</b>	ARN mensajero	<i>Messenger RNA</i>
<b>ASSURED</b>	Asequible, sensible, específico, fácil de usar, rápido y robusto, libre de equipamiento y entregado a quien los necesitan	<i>Affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid and robust, equipment-free and delivered to the end users</i>
<b>ATR</b>	Reflectancia total atenuada	<i>Attenuated total reflectance</i>
<b>AuNP</b>	Nanopartículas de oro	<i>Gold nanoparticles</i>
<b>BoNT</b>	Neurotoxina botulínica	<i>Botulinum neurotoxin</i>
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>CA72-4</b>	Antígeno de carbohidratos 72-4	<i>Carbohydrate antigen 72-4</i>
<b>CCR / CRC</b>	Cáncer colorrectal	<i>Colorectal cancer</i>
<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionario	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
<b>CG / GC</b>	Cromatografía de gas	<i>Gas chromatography</i>
<b>CKMB</b>	soenzima MB de creatina quinasa	<i>Creatine kinase isoenzyme MB</i>
<b>CL / LC</b>	Cromatografía líquida	<i>Liquid chromatography</i>
<b>CNP</b>	Nanopartículas de carbono	<i>Carbon nanoparticles</i>
<b>cTnI</b>	Troponina I	<i>Troponin I</i>
<b>DLS</b>	Dispersión de luz dinámica	<i>Dynamic light scattering</i>
<b>dsADN</b>	ADN de doble cadena	<i>Double-stranded ADN</i>
<b>EC / CE</b>	Electroforesis capilar	<i>Capillary electrophoresis</i>
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	<i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i>
<b>EDS</b>	Espectroscopia de dispersión de energía de rayos X	<i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	<i>Enzyme linked immunodorbent assay</i>
<b>EMMPRIN</b>	Matriz extracelular inductor de metaloproteinasa	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
<b>EVs</b>	Vesículas extracelulares	<i>Extracellular vesicles</i>
<b>FCA</b>	Nanopartículas de fósforo de conversión ascendente	<i>Up-converting phosphor nanoparticles</i>
<b>FDA</b>	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	Magnetita	<i>Magnetite</i>

<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AO</b>	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro recubiertas con una doble capa de ácido oleico	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with a double layer of oleic acid</i>
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C</b>	Nanoflowers superparamagnéticas de óxido de hierro recubiertas por una capa negra de carbono	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoflowers coated by a black carbon layer</i>
<b>FFF</b>	Fraccionamiento de flujo de campo	<i>Field-flow fractionation</i>
<b>FTIR</b>	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	<i>Fourier-Transform Infrared spectroscopy</i>
<b>GMR</b>	MR gigante	<i>Giant MR</i>
<b>H</b>	Histamina	<i>Histamine</i>
<b>hCG</b>	Gonadotropina coriónica humana	<i>Human chorionic gonadotropin</i>
<b>HIV</b>	Virus de inmunodeficiencia humana	<i>Human immunodeficiency virus</i>
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano	<i>Horseradish peroxidase</i>
<b>HRTEM</b>	Microscopia/microscopio electrónica de transmisión de alta resolución	<i>High-resolution transmission electron microscopy/microscope</i>
<b>IFN-γ</b>	Interferón gamma	<i>Interferon gamma</i>
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina	<i>Immunoglobulin</i>
<b>ILV</b>	Vesículas intraluminales	<i>Intra-luminal vesicles</i>
<b>IMS</b>	Separación inmunomagnética	<i>Immunomagnetic separation</i>
<b>IncARN</b>	ARN no codificado	<i>Non-coding ARN</i>
<b>IR</b>	Espectroscopia infrarroja	<i>Infrared spectroscopy</i>
<b>ISens</b>	Sensor inductivo	<i>Inductive sensor</i>
<b>ISM</b>	Inmunoseparación magnética	<i>Magnetic immunoseparation</i>
<b>KLH</b>	Hemocianina de lapa californiana	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
<b>LC* / CL*</b>	Línea de control	<i>Control line</i>
<b>LED</b>	Diodo emisor de luz	<i>Light-emitting diode</i>
<b>LFIA</b> s	Inmunoensayos de flujo lateral	<i>Lateral flow immunoassay</i>
<b>LFS</b> s	Tiras de flujo lateral	<i>Lateral flow strips</i>
<b>LOD</b>	Límite de detección	<i>Limit of detection</i>
<b>LT / TL</b>	Línea de test	<i>Test line</i>
<b>MAR</b>	Lectores de ensayos magnéticos	<i>Magnetic assays readers</i>
<b>MES</b>	2- ( N morfolino) etanosulfónico	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
<b>mEVs</b>	Vesículas extracelulares medianas	<i>Medium extracellular vesicles</i>
<b>miARN</b>	Micro ARN	<i>Micro ARN</i>
<b>MLFIAs</b>	Inmunoensayo magnético de flujo lateral	<i>Magnetic lateral flow immunoassay</i>
<b>MNPs</b>	Nanopartículas magnéticas	<i>Magnetic nanoparticles</i>
<b>MR</b>	Magnetoresistencia	<i>Magnetoresistance</i>
<b>MVB</b>	Cuerpos multivesiculares	<i>Multivesicular bodies</i>
<b>Myo</b>	Mioglobina	<i>Myoglobin</i>
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida	<i>N-Hydroxysuccinimide</i>

<b>NPs</b>	Nanopartículas	<i>Nanoparticles</i>
<b>NSE</b>	Enolasa específica de neuronas	<i>Neuron specific enolase</i>
<b>NTA</b>	Análisis de seguimiento de partículas	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
<b>NT-proBNP</b>	Péptido natriurético de tipo pro-B amino-terminal	<i>Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide</i>
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud	<i>World Health Organization</i>
<b>OVA</b>	Ovoalbúmina	<i>Ovalbumin</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PCR* / CRP</b>	Proteína-C reactiva	<i>C-reactive protein</i>
<b>PDI</b>	Índice de polidispersidad	<i>Polydispersity index</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol	<i>Polyethylene glycol</i>
<b>POC</b>	Punto de atención	<i>Point of care</i>
<b>POCT</b>	Pruebas en el punto de atención	<i>Point of care testing</i>
<b>PSA</b>	Antígeno específico de próstata	<i>Prostate specific antigen</i>
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
<b>QD</b>	Puntos cuánticos	<i>Quantum dots</i>
<b>RF</b>	Radiofrecuencia	<i>Radio frequency</i>
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa	<i>Relative standard deviations</i>
<b>SEC</b>	Cromatografía por exclusión de tamaños	<i>Size-Exclusion Chromatography</i>
<b>SELEX</b>	Evolución Sistemática de ligandos por Enriquecimiento Exponencial	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
<b>SEM</b>	Microscopía/microscopio electrónica de barrido	<i>Scanning electron microscopy/microscope</i>
<b>SeNP</b>	Nanopartículas de selenio	<i>Selenium nanoparticles</i>
<b>SERS</b>	Espectroscopia Raman sobre superficies metálicas nanoestructuradas	<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy or surface-enhanced Raman scattering</i>
<b>sEVs</b>	Vesículas extracelulares pequeñas	<i>Small extracellular vesicles</i>
<b>SMISensor</b>	Sensor magneto-inductivo de escaneo	<i>Scanning MagnetInductive Sensor</i>
<b>SNPs</b>	Polimorfismos de un sólo nucleótido	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
<b>SQUID</b>	Dispositivos superconductores de interferencia cuántica	<i>Superconducting quantum interference device</i>
<b>Sulfo-NHS</b>	Sulfo-N-hidroxisuccinimida	<i>Sulfo-N-Hydroxysuccinimide</i>
<b>T</b>	Tiramina	<i>Tyramine</i>
<b>tARN</b>	ARN de transferencia	<i>Transfer ARN</i>
<b>TEM</b>	Microscopía/microscopio electrónica de transmisión	<i>Transmission electron microscopy/microscope</i>
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico	<i>Thermogravimetric Analysis</i>
<b>TMR</b>	MR de túnel	<i>Tunnel MR</i>
<b>TRPS</b>	Detección de pulso resistivo sintonizable	<i>Tunable Resistive Pulse Sensing</i>
<b>uE<sub>3</sub></b>	Estriol no conjugado	<i>Unconjugated estriol</i>
<b>UHPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra-alta resolución	<i>Ultra-high-performance liquid chromatography</i>
<b>VIS-UV</b>	Visible-Ultravioleta	<i>Visible-ultraviolet</i>

---

<b>VSM</b>	Magnetómetro de muestra vibrante	<i>Vibrating Sample Magnetometer</i>
<b>WB</b>	Western blot/blotting	<i>Western blot/blotting</i>
<b>XRD</b>	Difracción de rayos X	<i>X-ray diffraction</i>

---

# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## TABLAS

Tabla 1. Diferentes tipos de biosensores, clasificados atendiendo al tipo de detección, empleados para la detección de exosomas. .... 23

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de los LFIA. .... 40

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de dispositivos utilizados para la detección cuantitativa de los inmunoensayos de flujo lateral. En este caso se clasifican atendiendo a su forma, tamaño y conformación de los elementos que los integran. .... 76

Tabla 4. Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de síntesis empleados para la obtención de nanopartículas superparamagnéticas. .... 97

Tabla AI- 1. Técnicas de caracterización empleadas para el estudio de las nanopartículas e información proporcionada en cada caso. .... 247

Tabla AII- 1. Factor de impacto (*IF Impact Factor*) de las revistas en las que aparecen publicados los artículos recogidos en esta tesis doctoral. .... 257

Tabla AII- 2. Factor de impacto (*IF Impact Factor*) de las revistas en las que aparecen publicados otros artículos en los que ha participado la doctoranda durante su tesis. 258

## FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de biogénesis y secreción de exosomas. Esquema simplificado de la estructura y composición de un exosoma. .... 10



Figura 2. Esquema del proceso de ultracentrifugación. (A) Ultracentrifugación diferencial a través del uso de una serie de fuerzas centrífugas diferenciales que son aplicadas varias veces. (B) Ultracentrifugación por gradiente de densidad a través del uso de una disolución de sacarosa. ....	13
Figura 3. Reacción de descarboxilación de la histidina para la obtención de histamina. ....	25
Figura 4. Imagen de un test de embarazo formato sándwich. ....	39
Figura 5. Esquema de los diferentes componentes básicos que forman una tira de flujo lateral y los materiales más empleados en cada caso. ....	41
Figura 6. Esquema de la forma en la que se ensamblan los diferentes componentes en una tira de flujo lateral y su dirección de flujo. ....	43
Figura 7. Esquema del proceso de fabricación de las tiras de flujo lateral. ....	44
Figura 8. Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral formato tipo sándwich. En el formato tipo sándwich la respuesta es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra en el caso de muestras positivas. En el caso de ausencia de analito, no se observa señal en la línea de test. ....	46
Figura 9. Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral de formato competitivo. En este tipo de formato, la respuesta es indirectamente proporcional a la concentración de analito en el caso de muestras positivas. En el caso de ausencia de analito, la respuesta en la línea de test se corresponde con la más intensa. Formato competitivo tipo 1: se inmoviliza el antígeno en la membrana. Formato competitivo tipo 2: se inmoviliza el anticuerpo de captura en la membrana. ....	47
Figura 10. Formatos de inmunoensayos de flujo lateral con detección multiplex siguiendo estrategias que implican la modificación del diseño y arquitectura de la tira: (A) Varias líneas de test en una misma tira, (B) diseño de la zona de test haciendo uso de la tecnología microarray. Unión de varias tiras con el uso de carcasas con diferentes disposiciones: paralela (C), en forma de estrella (D) y disco (D). LT: Línea de test, LC*: Línea de control y T: número de test. ....	49

Figura 11. Formatos de inmunoensayos de flujo lateral con detección multiplex siguiendo estrategias que implican la modificación de los elementos de reconocimiento o marcas de detección. (A) Uso de anticuerpos que reconocen una clase de analitos. (B) Uso de varias marcas para detectar diferentes analitos en una misma línea de test.....	51
Figura 12. Formato dipstick o formato tubo. (A) Adición de la muestra y la marca de detección. (B) Introducción de la tira en el tubo verticalmente. (C) Posibles resultados según el formato (sándwich o competitivo). .....	53
Figura 13. Elementos de reconocimiento más empleados en los inmunoensayos de flujo lateral.....	54
Figura 14. Esquema de la estructura de una inmunoglobulina.....	55
Figura 15. Esquema de los diferentes tipos de anticuerpos. ....	56
Figura 16. Representación esquemática de diferentes formatos de ensayos de flujo lateral para la detección de ácidos nucleicos. Formato dependiente de anticuerpos o inmunoensayo de flujo lateral de ácido nucleicos (A). Formato independiente de anticuerpos o tira de flujo lateral de ácidos nucleicos en los que se puede utilizar para la inmovilización de la sonda: adsorción pasiva (B) o albumina de suero bovino (BSA) (C). .....	61
Figura 17. Marcas de detección más empleadas en los inmunoensayos de flujo lateral. ....	63
Figura 18. Estrategias de mejora para los LFIA. (A) Inmovilización aleatoria vs Inmovilización orientada de los anticuerpos de captura en la membrana de nitrocelulosa. (B) Inmovilización aleatoria vs Inmovilización orientada de los anticuerpos de detección en la superficie de la marca. ....	71
Figura 19. Configuraciones de medida en los dispositivos de detección ópticos: (A) confocal y (B) fuera del eje. ....	78
Figura 20. Dispositivos de escaneo confocal para la obtención de medidas ópticas (reflectancia y fluorescencia). ....	80

Figura 21. Resumen de los diferentes tipos de comportamientos magnéticos. ....	91
Figura 22. Bobina plana del sensor inductivo que consta de una doble línea de cobre la cual está impresa sobre un sustrato aislante. ....	99
Figura 23. Microposicionador diseñado para escanear las tiras de MLFIAs. ....	100
Figura 24. (A) Representación gráfica de la variación de la impedancia obtenida del escaneo de una tira de flujo lateral con el sensor inductivo. (B) Reproducibilidad de las medidas de impedancia obtenidas con el sensor inductivo. ....	101
Figura 25. Calibración del sensor ISens para diferentes masas de MNPs. ....	101
Figura 26. Imagen de TEM para las MNPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ . ....	137
Figura 27. Reacción enzimática de las MNPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ en presencia de $\text{H}_2\text{O}_2$ y TMB. ....	230
Figura 28. Amplificación de la señal óptica a través de la actividad peroxidasa de las MNPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . ....	230
Figura 29. Ejemplo de LFIA (blanco y muestra) para el sistema de afinidad biotina-neutravidina usando como marca de detección liposomas magnéticos. ....	232
Figura AI- 1. Representación gráfica de los ciclos de histéresis. (A) Nanopartículas magnéticas que no muestran histéresis. (B) Nanopartículas magnéticas que exhiben histéresis. ....	254
Figura AI- 2. Esquema de las diferentes partes de un VSM. ....	254

## PARTE A

---



## A.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

---



### **A.1.1 Motivación**

La necesidad de sistemas de bio-detección rápidos para biomedicina, alimentación y medioambiente es reflejada en la sociedad tras los brotes infecciosos, crisis de seguridad alimentaria y crisis medioambientales a las que nos hemos tenido que enfrentar en las últimas décadas. La crisis sanitaria a la que actualmente estamos haciendo frente, provocada por el coronavirus SARS-CoV en 2020, ha manifestado, una vez más, la necesidad de investigar y desarrollar en esta línea. Otras crisis importantes en el ámbito alimentario, como la crisis desatada por la bacteria *Escherichia coli* (comúnmente conocida como la crisis del pepino) en 2011 o la crisis “de las vacas locas” en 2000 ya habían dejado reflejada la falta de dispositivos bio-analíticos portátiles de respuesta rápida. De forma similar, existen numerosos ejemplos de crisis medioambiental, entre los que se encuentra el vertido de residuos de la industria farmacéutica, que requiere su control en las aguas medioambientales y de riego para evitar su acumulación en las tierras agrícolas. Esto provoca una gran consecuencia, puesto que la presencia descontrolada de antibiótico en el medio ambiente es una de las causas de la resistencia microbiana desarrollada por muchas bacterias patógenas. Los sistemas de bio-detección rápida permiten un control sencillo de las aguas. Si bien estas crisis provocan un gran impacto negativo sobre la salud de la población, tampoco, nos podemos olvidar de los aspectos económicos negativos que implican, causados por diferentes factores, como la reducción del comercio internacional, la crisis del sector terciario, así como los gastos sanitarios extraordinarios derivados.

Entre las técnicas comúnmente más utilizadas y consolidadas para la detección y cuantificación de biomoléculas cabe destacar las técnicas cromatográficas, la espectrometría de masas y los inmunoensayos, como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (en inglés llamados *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA). Estas técnicas presentan ciertas limitaciones, como son su elevada complejidad y coste, personal específicamente cualificado y, particularmente en situaciones de crisis, son lentas.

Por lo tanto, debido estas limitaciones el esfuerzo de la comunidad científica por investigar y desarrollar dispositivos bio-analíticos para “el punto de atención” ha aumentado notablemente debido a las ventajas que ofrecen.

Se llama dispositivos en el punto de atención a las herramientas bioanalíticas que, por sus características, se pueden utilizar en el lugar donde se necesitan sin tener que acudir a un laboratorio centralizado. Habitualmente se refieren por sus siglas en inglés,



denominándose POC (Point of Care) cuando se usan con fines biomédicos y POU (Point of Use) or PON (Point of Need) en otras aplicaciones. En esta tesis nos referiremos a ellos como POCT (en inglés llamados *Point of Care Testing* – POCT) en todos los casos.

Los dispositivos POCT son herramientas biomédicas que permiten obtener información sobre la condición de un individuo de forma casi-inmediata en el punto de aplicación (por ejemplo, junto a la cama del paciente o en la ambulancia que lo atiende) para facilitar decisiones inmediatas sobre la aplicación de un tratamiento o la realización de pruebas diagnósticas adicionales [1]. Una característica principal de estas herramientas es su simplicidad de manejo, que facilita su utilización en un entorno descentralizado, sin la necesidad de acudir a un laboratorio para realizar la prueba. Por ejemplo, estas pruebas de diagnóstico se pueden realizar en la consulta del médico de atención primaria, en entornos de atención secundaria o terciaria y pueden ser de gran utilidad en lugares de bajo desarrollo urbano o industrial sin laboratorios de análisis ni especialistas. De esta forma se permite ampliar la accesibilidad, casi inmediata, al diagnóstico, combinada con el uso de volúmenes mínimos de muestra y un coste reducido. Idealmente, los POCT deben proporcionar los primeros resultados en minutos siguiendo un protocolo simple, con uno o dos pasos, para el análisis de sangre, orina u otras muestras biológicas. Por lo tanto, se simplifican protocolos con su empleo, pues no es necesario el pretratamiento de la muestra. Generalmente, estos dispositivos suelen ser cartuchos o tiras de un solo uso que nos proporcionan resultados cualitativos, o incluso cuantitativos si se utilizan lectores portátiles de fácil manejo. Un ejemplo de plataforma POCT muy conocido es el glucómetro que usan los diabéticos para controlar sus niveles de glucosa en sangre [2]. Se trata de una plataforma electroquímica desechable acoplada a un dispositivo lector portátil, que permite conocer la concentración de glucosa en sangre en segundos con una gota de sangre. Además, permite al paciente realizar la prueba en cualquier lugar para saber si debe administrarse insulina, así como la dosis necesaria.

Las ventajas que tienen estos dispositivos hacen que sean muy interesantes no sólo en el ámbito del diagnóstico clínico, sino también en alimentación [3], agricultura [4], veterinaria [5], detección de drogas [6] o de contaminantes [7]. Además, este tipo de ensayos se pueden diseñar para analizar múltiples analitos de forma simultánea [8].

Desde un punto de vista puramente analítico los dispositivos POCT deben cumplir las características propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que se resumen en el acrónimo ASSURED (estas son las iniciales de la voz inglesa de los requisitos) [1,9]:

- Asequible (**A**ffordable) para aquella población en riesgo.
- Sensible (**S**ensitive): que garantice un bajo índice de falsos negativos y tenga la capacidad de detectar las concentraciones necesarias.
- Específico (**S**pecific): que garantice bajo porcentaje de falsos positivos.
- Fácil de usar (**U**ser-friendly): de sencillo manejo por personal sin cualificación o formación previa.
- Rápido y robusto (**R**apid and robust): que aporte resultados en tiempo real y reproducibles y no requiera delicadas condiciones de almacenaje.
- Libre de equipamiento (**E**quipment-free): sin la necesidad de utilizar instrumentación sofisticada.
- Entregado a quien los necesitan (**D**elivered to the end users), directamente accesible al usuario final.

Estos requisitos acercan la biodetección a los usuarios en países en vías de desarrollo [9] y contribuyen a la sostenibilidad de los sistemas sanitarios (imprescindible incluso en los países más desarrollados en situaciones de crisis sanitaria).

Algunos ejemplos de dispositivos POCT se muestran a continuación [10]:

- a) Dispositivos comerciales basados en teléfonos móviles y aplicaciones inteligentes [11].
- b) Ensayos basados en papel (Paper Analytical Devices) [12]: a su vez estos se dividen en tiras de flujo lateral (lateral flow immunoassays, LFIAs), tiras reactivas (reactive strips), ensayos de flujo a través (flow through assay) y dispositivos microfluídicos de análisis en papel (microfluidic paper-based analytical devices).
- c) Laboratorio en un chip (lab-on-a-chip): se trata de dispositivos que integran una o varias funciones propias de un laboratorio en un único chip con dimensiones no superiores a los centímetros cuadrados [13].

Entre los dispositivos POCT más utilizados se encuentran algunos sensores, dispositivos miniaturizados capaces de proporcionar información sobre un sistema determinado. La adquisición de datos sobre la composición química del sistema es convertida en una señal analítica medible resultante de la interacción entre el sensor y la especie química a detectar. La reacción que tiene lugar entre el analito y el elemento de reconocimiento es detectada por un transductor, que la convierte en una señal analítica medible que puede ser de diferentes tipos atendiendo al tipo de sensor. Los sensores químicos que utilizan un mecanismo bioquímico o biológico como sistema de reconocimiento son conocidos como sensores bioquímicos o biosensores [14]. La

información que se puede obtener de esta interacción bioquímica es, por lo general, la presencia (información cualitativa) o la concentración de un analito determinado, si se trata de una medida cuantitativa. Por ello, las características más importantes que ha de cumplir el elemento de reconocimiento (también llamado bio-receptor) son una alta selectividad y elevada afinidad por el analito de interés en la matriz de una muestra y estabilidad [15].

Por otro lado, cabe destacar las tiras de flujo lateral como los dispositivos POCT por excelencia. Aunque son bien conocidas en el campo médico para detectar biomarcadores, también se encuentran ejemplos comerciales para identificación en alimentos de alérgenos y toxinas y para detección de drogas de abuso. Tradicionalmente se usan con un fin cualitativo, es decir, una respuesta binaria de “presencia” o “ausencia” del analito de interés. Esto es suficiente en muchos casos, como el test de embarazo o el diagnóstico de SARS-CoV (siempre que el sistema sea suficientemente sensible). Pero para otros muchos casos, existe un gran interés por el desarrollo de sensores o estrategias que permitan dotar a esta técnica de una capacidad cuantitativa. Por ejemplo, muchos biomarcadores cancerígenos tienen niveles normales y valores patológicos que dependen de otros factores como la edad; en consecuencia, en estos casos, es importante precisar la concentración presente en la muestra del paciente. Entre estos ejemplos cabe destacar el antígeno específico de próstata (PSA), proteína producida por las células de la próstata cuyo control ayuda a detectar y monitorizar el cáncer de próstata en los hombres.

La motivación de esta tesis doctoral es el desarrollo de un biosensor para POCT, que combine la sencillez de uso de los inmunoensayos de flujo lateral con la capacidad de cuantificación necesaria en problemas clínicos o alimentarios. En esta tesis, se han elegido como analitos de interés dos ejemplos paradigmáticos de ambos campos: las vesículas extracelulares y la histamina. Las primeras destacan como biomarcadores emergentes por su gran potencial para la identificación de tumores, especialmente en casos en los que no existen suficientes métodos de diagnóstico o monitorización, como el cáncer colorrectal. La histamina es una amina biógena que se produce de forma natural en procesos de fermentación en bebidas y alimentos, y es causante de una gran parte de las intolerancias alimentarias de la población actual.

Para obtener una evaluación cuantitativa de las tiras, se ha utilizado un sensor inductivo desarrollado ad hoc en nuestro grupo de investigación. Para alcanzar una respuesta cuantitativa con el empleo de este sensor, es necesario usar nanopartículas superparamagnéticas como marca de detección en las tiras de flujo lateral, en lugar de las tradicionales nanopartículas de oro.

En trabajos previos, se adaptó con éxito este sensor a un ensayo inmunocromatográfico para la detección del PSA. En esta tesis doctoral hemos usado un prototipo mejorado de este sensor para la cuantificación de las tiras. Con el acoplamiento de las tiras de flujo lateral a este sensor perseguimos desarrollar un biosensor basado en un pequeño dispositivo POCT de respuesta rápida y fácil uso para su aplicación en el diagnóstico y control y calidad en la industria alimentaria.

## **A.1.2 Estado del arte y antecedentes**

En la actualidad existen algunas técnicas de detección, tanto para vesículas extracelulares, como para histamina. En las líneas siguientes, se describen las moléculas objetivo de los inmunoensayos desarrollados, las vesículas extracelulares y la histamina. Además, se expone el estado del arte referente a las técnicas de detección establecidas exponiendo sus ventajas e inconvenientes para el bioanálisis POCT.

### **A.1.2.1 Vesículas extracelulares y exosomas**

Las vesículas extracelulares (EVs por sus siglas en inglés) son estructuras secretadas por las células que contienen información característica las mismas. En consecuencia, detectar las vesículas extracelulares permite de forma indirecta determinar la existencia de las células origen. En la actualidad, están catalogadas como biomarcadores emergentes de cáncer gracias a la información que proporciona su contenido. Las EVs pueden clasificarse según su tamaño en exosomas (30-100 nm), microvesículas (100-1000 nm) y cuerpos apoptóticos (1-5  $\mu\text{m}$ ). Todas ellas tienen la capacidad de transportar carga biológicamente activa como proteínas o ácidos nucleicos [16].

La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares recomienda clasificar las vesículas extracelulares atendiendo a su tamaño (u otras características físicas), en el caso de no poder demostrar marcadores específicos de origen subcelular que indiquen realmente su origen para garantizar que son exosomas [17]. De este modo pueden clasificarse en vesículas extracelulares pequeñas (sEVs < 200 nm) o medianas (mEVs > 200 nm).

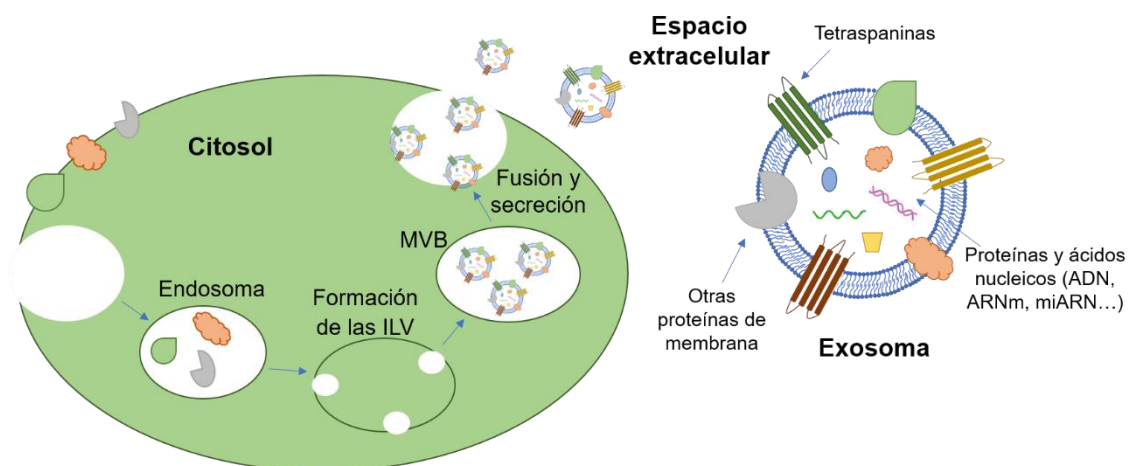
Los exosomas, debido a su pequeño tamaño, pueden evadir el sistema fagocítico, y, de esta forma, adquieren un papel importante en las comunicaciones intercelulares. Son vesículas extracelulares endocitóticas y heterogéneas con forma de copa (vistas al microscopio electrónico de transmisión) [18]. Una de las principales características de los exosomas es su capacidad para transportar contenido de una forma específica

desde una célula de origen hasta células diana [19]. También se ha demostrado que desempeñan otras funciones a nivel biológico, como por ejemplo la regulación inmune [20], las comunicaciones intercelulares [21], la coagulación [22], la regulación microambiental tisular [23], y, como se verá posteriormente de una forma más extensa, también forman parte en el desarrollo del cáncer, la metástasis y la resistencia de medicamentos [24].

### A.1.2.1.1 Biogénesis de los exosomas

La formación de los exosomas se produce dentro del comportamiento endosomal de la célula que es un sistema de vesículas formado por la invaginación de la membrana plasmática [25]. En primer lugar, se forman las vesículas intraluminales (ILV) mediante invaginación de la membrana endosomal, y es en este momento donde se seleccionan determinadas proteínas y ácidos nucleicos para su introducción en el interior de las vesículas. La formación de las ILV dará lugar a la construcción de los cuerpos multivesiculares (MVB), que serán los que posteriormente se fusionarán con la membrana celular para la secreción de los exosomas al medio extracelular. El esquema de los mecanismos de biogénesis se representa en la Figura 1.

El contenido de los MVB puede ser variado y contener proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Los exosomas puede obtenerse a partir de sobrenadantes de cultivos celulares o en fluidos corporales como plasma, suero, saliva, orina o leche materna [26,27].



**Figura 1.** Mecanismo de biogénesis y secreción de exosomas. Esquema simplificado de la estructura y composición de un exosoma.

### A.1.2.1.2 Composición de los exosomas

Los exosomas contienen diferentes moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que tienen diferentes funciones en el cáncer. De hecho, el tumor podría

iniciarse a través de una transferencia intercelular de proteínas transportadas por exosomas [28]. Se ha demostrado, a través de estudios proteómicos, que un conjunto de proteínas proviene del citosol y de la membrana plasmática dejando una “huella” de la célula de origen de los exosomas [29]. Algunas de las proteínas que contienen los exosomas son específicas de la célula de origen, sin embargo, otras son comunes para todos los exosomas. El gran contenido de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que se encuentra en los exosomas da explicación a la complejidad de su estructura y a la gran diversidad funcional de estos. Es necesario destacar, que los exosomas están altamente enriquecidos en proteínas con diversas funciones [30]. A continuación, se muestran algunas de ellas.

- ❖ Tetraspaninas: participan en la penetración celular, la invasión y la fusión. Las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 se describen como proteínas encontradas con mayor frecuencia en los exosomas y se consideran generalmente como marcadores clásicos de exosomas.
- ❖ Proteínas de choque térmico (HSP70 Y HSP90): están involucradas en la unión al antígeno.
- ❖ Proteínas involucradas en la formación de MVB: involucradas en la liberación de los exosomas.
- ❖ Proteínas responsables del transporte y la fusión (anexinas y Rab).

Los exosomas también contiene ácidos nucleicos y reflejan el estado mutacional de las células de origen. Los ácidos nucleicos en los exosomas incluyen ADN de doble cadena (dsADN), ARN mensajero (ARNm) y micro ARN (miARN) [31,32]. Además, también se ha encontrado ARN de transferencia (tARN), ARN no codificado (lncARN) Y ARN virales [33]. Es de gran interés destacar que se ha demostrado que el miARN tiene un papel fundamental como marcador en el diagnóstico y estudio de la progresión de diferentes tipos de cáncer [34,35]. En cuanto a la composición lipídica de los exosomas varía según las características de la célula de origen y puede contener colesterol, esfingomielina, hexosilceramidas, fosfatidilserina y ácidos grasos saturados [36]. Además, también se ha encontrado que el ácido lisobisfosfatídico es un lípido que se encuentra en la membrana interna de las MVB y tiene un papel importante en la biogénesis de los exosomas [37]. Tanto los efectos biológicos y farmacológicos de la composición lipídica de los exosomas, como su papel en la progresión del tumor, permanecen aún lejos de ser bien entendidos.

### ***A.1.2.1.3 Los exosomas como biomarcadores de cáncer***

Los exosomas tienen una relación esencial con el cáncer pues juegan un papel importante, tanto en la iniciación tumoral como en el crecimiento [18]. A través de mecanismos como la inmunosupresión mediante la inhibición de la proliferación de las células inmunes, la inducción de la apoptosis de células T CD8<sup>+</sup> y/o la supresión de la actividad de las células asesinas naturales, los exosomas son capaces de favorecer la progresión del cáncer [38,39]. Existen estudios que demuestran que los pacientes con diagnóstico de cáncer presentan una mayor cantidad de exosomas en comparación con individuos sanos [24]. También se ha demostrado que el contenido de los exosomas se asemeja al contenido de una célula madre [40,41]. Por lo tanto, los exosomas son una fuente de información para la detección de cáncer, la evaluación de la progresión tumoral y la metástasis, y actualmente se consideran como un biomarcador de cáncer con gran potencial [42]. En la literatura existen varios estudios basados en el uso de exosomas para diagnóstico de cáncer de páncreas [43], próstata [44], mama [45] y ovarios [46], glioblastoma [47] y melanoma [48], entre otros.

### ***A.1.2.1.4 Técnicas de purificación y caracterización de exosomas***

Las técnicas de purificación y caracterización de exosomas es uno de los cuellos de botella y gran reto al que se tiene que enfrentar la comunidad científica para su uso como biomarcadores de cáncer.

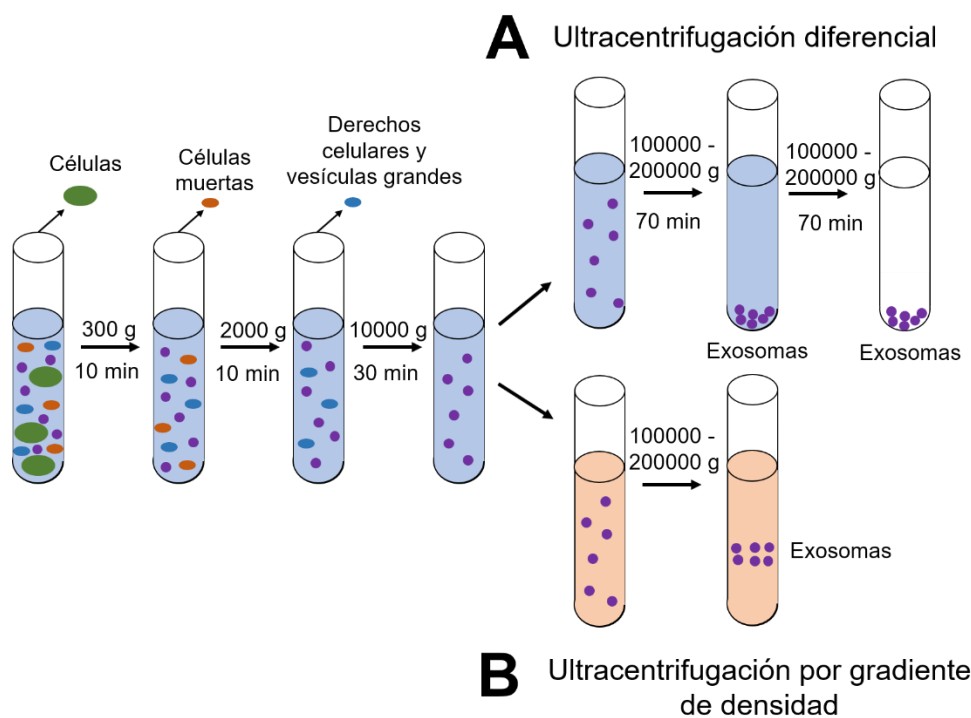
#### **A.1.2.1.4.1 Aislamiento/purificación de exosomas**

Para la correcta aplicación de estas nanopartículas como biomarcadores es estrictamente necesaria su purificación y aislamiento de un amplio espectro de restos celulares y otros componentes interferentes, presentes en los fluidos en los que se encuentran los exosomas, para, de este modo, evitar su interferencia en la detección. Las técnicas empleadas para su aislamiento deben ser capaces de separar los exosomas de las marices complejas de las muestras reales, como pueden ser suero, plasma y orina, exhibiendo una alta eficacia y especificidad. Tras el aislamiento de los exosomas, es necesario examinar su calidad, para lo cual se usan técnicas que miden su tamaño, distribución de tamaños, morfología, concentración y composición bioquímica. En la actualidad, gracias a los rápidos avances en ciencia y tecnología, existen un gran número de técnicas que permiten el aislamiento de los exosomas proporcionando cantidades apreciables y puras asequibles. Cada una de las técnicas se basa en un rasgo particular de los exosomas para llevar a cabo el aislamiento, como

su densidad, forma, tamaño o proteínas disponibles en la superficie de estos. A continuación, se muestran las principales técnicas empleadas para el aislamiento de exosomas.

**a. Ultracentrifugación**

La técnica de ultracentrifugación es la más utilizada por los investigadores para el aislamiento de exosomas en biofluidos. Esta técnica, a su vez, puede dividirse en dos grupos principales, según el mecanismo de separación: ultracentrifugación diferencial o ultracentrifugación por gradiente de densidad. En la **ultracentrifugación diferencial**, las diferentes partículas se separan mediante el uso de una serie de fuerzas centrífugas diferenciales que son aplicadas varias veces, como se muestra de forma esquemática en la Figura 2A [49]. De esta forma, las partículas grandes se separan en primer lugar. Las células, los desechos celulares y las grandes vesículas extracelulares son las primeras en ser separadas con fuerzas centrífugas más bajas (10000g). A continuación, los exosomas se recogen con fuerzas centrífugas más intensas (100000-200000g), y además requieren más tiempo (más de 70 minutos). Los exosomas que sedimentan en esta segunda etapa tienen que ser lavados con una disolución tampón de fosfatos para eliminar las proteínas restantes. Finalmente, los exosomas purificados son resuspendidos en una disolución adecuada y almacenados a - 80°C.



**Figura 2.** Esquema del proceso de ultracentrifugación. **(A)** Ultracentrifugación diferencial a través del uso de una serie de fuerzas centrífugas diferenciales que son aplicadas varias



veces. (B) Ultracentrifugación por gradiente de densidad a través del uso de una disolución de sacarosa.

En la **ultracentrifugación por gradiente de densidad**, el mecanismo se basa en la densidad de las partículas en una disolución de sacarosa en un tubo de centrifuga donde tiene lugar una disminución gradual de la densidad a medida que se asciende en el tubo [50]. La primera etapa del proceso es similar a la ultracentrifugación, y es donde se eliminan los componentes de mayor tamaño (Figura 2). Tras este proceso, las vesículas extracelulares permanecen en diferentes capas de gradientes, y aprovechando esta separación de gradientes es cuando se extraen los exosomas (Figura 2B). El efecto amortiguador de la disolución de sacarosa utilizada en el segundo tipo de ultracentrifugación, puede llegar a reducir los efectos destructivos de la fuerza centrífuga permitiendo obtener una mejor estructura biológica y propiedades de los exosomas. A pesar de que la ultracentrifugación es la técnica de aislamiento más utilizada, también presenta ciertas desventajas como es la necesidad de adquirir equipos sofisticados de gran coste, tiempos de ejecución muy largos y volúmenes de muestra de grandes. Además, las fuerzas tan altas que se emplean en esta técnica pueden destruir la estructura de los exosomas dificultando los análisis posteriores [51].

### **b. Técnicas basadas en tamaños**

El diámetro de los exosomas es menor que el de las microvesículas y cuerpos apoptóticos, por lo tanto, los exosomas también pueden ser aislados mediante técnicas basadas en el tamaño. Estas técnicas requieren menos tiempo que la ultracentrifugación, y no es necesario el uso de equipamientos especializados. Los métodos más usuales englobados dentro de las técnicas basadas en tamaños son: filtración secuencial, cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) y microfluídica dependiente del tamaño. Los mecanismos de filtración secuencial son similares a los utilizados en técnicas de filtración tradicionales, en donde el aislamiento de las partículas depende principalmente de su peso molecular y tamaño [52]. Los exosomas se pueden separar usando filtros de membrana con límites de exclusión de diferente tamaño o peso molecular. Generalmente, en primer lugar, se usa un filtro de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  para realizar una prefiltración en la que se elimina las células, los derechos celulares y las vesículas extracelulares grandes. A continuación, las proteínas libres se filtran con un filtro de 500 kDa. Y, por último, para obtener los exosomas aislados se emplea un filtro de membrana de 100 nm. En este caso, debido a las fuerzas de manipulación débiles que se dan, los exosomas obtenidos por este método tienen una pureza relativamente alta. Otra técnica de separación basada en tamaños, utilizada para el aislamiento de exosomas, es la (SEC), la cual se basa en la separación de las partículas

por la filtración a través de una fase estacionaria porosa [53]. La fase estacionaria suele estar compuestas de perlas de gel esféricas, de forma que tiene muchos poros de un tamaño en particular. Por lo tanto, la SEC puede utilizarse para clasificar las partículas por tamaños, de forma que cuando la muestra pasa a través de la fase estacionaria, las partículas pequeñas pueden quedarse retenidas por los poros, mientras que las grandes eluyen. Como resultado, las partículas grandes salen de la columna antes que las pequeñas. Este método, actualmente, es empleado para aislar exosomas de fluidos corporales.

Recientemente, también, se está desarrollando el uso de dispositivos microfluídicos que permite la separación de exosomas a través de los canales que componen el instrumento [54]. Este tipo de sistemas muestran un gran potencial para el aislamiento y análisis selectivo de exosomas pues requieren volúmenes de muestra pequeños y periodos de tiempo cortos [55,56]. Además, debido a su simplicidad, estas técnicas se pueden aplicar como tecnología POCT.

### **c. Precipitación**

En la actualidad, existen numerosos kits comerciales que incluyen reactivos de precipitación para el aislamiento de vesículas extracelulares. Los reactivos se encargan de disminuir la solubilidad de las vesículas extracelulares para provocar la precipitación de estas. Generalmente, la muestra (sobrenadante de cultivo u otros fluidos) deben procesarse para eliminar células y restos celulares, y luego se incuban con una disolución de polietilenglicol (PEG) u otros polímeros durante un tiempo [57]. Tras este tiempo de incubación, se lleva a cabo una centrifugación que permite precipitar las vesículas extracelulares a la parte inferior del tubo. Gracias al previo empleo de estos kits las vesículas extracelulares pueden separarse y concentrarse con una fuerza centrífuga mucho menos intensa comparando con la ultracentrifugación [58]. Muchos investigadores han empleado este método para aislar exosomas para posteriormente ser utilizados como biomarcadores de cáncer, pues es un método relativamente rápido y no requiere tiempos de centrifugación prolongados, lo que los convierte en una técnica atractiva para el aislamiento de exosomas [59]. Sin embargo, estos kits son demasiado costosos para procesar una gran cantidad de muestras biológicas; y además la pureza alcanzada no es muy elevada puesto que la solubilidad de casi todas las partículas disminuye de forma similar con el uso de estos reactivos, lo que lleva a la coprecipitación de proteínas y vesículas extracelulares de forma simultánea [60]. Con el uso de estos kits, también, es necesario tener en cuenta la contaminación con productos químicos, lo cual puede restringir su posterior aplicación [61]. Algunos ejemplos de estos kits son:

Invitrogen Total Exosome Isolation Kit™ (Life Technologies, USA), ExoSpin™ Exosome Purification Kit (Cell Guidance Systems, USA), ExoQuick™ exosome precipitation solution (BioCat, Germany) and ExoEasy Maxi Kit™ (Qiagen, Germany). Se ha demostrado que el kit ExoQuick tiene una recuperación más alta que la ultracentrifugación [62].

### **d. Inmunofinidad**

Muchos tipos de proteínas, como integrinas o tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81) están presentes en la membrana de los exosomas, y ofrecen la oportunidad de desarrollar técnicas basadas en la captura por inmunofinidad para el aislamiento de exosomas, a través de la modificación de bolas magnéticas o superficies de microcanales con anticuerpos específicos que reconocen las proteínas de membrana de los exosomas. Las bolas magnéticas recubiertas con anticuerpos es un método simple, rápido y prometedor que permite aislar exosomas de medios de cultivo celular o de fluidos corporales. Además, las bolas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos específicos se pueden emplear, también, para enriquecer y preconcentrar exosomas específicos de biofluidos complejos, pues con el uso de imanes pueden separarse fácilmente [63]. La recuperación y pureza de los exosomas, obtenidas mediante esta técnica, son mejores en comparación con la ultracentrifugación [64]. La inmunoseparación de exosomas a través de bolas magnéticas, para su posterior análisis como biomarcador de cáncer, se ha empleado con frecuencia en la literatura [34,35,65].

#### **A.1.2.1.4.2 Caracterización de exosomas**

Como ya se mencionó previamente, después de aislar los exosomas, es necesario analizar sus características (tamaño, morfología, concentración y composición bioquímica), para finalmente, realizar la etapa de detección. La validación de las características físicas de los exosomas y el contenido molecular de los mismos es un requisito indispensable para su posterior uso en aplicaciones de diagnóstico de enfermedades. Actualmente, existen múltiples técnicas de caracterización, como se verá posteriormente en este apartado, y es de gran importancia seleccionar el método óptimo en cada caso. Una de las limitaciones con las que se tiene que enfrentar la comunidad científica a la hora de trabajar con exosomas, es la falta de consenso de las técnicas de caracterización que se tienen que usar, es decir, no existen técnicas estándar para la caracterización de exosomas. Por este motivo, es necesario tener en cuenta la aplicación final de los exosomas, para seleccionar las técnicas de análisis idóneas en cada caso.

La evaluación de las propiedades físicoquímicas de los exosomas, como el tamaño, la forma, la carga superficial, la densidad y la porosidad, son necesarias para determinar sus interacciones biológicas, y, por lo tanto, la precisión en la determinación de estas características es de vital importancia. Los métodos de caracterización de exosomas se pueden clasificar en tres categorías principales: métodos biofísicos, métodos moleculares y métodos basados en microfluídica. A continuación, se van a explicar brevemente las técnicas de caracterización más relevantes utilizadas para el análisis de exosomas según la clasificación mencionada previamente.

### **i. Métodos biofísicos**

Este tipo de métodos son utilizados para el estudio del tamaño y distribución de tamaños de exosomas en una muestra. Sin embargo, no proporcionan información relativa a la composición molecular de los exosomas.

#### ***Análisis de seguimiento de partículas (NTA)***

Esta técnica permite medir la concentración y la distribución del tamaño de los exosomas en el rango de 10 nm a 2  $\mu$ m. NTA mide el movimiento browniano de las partículas en suspensión líquida a través del rastreamiento de análisis de imágenes. Este movimiento puede correlacionarse con el tamaño de partícula a través de la velocidad de las partículas [66,67]. Los resultados obtenidos de este análisis son el tamaño, la distribución de tamaño, la concentración y el fenotipo de las partículas. Una de las ventajas de esta técnica es su capacidad para detectar diferentes vesículas extracelulares, incluidos los exosomas, y además permite medir partículas con diámetros de hasta 30 nm. Sin embargo, uno de los problemas fundamentales, es la falta de capacidad para distinguir entre exosomas y agregados proteicos [68]. La preparación de la muestra es rápida, y los resultados se obtienen en minutos. Es una técnica no destructiva, de forma que se puede recuperar el volumen de muestra empleado para las medidas. Los parámetros cruciales para el éxito de esta técnica son la preparación de la muestra y el uso de un factor de dilución correcto. La cuantificación y la visualización de los exosomas en tiempo real, hace que NTA sea una técnica emergente para el análisis de exosomas.

#### ***Dispersión de luz dinámica (DLS)***

DLS es una técnica alternativa para determinar el tamaño de los exosomas. El principio de la técnica ya ha sido explicado previamente en el apartado “técnicas de caracterización”. Cabe resaltar, que la dispersión de luz dinámica tiene la capacidad para medir partículas que varían en tamaño desde 1 nm hasta 6  $\mu$ m. Los análisis

obtenidos son más fiables cuando la suspensión analiza es monodispersa. Además, cuando la suspensión contiene vesículas grandes, aunque sea en una concentración baja, la detección de las vesículas más pequeñas se ve dificultada [69,70]. Por ejemplo, la efectividad de la técnica ha sido demostrada para evaluar la distribución y el tamaño de vesículas extracelulares en los glóbulos rojos [71] y derivados del cáncer de ovarios celulares [72].

### ***Detección de pulso resistivo***

La detección por pulso resistivo es una técnica de caracterización emergente de tamaño de exosomas basada en el principio de Coulter [73]. Esta técnica cuenta con un nanoporo que contiene un líquido conductor que se desplaza y se mueve cuando pasa una nanopartícula esférica (por ejemplo, exosomas) por el nanoporo. El cambio en la resistencia eléctrica se calcula, de forma que aumenta proporcionalmente según el tamaño de partícula, y se registra cada vez que pasa una partícula a través del poro. Por lo tanto, esta técnica tiene la capacidad de medir el tamaño de partícula individual y la distribución de las partículas presentes en la muestra [74]. El rango de tamaño que se puede detectar viene limitado por el tamaño del poro en el límite superior, y el límite inferior viene delimitado por el menor cambio de resistencia detectable, que es aproximadamente el 20% del diámetro del poro. Por ejemplo, un poro con un diámetro de 400 nm es capaz de detectar vesículas que van desde los 80 nm hasta los 400 nm de diámetro. La principal limitación de esta técnica es la obstrucción del nanoporo al pasar partículas más grandes que el diámetro del nanoporo [75]. Por lo tanto, esta técnica no es la más adecuada para la caracterización de muestras altamente heterogéneas. Existe una variante, denominada *detección de pulso resistivo sintonizable* en la cual el tamaño del poro se puede estirar elásticamente al tamaño de la partícula para mejorar la sensibilidad [76].

### ***Microscopio de fuerza atómica (AFM)***

El microscopio de fuerza atómica es una herramienta que permite el análisis individual de exosomas superando algunas de las limitaciones de los métodos de caracterización más convencionales. El AFM proporciona imágenes en 3D de los exosomas individuales, sin la necesidad de ninguna tinción previa, fijación o el uso de temperaturas extremas. En esta técnica se detecta y registra las interacciones entre una punta de sondeo y la superficie de la muestra, generando de esta forma la imagen 3D. La resolución obtenida es a escala subnanométrica, lo que permite el estudio de las propiedades estructurales y biomecánicas de los exosomas, Por lo tanto, de esta forma, se puede cuantificar y sondear simultáneamente la abundancia, la estructura, la

biomecánica y el contenido molecular de los exosomas individuales, y también se pueden estudiar otras vesículas extracelulares dentro de poblaciones heterogéneas, como pueden ser muestra tumorales [77]. Los exosomas deben inmovilizarse de manera estable en el sustrato antes del análisis, lo que puede influir en la forma y el tamaño de las vesículas [68]. Aunque las imágenes requieren tiempo para su obtención, la preparación de la muestra es simple y rápida.

### ***Microscopio electrónico de transmisión (TEM)***

El TEM es una de las técnicas más utilizadas para la caracterización cualitativa (estructura, morfología y tamaño) de los exosomas. El principio del funcionamiento de esta técnica ha sido explicado previamente en el apartado de “técnicas de caracterización”. Los análisis en el TEM se realizan en vacío, lo que implica la fijación la muestra a través de glutaraldehído y deshidratación de la muestra previamente a su análisis, lo que puede provocar una reducción en su tamaño y cambio en la morfología. La muestra requiere de pretratamientos de tinción, como por ejemplo acetato de uranilo, para que se puede reconocer las vesículas rodeadas de su membrana, a través del TEM. Y, además, el contraste puede ser mejorado mediante la inclusión de metilcelulosa. El tamaño de los exosomas analizados en el TEM se encuentra en un rango 20-100 nm, y su forma es como una copa cuando se visualizan con esta técnica [78,79]. Un parámetro importante a tener en cuenta en los análisis de TEM, es la preparación de la muestra pues involucra múltiples pasos y puede inducir cambios en la morfología. También el haz de electrones utilizado en este microscopio puede dañar las muestras biológicas.

Como alternativa se ha desarrollado otra técnica, denominada criomicroscopía electrónica, que también permite el análisis de vesículas extracelulares y exosomas. En este caso, gracias al uso de un protocolo de preparación de muestra diferente al utilizado en el TEM se evita el daño del haz de electrones. En este caso la muestra se analiza bajo nitrógeno líquido, y en estas condiciones, no existen efectos de deshidratación y fijación pues las células se encuentran intactas sin cambios estructurales o redistribución de los elementos. La criomicroscopía electrónica es considerado el mejor método para analizar nanopartículas y proteínas sin artefactos de deshidratación, y ha sido empleada para el análisis de vesículas extracelulares observándose en este caso una estructura redonda [80].

### ***Field flow fractionation***

El fraccionamiento de flujo de campo (FFF) es una técnica muy utilizada para la separación y caracterización de biomoléculas (como, por ejemplo, los exosomas)

frecuentemente empleadas en análisis bioquímicos. La separación molecular en FFF se logra mediante la alineación espacial de las partículas a lo largo de un canal. Mientras las partículas fluyen por este canal, se aplica un campo en dirección perpendicular, lo que genera un perfil de flujo de la muestra parabólico. De forma que, en este flujo, las partículas más grandes permanecen cerca de la pared del canal y se mueven más lentamente, mientras que las partículas más pequeñas tienden a ocupar la parte central del canal y a moverse más rápidamente [81]. Esta técnica se ha utilizado para la separación y caracterización de exomas [82].

### **ii. Métodos moleculares**

Los métodos moleculares permiten la identificación de marcadores, como, por ejemplo, receptores de superficie o proteínas de membrana presentes en el exosoma. La caracterización de las especies de exomas a nivel molecular es un punto clave para sus posteriores aplicaciones.

#### ***Citometría de flujo***

La citometría de flujo es una técnica molecular que se utiliza para caracterizar las proteínas de la superficie exosómica, además también permite medir el tamaño y la estructura de los exomas [83]. Una de las ventajas más destacables de esta técnica, es su adaptación al análisis reproducible de muestras clínicas, permitiendo, de este modo, el análisis de diferentes características físicas y químicas de células y partículas en suspensión. Los citómetros de flujo convencionales pueden detectar partículas mayores de 300 nm, pero no pueden detectar partículas más pequeñas, por lo tanto, estos instrumentos no permiten la detección directa de exomas. El principio de funcionamiento consiste en que un rayo láser con una longitud de onda específica se dirige a través de una corriente de fluido que contiene partículas en suspensión. El grado de dispersión de la luz depende de la presencia de partículas en la muestra, y de esta forma se pueden obtener parámetros como el tamaño (dispersión directa) y la granularidad (por dispersión lateral) de las partículas en suspensión. Debido a las limitaciones en la detección de tamaño pequeños, un gran número de partículas no pueden ser detectadas por citómetros convencionales. Por este motivo, se ha desarrollado una nueva generación de citómetros más sensibles que se basa en, previamente al análisis por citometría: (a) marcar los exomas con nanopartículas o (b) usar anticuerpos conjugados con fluoróforos, permitiendo, de esta forma, mejorar la resolución de la técnica [84]. Por lo tanto, esta técnica permite el análisis rápido de vesículas extracelulares de al menos 300 nm, permitiendo su cuantificación y/o clasificación de acuerdo con el nivel de expresión de las proteínas de membrana.

### Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman utiliza una luz láser monocromática como fuente de iluminación de la muestra. A través de la dispersión de la luz, debida a los cambios de longitud de onda provocados por las vibraciones moleculares en la muestra, se genera un espectro característico de una molécula, que por ejemplo pueden ser ácidos nucleicos o proteínas. Debido a la disponibilidad de patrones de espectros de biomoléculas es posible descifrar información molecular que está encapsulada dentro de los exosomas. Por lo tanto, la espectroscopía Raman ofrece una determinación de la composición química de los exosomas o vesículas extracelulares, sin la necesidad de emplear etiquetas. Además, es una técnica altamente eficiente pues es capaz de proporcionar la composición química de, incluso, un solo exosoma de forma rápida [85]. A pesar de las ventajas que muestra esta técnica para el análisis de exosomas, también presenta una serie de limitaciones, como por ejemplo la baja intensidad de la señal, la naturaleza laboriosa de la técnica y la falta de especificidad de la superficie.

### Western blot (WB)

La técnica WB permite determinar la presencia de proteínas exosómicas, como pueden ser marcadores de superficie (por ejemplo, las tetraspaninas), proteínas del citosol o del citoesqueleto. Esta técnica implica varios pasos, en primer lugar, las vesículas extracelulares son lisadas, para, que, posteriormente, las proteínas sean separadas por electroforesis en gel. A continuación, las proteínas separadas se transfieren del gel a la superficie de una membrana. La membrana se expone a un anticuerpo específico contra la proteína que se quiere analizar, de forma que la unión anticuerpo-proteína se detecta usando un marcador radiactivo o químico. El WB es una técnica muy útil para identificar proteínas, las cuales pueden ser biomarcadores específicos, en muestras exosómicas purificadas [86].

### Ensayo Bradford

El contenido total de proteínas de los exosomas purificados se puede determinar mediante el ensayo Bradford, pudiendo estimar la cantidad de vesículas extracelulares secretadas por las células [87]. Esta técnica no puede ser aplicada para muestra que contienen otros contaminantes proteicos, y además se necesitan pasos adicionales de purificación para eliminar los contaminantes. Sin embargo, es una buena herramienta para diferenciar entre los contenidos proteicos totales de vesículas extracelulares derivados de pacientes con cáncer y aquellos derivados de donantes normales.

### **iii. Métodos basados en microfluídica**



Las plataformas microfluídicas se utilizan principalmente para el aislamiento de exosomas en suspensión, sin embargo, debido a su naturaleza multifuncional pueden ser utilizadas como método de aislamiento y caracterización, e incluso detección [88]. Generalmente, el proceso de aislamiento utilizando sistemas microfluídicos, implica la funcionalización/inmovilización de los canales con un anticuerpo que reconoce específicamente proteínas de membrana de la superficie del exosoma, para que finalmente, los exomas unidos específicamente eluyan [89]. Kanwar *et al.* [90] ha diseñado un chip, denominado ExoChip, que permite el aislamiento, la caracterización y la cuantificación de exosomas a través de la integración de anticuerpos específicos, marcas de detección fluorescentes y un lector de placa convencional. Este tipo de dispositivos simplifica significativamente el análisis de exosomas desde su purificación hasta su caracterización, pero su desarrollo es una labor complicada que implica un gran esfuerzo.

### ***A.1.2.1.5 Detección de exosomas***

Recientemente, la investigación en el campo de los exosomas ha recibido gran atención debido a que son una herramienta potencial como biomarcador específico de cáncer en metodologías no invasivas para el diagnóstico precoz y la evaluación del cáncer. Aun así, existe una carencia significativa de métodos cuantitativos y efectivos para la detección de exosomas. En esta dirección, el desarrollo de biosensor como herramienta de detección y cuantificación ha atraído gran atención por parte de la comunidad científica debido a las características que ofrecen: fácil uso, respuesta rápida, alta sensibilidad, buena especificidad y capacidad de multidetección. Además, estos biosensores pueden ser clasificados como herramientas POCT, permitiendo su uso en regiones de recursos limitados que previamente no tenían acceso a herramientas de diagnóstico más avanzadas. También su uso puede aumentar significativamente en los entornos clínicos, por un lado, facilitando su acceso debido a sus características, y, por otro lado, mejorando la terapia contra el cáncer gracias al monitoreo que puede ofrecer su uso sencillo.

Los exosomas contienen una gran variedad de moléculas en su membrana, las cuales pueden ser usadas como blanco o *target* para los elementos de reconocimiento empleados en el desarrollo del sensor. Estas moléculas pueden ser comunes a todos los exosomas, y, por lo tanto, se usan para la determinación del número total, como algunas tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81) y lípidos (colesterol, fosfatidilserina y ceramida). Otras moléculas superficiales son antígenos asociados específicamente al cáncer, pudiéndose utilizar para el diagnóstico, pronóstico y monitorización de terapias.

Algunos de estos antígenos de membrana: CEA, EpCAM, HER2, IGFR, LMP1, MUC18 y PSMA [91].

La elección del elemento de bio-reconocimiento depende de la afinidad y la eficiencia de unión con su *target*. Actualmente, los anticuerpos son los más utilizados para el desarrollo de biosensores de exosomas [92–96]. Sin embargo, en los últimos años, los aptámeros están siendo empleados como alternativa, gracias a su rentabilidad, estabilidad y resistencia [97–101]. Los péptidos también se están siendo empleados como elementos de reconocimiento, aunque solo en algunos casos puntuales[102].

Los biosensores desarrollados para exosomas hallados en la literatura pueden clasificarse atendiendo a su principio de detección: colorimétricos, fluorescentes, de resonancia de plasmón superficial, SERS y electroquímicos. En la Tabla 1 se resumen las ventajas y limitaciones, y se indican ejemplos en cada caso.

**Tabla 1.** Diferentes tipos de biosensores, clasificados atendiendo al tipo de detección, empleados para la detección de exosomas.

<b>Tipo</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>	<b>Referencias</b>
<b>Colorimétricos</b>	Fácil uso. Respuesta rápida. Detección visual. Bajo coste.	Sensibilidad baja. Capacidad de cuantificación limitada.	[93,94,99–101,103–105]
<b>Fluorescentes</b>	Sensibilidad alta. Capacidad de detección múltiple en una misma línea. Capacidad de <i>quenching</i> de fluorescencia.	Necesidad de equipamiento sofisticado con longitudes de excitación y emisión requeridas. Dificultad para funcionalizar las marcas fluorescentes.	[95–98,106,107]
<b>Resonancia de plasmón superficial</b>	Sensibilidad alta. Detección en tiempo real. Sistema sin marcas.	Necesidad de equipos voluminosos. Interferencias. Sistema complejo.	[92,108–111]
<b>SERS</b>	Muy buena sensibilidad. Capacidad de detección múltiple. Aplicabilidad a muestras biológicas complejas.	Necesidad de equipos costosos. Dificultad en el análisis de datos. Dificultad en la síntesis de marcas adecuadas.	[112–115]
<b>Electroquímicos</b>	Sensibilidad alta. Respuesta rápida. Bajo coste. Capacidad de detección múltiple. Dispositivos fáciles de miniaturizar.	Desafío en la funcionalización de la superficie de los electrodos. Efectos de matriz. Problemas de reproducibilidad.	[116–123]

Dentro de los biosensores, se encuentran las tiras de flujo lateral como herramienta para la detección, e incluso cuantificación de exosomas. En la Tabla 1 se han referenciado tres ejemplos [103–105] publicados por nuestro grupo de investigación, los cuales presentan buenos límites de detección para la determinación de exosomas en muestras reales. En estos casos, indicados previamente, la marca utilizada ha sido oro coloidal. Dada la versatilidad de esta plataforma para el uso de diferentes marcas de detección, en esta tesis doctoral se ha investigado el uso de nanopartículas superparamagnéticas como alternativa al oro para aprovechar sus ventajas.

### ***A.1.2.1.6 Vesículas extracelulares y exosomas como biomarcadores de cáncer colorrectal***

En la actualidad, existe un aumento progresivo en la incidencia del cáncer colorrectal (CCR), tanto en España como a nivel mundial [124]. Excluyendo a los cánceres de piel, este tipo de cáncer se sitúa tercero en las listas de cáncer más frecuente y causa principal de fallecimiento, tanto para hombre como mujeres, en Estados Unidos. El CCR es el más frecuente diagnosticado en España, seguido del cáncer de próstata, pulmón y mama.

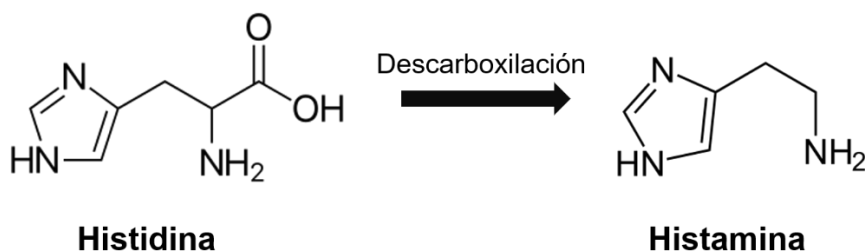
Actualmente, como métodos de detección se están empleando técnicas de cribado, en las que se incluye el análisis de sangre oculta en heces, y colonoscopias. Las técnicas de cribado permiten, por un lado, la detección y extirpación de adenomas y, por otro lado, el diagnóstico precoz de pacientes asintomáticos. Este tipo de programas de cribado facilitan la detección precoz del cáncer y la prevención de este; sin embargo, a pesar de tener un coste razonable y ser seguros, presentan baja especificidad. La colonoscopia es un método más específico, pero se trata de una prueba costosa e invasiva. Debido a las limitaciones de estas técnicas, así como del aumento progresivo en la incidencia en este tipo de cáncer, existe la necesidad de desarrollar dispositivos efectivos, seguros, de fácil uso, de coste asequible y, sobre todo, no invasivos que permitan la determinación de biomarcadores de la enfermedad, para que, de este modo se pueda conseguir un diagnóstico precoz. En el año 2014, la revista *Nature Communications* ha publicado que el antígeno CD147 presente en las vesículas circulantes en muestras de sangres de pacientes con cáncer colorectal pueden ser utilizadas para la detección de este tipo de cáncer.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta tesis se desarrolla un dispositivo de uso fácil y respuesta rápida para la cuantificación del biomarcador CD147 de CCR

en vesículas extracelulares. Este sistema se basa en la combinación de un inmunoensayo magnético de flujo lateral con un sensor inductivo, que, en conjunto, permiten desarrollar una técnica analítica rápida, sencilla y económica para el cribado de muestras de pacientes o seguimiento de terapias, sin la necesidad de ser invasiva.

### **A.1.2.2 Histamina**

Las aminas biógenas (AB) son bases orgánicas de bajo peso molecular con una estructura alifática (putrescina, cadaverina, espermina o espermidina), aromática (tiramina y feniletilamina) o heterocíclica (histamina y triptamina) que permite su clasificación en tres grandes grupos: aminas alifáticas, aromáticas o heterocíclicas. Se ha demostrado que todas ellas tienen actividad biológica, y que se forman y degradan como parte del metabolismo de los animales, plantas y microorganismos. En general, el nombre de la AB se designa a partir del aminoácido que le da origen. Por ejemplo, la histamina es la amina biógena que se forma a partir de la descarboxilación del aminoácido histidina, como se puede ver en la Figura 3. De forma similar, la tiramina se forma a partir de la tirosina, la triptamina a partir del triptófano y la feniletilamina a partir de la fenilalanina. Sin embargo, hay casos en los que no se sigue esta regla, como, por ejemplo, en la cadaverina (se forma a partir de la lisina) o la putrescina (se puede formar a partir de la arginina o la ornitina).



**Figura 3.** Reacción de descarboxilación de la histidina para la obtención de histamina.

Las ABs juegan papeles importantes en la actividad del cerebro humano, la regulación de la temperatura y el pH del estómago, la secreción de ácido gástrico, la respuesta inmune y el crecimiento y diferenciación de las células. Sin embargo, un exceso en la ingesta de AB puede provocar reacciones adversas, como náuseas, dolor de cabeza, erupciones cutáneas o cambios en la presión arterial. Además, estos síntomas toxicológicos son más probables y graves en personas hipersensibles.

Las ABs están presentes en muchos alimentos y bebidas, y sus concentraciones tienen grandes variaciones, incluso dentro del mismo tipo de alimentos [125]. A pesar

de que pueden existir como componentes endógenos de alimentos frescos como las frutas y verduras, también pueden acumularse como resultado de la actividad enzimática microbiana no controlada [126]. Entre los alimentos con altos niveles de AB se encuentran el pescado, la carne, el chocolate, los vegetales fermentados, los productos de soja y las bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza. La histamina, tiramina, putrescina y cadaverina son las AB más comunes en los alimentos y bebidas alcohólicas. Para que tenga lugar la síntesis y acumulación de AB se han de dar las siguientes condiciones: (i) presencia del aminoácido precursor, (ii) presencia de las bacterias apropiadas que puedan llevar la descarboxilación del aminoácido correspondiente para la formación de la AB y (iii) condiciones ambientales para la acción enzimática y el crecimiento bacteriano [127]. La combinación de estos factores determina la variedad y la concentración de AB. Por ejemplo, el pescado y ciertas variedades de quesos (los llamados quesos azules) contienen los niveles más altos de histamina (1000-2000 mg de histamina por kg de alimento), y están más frecuentemente relacionados con casos de envenenamiento por AB [128]. Por otro lado, la carne, y particularmente los quesos, tienen las concentraciones más altas de tiramina. Especialmente, los quesos elaborados con leche cruda que requieren procesos de maduración largos pueden alcanzar hasta niveles de tiramina superiores a 1000 mg de tiramina por kg de alimentos [129]. Mientras que en los productos fermentados las ABs son inherentes al proceso de fabricación, en los pescados indican descomposición.

La histamina es una de las ABs más comunes en alimentos, especialmente en bebidas alcohólicas como el vino, y especialmente algunos vinos tintos. Las intoxicaciones e intolerancias causadas por aminas biógenas implican frecuentemente a la histamina. Por ejemplo, se ha demostrado que una dosis oral única de 75 mg de histamina provocó diarrea aguda en el 50% de los sujetos sanos en un estudio del Floridsdorf Allergy Center (FAZ) en Vienna, Austria [130]. También cabe destacar, que hay una población de individuos con una susceptibilidad especial en los que una cantidad mucho más baja de histamina puede provocar efectos alérgicos [131]. Por estos motivos, para la industria alimentaria es un reto la producción de alimentos y bebidas alcohólicas con niveles bajos de histamina, o su control. La detección rápida de ABs sería muy interesante en la industria alimentaria, la hostelería, e incluso a nivel particular para los individuos sensibles. En el caso del pescado, existe legislación vigente para los niveles máximos de histamina, concretamente 50 y 100 mg de histamina por kg de pescado por Estado Unidos [132] y Comunidad Europea [133], respectivamente

En el caso concreto del vino, se ha encontrado que la producción de la histamina tiene lugar en diferentes puntos durante el proceso de fabricación del vino: en la fermentación alcohólica por levaduras [134], en la fermentación maloláctica por bacterias [135] y durante el proceso de envejecimiento [136]. Otros factores como, por ejemplo, el tiempo, las condiciones de almacenamiento (temperatura y pH), la calidad de la materia prima y la existencia de contaminantes durante el proceso llevado a cabo en la bodega, pueden contribuir al aumento de los niveles de histamina, así como de otras aminos biogénicas. También se conoce que los niveles de histamina en vinos tintos son mayores que en vinos rosados o blancos debido, principalmente, a ciertas diferencias en los procesos de vinificación [137]. A pesar de la presencia de histamina en los vinos, no existe legislación que regule los niveles de histamina, como ocurre con el pescado. Sin embargo, hay ciertos países que han establecido unos límites recomendables para la exportación e importación de vinos: Alemania (2 mg/L), Bélgica (5-6 mg/L), Francia (8 mg /L) y Suiza (10 mg / L) [138]. El objetivo de estos límites es, por una parte, garantizar la seguridad alimentaria de esta bebida, así como asegurar su calidad puesto que la presencia de histamina puede contribuir a cambios en el sabor del vino.

Para la detección y cuantificación de histamina existen diferentes técnicas entre las que destacan las técnicas cromatográficas, siendo la cromatografía líquida (CL) la más utilizada debido a sus características analíticas [139]. Además, en España es el método de análisis acreditado por el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social para la detección de histamina en pescado [140]. La CL de alta resolución, específicamente con separación en fase reversa usando columnas C18, es la técnica más popular para la determinación de histamina en vinos, así como de otras AB. Con el uso de esta técnica se han usado diferentes detectores: ultravioleta [141], de fluorescencia [142] o espectrometría de masas [142]. Generalmente, esta técnica requiere pretratamientos que incluyen extracción con disolventes y/o procesos de derivatización (pre-columnas o post-columnas) para que, por una parte, se eliminen los compuestos que pueden interferir en el análisis, y también para preconcentrar en analito. Los procesos de derivatización se realizan porque, generalmente, las ABs, entre las que se incluye la histamina, no tienen suficiente absorción en el rango de longitud de onda del visible-ultravioleta (VIS-UV) o no presentan fluorescencia. Y además con la derivatización se pueden reducir la polaridad de los compuestos, mejorando así la separación en las columnas del cromatógrafo. La CL de alta resolución permite la separación y detección de histamina con una buena resolución, sensibilidad y selectividad, pero el hecho de que se requieran pasos adicionales de pretratamiento

hace que la técnica sea laboriosa y exija tiempos análisis demasiado largos. La cromatografía de Gas (CG) es una técnica alternativa a la CL, pero es muy poco explorada en el ámbito de la detección de histamina o ABs ya que es necesario llevar a cabo un proceso de derivatización previo para aumentar las propiedades volátiles y disminuir las polaridades de las ABs. Los procesos de derivatización y extracción que se requieren hacen que la técnica sea mucho más compleja. Esta técnica puede llegar a ser más rápida que la CL, pero los límites de detección alcanzados son similares [143]. La electroforesis capilar (EC) es la segunda técnica de separación y análisis más utilizada para la determinación de aminos biógenos. Las principales ventajas que muestra esta técnica son la velocidad de análisis, la alta eficacia de separación, el bajo consumo de muestra y el uso de columnas de separación económicas. Sin embargo, la sensibilidad que se puede alcanzar con ella es inferior que la alcanzada por CL [144]. En los últimos años, se han desarrollado estrategias de derivatización, y también se han implementado algunos procedimientos en línea para preconcentrar la muestra con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la técnica [145]. Las técnicas cromatográficas descritas previamente (CL, CG y EC) son las técnicas más empleadas para el análisis de AB porque el hecho de que sean técnicas cromatográficas permite la previa separación de los compuestos, para la posterior determinación simultánea de forma específica, sensible y con una alta resolución. Los principales problemas de este tipo de análisis, es el tiempo que se requiere para obtener los resultados, así como la complejidad del cromatógrafo que implica ser manipulado por personal especializado.

Las técnicas no cromatográficas más usuales para la determinación de ABs son los sensores, ELISA y análisis de flujo por inyección. En la literatura se pueden encontrar sensores para la detección de una amina concreta [146–148] o una cantidad total de AB [149] en bebidas alcohólicas como vino o cerveza. El uso de sensores no requiere pretratamiento o procesos de derivatización, siendo el ajuste del pH de la muestra el único parámetro que se requiere ajustar, una vez desarrollado el sensor/biosensor. De forma excepcional se ha desarrollado un sensor enzimático para la determinación simultánea de histamina y putrescina [150]. Los elementos de reconocimiento utilizados en sensores y biosensores son muy variados, pero las enzimas son las más empleadas en aquellos que se encargan de la detección de AB. Basozabal *et al.* [151] utiliza nanopartículas impresas molecularmente como elemento de reconocimiento en un sensor para la detección específica de histamina. En cuanto a los sistemas de transducción, en este caso los sensores electroquímicos y ópticos [152] son los que prevalecen. Los sensores potenciométricos mostraron una mejor sensibilidad que los amperométricos en el caso de la transducción electroquímica [153]. Por otro lado, los

ensayos ELISA son una técnica con una alta precisión y sensibilidad, que además destacan por su potencial de estandarización. Esta técnica se ha utilizado para la determinación de histamina en pescado y vino [154], observándose que la técnica presenta ciertas limitaciones como son los altos tiempos de análisis y el alto coste que lleva asociado para un pequeño número de muestras [155]. Los límites de detección alcanzados son similares a los de CL [156]. Otra alternativa es el análisis por inyección en flujo que, tradicionalmente, consiste en la inyección de la muestra en una disolución portadora que se encuentra en flujo constante. Una vez que la muestra se mezcla con la disolución, pasa a través de un detector. Esta técnica se ha utilizado para la determinación de histamina en vinos tintos usando detección VIS-UV [157]. Los resultados de este método mostraron una buena correlación con los resultados obtenidos por CL, y el tiempo de análisis disminuyó notablemente.

Las técnicas no cromatográficas generalmente se utilizan para el análisis de una AB o un número muy limitado de ellas, al contrario de lo que ocurre con la cromatografía que permite el análisis simultánea de un gran número de ABs. En cambio, como ventaja permiten disminuir los tiempos de análisis significativamente, así como la dificultad del proceso. Aun así, cabe resaltar, que todas las técnicas descritas hasta ahora, tanto cromatográficas como no cromatográficas, son muy sofisticadas para implementar en una bodega donde se requieren análisis casi inmediatos para el control y calidad de los vinos durante el proceso de fabricación. Además, en estos lugares no se dispone de un gran espacio para implementar un laboratorio con instrumentación sofisticada, ni tampoco de personal cualificado para realizar los análisis. Por este motivo, las técnicas de POCT son una alternativa idónea para la determinación de ABs en bodegas pues permiten realizar el análisis en el punto de atención, y obtener los resultados de una forma rápida para la posterior toma de decisiones de forma casi inmediata. De la misma forma, en ocasiones las personas con especial sensibilidad a la histamina requieren el análisis del vino que desean tomar para analizar los contenidos de histamina que varían en gran medida según el vino. En este caso, las técnicas descritas hasta ahora no son apropiadas para bodegas pequeñas, porque son muy complicadas y requieren, tanto, instrumentación compleja como procesos largos y laboriosos. Las técnicas POCT solventaría las limitaciones anteriores, y permitiría al usuario analizar de forma rápida el vino para tomar decisiones *in-situ*.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha desarrollado un LFIA para la detección y cuantificación de histamina en vinos tintos con el objetivo de proporcionar una técnica que pueda llevarse a cabo de forma sencilla en una bodega (como ya se



mencionó previamente hay límites recomendados en algunos países), o también para que cualquier consumidor tenga al alcance un test para analizar la histamina de su vino de una forma rápida en cualquier lugar. El LFIA seguirá un formato competitivo y se usarán nanopartículas superparamagnéticas como marca de detección para su posterior cuantificación con un sensor inductivo. Este tema se desarrollará en profundidad durante el capítulo B.3 de la sección de resultados y discusión.

## **A.2 OBJETIVOS**

---



## **A.2.1 Objetivos**

El desarrollo de métodos rápidos, simples y sensibles es uno de los retos a lo que se enfrenta, en la actualidad, la comunidad científica, para su uso en diferentes campos de aplicación como el diagnóstico en medicina y el control de calidad en la industria alimentaria, entre otros. Los LFIA se encuentran entre las de técnicas POCT por excelencia. Sin embargo, en numerosas ocasiones su aplicación se ve limitada debido a su detección meramente cualitativa. Por este motivo, el desarrollo de dispositivos sensores/lectores que permitan cuantificar la señal de las tiras de flujo lateral (LFSs, *Lateral Flow Strip*), es un desafío de gran interés imprescindible para ampliar su campo de aplicación y dar respuesta a la creciente demanda de biosensores POCT.

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de inmunoensayos magnéticos de flujo lateral (MLFIAs) para la detección y cuantificación de moléculas y proteínas de interés en diferentes ámbitos de aplicación, incluyendo pruebas de concepto de los ámbitos como es el sanitario y alimentario.

Este objetivo contribuye a dos proyectos de investigación. El primero de ellos se trata de un proyecto del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España (MINECO-18-MAT2017-84959-C2-1-R) cuyo título es “Biosensor basado en nanopartículas superparamagnéticas para el diagnóstico precoz y no invasivo de cáncer colorrectal”. En este proyecto se busca el desarrollo de un biosensor para la detección de biomarcadores de CCR de creciente utilidad clínica, como son las vesículas extracelulares o los microRNA circulantes. Se pretende además que el biosensor desarrollado permita un análisis rápido con una elevada sensibilidad.

El dispositivo desarrollado tendría también utilidad en el campo alimentario. Para demostrarlo, se ha desarrollado la aplicación de los LFIA a la determinación de los niveles de histamina en vino en el marco del proyecto “Mejora de la calidad de los vinos Monasterio de Corias mediante un nuevo método de control de calidad” (FUO-148-16), financiado por Vinos Cangas S.L (Asturias). La determinación sencilla de esta amina biógena permitiría a bodegas pequeñas tomar decisiones rápidas en bodega y optimizar su producción para la exportación.

Estos dos casos de estudio cubren los dos formatos de inmunoensayos (sándwich y competitivo) para de esta forma comprobar la versatilidad del sistema biosensor.

Este objetivo general se ha abordado a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio del estado del arte de los MLFIAs en los últimos años. Este conocimiento ha servido de base para el desarrollo de un nuevo dispositivo con mejoras en características analíticas combinadas con ventajas en simplificación instrumental.
2. Estudio y optimización del uso de nanopartículas *multicore* magnéticas recubiertas de una capa de carbono (*nanoflowers*) para su uso dual en pre-concentración y detección en inmunoensayos de flujo lateral. Aplicación a la determinación de vesículas extracelulares.
3. Diseño, desarrollo y fabricación de un MLFIA en formato sándwich para la detección de EVs en muestras purificadas y de plasma de pacientes de cáncer colorrectal. Lectura cuantitativa de las señales óptica y magnética de las tiras de flujo lateral mediante lectores de reflectancia e inductivo respectivamente.
4. Diseño, desarrollo y fabricación de un MLFIA en formato competitivo para la detección de histamina en vinos, utilizando oro coloidal y nanopartículas superparamagnéticas como marcas de detección. Lectura cuantitativa de las señales óptica y magnética de las tiras de flujo lateral mediante lectores de reflectancia e inductivo respectivamente.
5. Estrategias de amplificación de la sensibilidad mediante métodos químicos basados en nanopartículas superparamagnéticas.

## **A.2.2 Objectives**

The development of fast, simple and sensitive methods is one of the challenges that the scientific community is currently facing, for use in different fields of application such as diagnosis in medicine and control and quality in food industry, among others. LFIA is one of the most widely used types of POCT devices for this purpose. However, on many occasions its application is limited due to its merely qualitative detection. For this reason, the development of devices for their coupling with LFSs in order to provide LFIA with a quantitative capacity, is a challenge of great interest and importance in this field.

The **main** objective of this Doctoral Thesis is the development of MLFIAs for the detection and quantification of molecules and proteins of interest in several fields of application, including proofs of concept in areas such as health and food safety.

This objective contributes to two research projects. The first of them is a project of the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO-18-MAT2017-84959-C2-1-R) whose title is "Superparamagnetic nanoparticle-based biosensor for non-invasive early diagnosis of colorectal cancer". This project is based on the development of a biosensor for the detection of biomarkers for CCR of increasing clinical utility, such as extracellular vesicles or circulating microRNAs. The biosensor developed also allow a rapid analysis with high sensitivity.

The developed device would also have utility in the food safety field. To demonstrate this, an application for the determination of the histamine allergen has been developed, taking part in the project "Improving the quality of Monasterio de Corias wines through a new quality control method" (FUO-148-16), funded by Vinos Cangas S.L. The simple determination of this biogenic amine would allow small cellar to make quick decisions in the winery and optimize their production for export.

These two case studies cover the two types of immunoassay formats (sandwich and competitive), in order to demonstrate the versatility of the system.

This general objective has been addressed through the following specific objectives:

1. Study of the state of the art of MLFIAs in recent years. This knowledge has underlined the basis for the development of a new device with improvements in analytical characteristics combined with advantages in instrumental simplification.

2. Study and optimization of the use of carbon-coated multicore magnetic nanoparticles (nanoflowers) as label in a lateral flow immunoassay. Application to the determination of extracellular vesicles using general biomarkers.
3. Design, development and production of a MLFIA in sandwich format for the detection of vesicles in plasma samples from colorectal cancer patients. Quantitative measurements of optical and magnetic signals of MLFIA by reflectance reader and inductive sensor.
4. Design, development and production of a MLFIA in competitive format for the detection of histamine in wines, using colloidal gold and superparamagnetic nanoparticles as labels. Quantitative measurements of optical and magnetic signals of MLFIAs by reflectance reader and inductive sensor.
5. Sensitivity enhancements using chemical methods based on superparamagnetic nanoparticles.

**A.3 FUNDAMENTOS DE LOS  
INMUNOENSAYOS DE FLUJO  
LATERAL**

---





### **A.3.1 Inmunoensayos de flujo lateral**

Los LFIA surgieron por primera vez a finales de la década de 1960 con el objetivo de controlar proteínas en suero. El primero de ellos, se realizó en 1976 para detectar la hCG en orina, dando lugar al popular test de embarazo. Esta prueba se basa en la interacción específica antígeno (hCG)-anticuerpo(anti-hCG). Desde entonces, el mismo principio se ha utilizado ampliamente para la detección de varias moléculas, como diversos biomarcadores de cáncer, microorganismos, toxinas o pesticidas, etc.

El LFIA integra las técnicas tradicionales de cromatografía e inmunoensayos en una simple membrana de nitrocelulosa. El elemento fundamental de los LFIA es la membrana, generalmente de nitrocelulosa, que se corta en forma de tira y se trata químicamente de manera que se favorezca el flujo capilar de la muestra líquida. Para controlar y facilitar el flujo, la membrana se completa con varias almohadillas. En la dirección transversal a la tira se inmovilizan (como mínimo) dos líneas de agentes de reconocimiento (por ejemplo, anticuerpos o ácidos nucleicos) conocidas como línea de test y control (LT y LC). La línea de test reconoce específicamente el analito de interés y la de control es utilizada para validar el test. En la Figura 4 se muestra la imagen de un test de embarazo, probablemente el ejemplo más popular de LFIA. En ella, se pueden observar las líneas de test y de control, lo que representa en este caso un resultado positivo de embarazo (sólo la LC sería negativo).



**Figura 4.** Imagen de un test de embarazo formato sándwich.

Esta plataforma de papel está catalogada como un dispositivo POCT, pues cumple exactamente todos los criterios ASSURED [158]. En este tipo de ensayo el sistema cromatográfico permite la separación de los componentes de la muestra biológica (por ejemplo, un fluido corporal) en función de las diferencias en su movilidad a través de la membrana de reacción. Por otro lado, la reacción inmunoquímica de afinidad permite la

unión entre el antígeno (molécula de interés) y un anticuerpo o ácido nucleico (el elemento de reconocimiento) dando lugar al reconocimiento del analito de interés de una forma específica. La combinación de ambas técnicas logra superar algunas de las desventajas de otras técnicas convencionales. En comparación, esta plataforma de papel es más económica, su procedimiento de uso es mucho más simple y rápido (el resultado puede obtenerse en sólo 15 min frente a tiempos superiores a una hora). Además, las membranas son fácilmente desechables y biodegradables.

Aunque estrictamente en los LFIA no se tiene un elemento de reconocimiento en contacto con un transductor, se consideran frecuentemente biosensores, puesto que cumplen otros requisitos de los mismos: buena selectividad sin apenas tratamiento de muestra, suficiente sensibilidad, baja cantidad de volumen de muestra requerida, no son necesarios pasos de lavado, robustez, bajo coste, respuesta rápida con un solo paso y un formato fácil de usar [159]. Cabe señalar, sin embargo, que los LFIA también presentan ciertas limitaciones, esencialmente relacionadas con su sensibilidad y capacidad cuantificadora. Convencionalmente este principio es usado para dar una respuesta cualitativa, pero en los últimos años se han desarrollado test cuantitativos siguiendo diversas estrategias. En la Tabla 2 se muestran las principales ventajas y limitaciones de los LFIA [160].

**Tabla 2.** Ventajas y limitaciones de los LFIA.

<b>Ventajas</b>	Ensayo de un único paso (generalmente no son necesarios tratamientos previos).
	Rápidez, bajo coste y bajo volumen de muestra requerido.
	Respuesta cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa (fácil integración con dispositivos de lectura).
	Procedimiento simple, sin necesidad de personal especialista.
	Aplicación POCT.
	Tiempo de desarrollo relativamente corto.
	Detección de diferentes analitos: proteínas, haptenos, ácidos nucleicos y pequeñas moléculas, entre otras.
	Adecuados para pruebas de cribado (screening).
	Robustez, almacenamiento prolongado y estabilidad en un amplio rango de condiciones.
	No necesita pretratamiento de la muestra.
<b>Limitaciones</b>	Alto potencial de comercialización. Sensibilidad y especificidad competitivas.
	Volúmenes de muestra inexactos reducen la precisión.
	El pequeño volumen de muestra compromete el límite de detección.
	Elevada dependencia de la calidad de los receptores (anticuerpos o ácidos nucleicos).
	Posible obstrucción de los poros debido a los componentes de la matriz pudiendo provocar interacciones inespecíficas. En estos casos se hace imprescindible la dilución de la muestra.
Limitación en el área de detección donde se inmovilizan los receptores, que para altas concentraciones de analitos puede provocar saturación. En estos casos es necesaria la dilución de la muestra.	
Las muestras no líquidas requieren pretratamiento.	

Discriminación cuantitativa limitada.

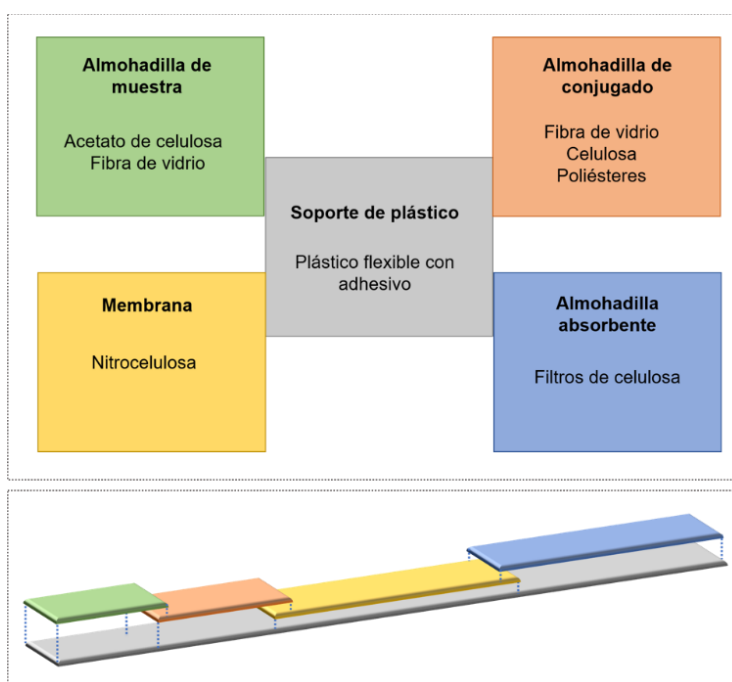
Gran variabilidad en la reproducibilidad debido a las características físicas de la muestra, como la viscosidad.

Reactividad cruzada o interacción limitada de los elementos de reconocimiento.

La capilaridad no puede controlarse una vez que la muestra empieza a fluir.

### A.3.1.1 Materiales para la construcción de LFIA estándar

Un LFIA estándar consta de cuatro componentes básicos que se muestran esquemáticamente en la Figura 5 [160–162]:



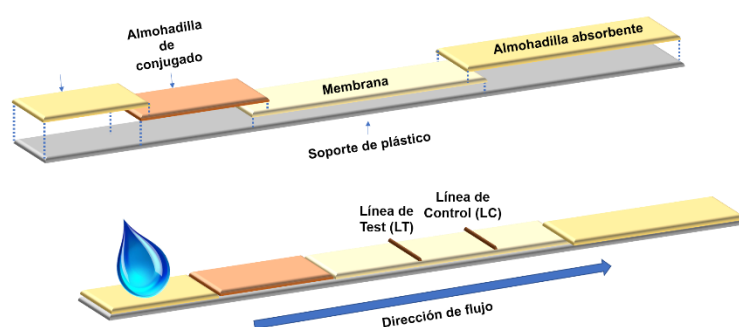
**Figura 5.** Esquema de los diferentes componentes básicos que forman una tira de flujo lateral y los materiales más empleados en cada caso.

- *Almohadilla de muestra:* está fabricada, generalmente, de acetato de celulosa o fibra de vidrio [163]. Tiene diversas funciones, siendo la principal la transferencia en régimen uniforme, suave y continuo de la muestra al siguiente material que conforma la tira, que es la almohadilla de conjugado. Este material está impregnado con sales tampón, proteínas, tensioactivos y otros compuestos con el objetivo de controlar la velocidad de flujo y con ello facilitar una adecuada interacción con el sistema de detección [158,164]. Además, también puede utilizarse para realizar un pre-tratamiento, por ejemplo, la separación de componentes de la muestra (como los glóbulos rojos de la sangre), eliminación de interferencias (otros componentes de la matriz), ajuste de pH, etc.

- *Almohadilla de conjugado:* es de fibra de vidrio, celulosa o poliéster, materiales que permiten absorber gran volumen de muestra. Es en esta almohadilla donde el reactivo de detección es inmovilizado a través de conservantes y componentes que garanticen la posterior solubilización [165]. Este reactivo lo constituye el elemento de reconocimiento conjugado a la marca de detección utilizada en el inmunoensayo (tradicionalmente, estas marcas son nanopartículas de oro). La función de los aditivos es mantener estable estos conjugados hasta que se realice el test, y para ello se suele utilizar disoluciones tampón que contengan carbohidratos, como la sacarosa. Cuando el bio-conjugado se seca en presencia del azúcar, se forma una capa a su alrededor que confiere estabilidad a las estructuras biológicas (elementos de reconocimiento). Cuando la muestra, que proviene de la almohadilla de muestra, entra en contacto con la almohadilla de conjugado, las moléculas de azúcar se disuelven rápidamente y el conjugado es disuelto en el líquido que fluye por capilaridad a través de la tira. En ese momento los reactivos de detección se unen específicamente al analito que se quiere detectar mediante reacciones de afinidad o de reconocimiento molecular. La naturaleza del material utilizado tiene efecto en la liberación del conjugado y la sensibilidad del ensayo. Una mala preparación de este paso puede afectar negativamente al resultado del test. Este elemento es opcional y alternativamente la conjugación del material biológico a la marca de detección puede realizarse en un microtubo antes de hacer fluir la muestra.
- *Membrana nanoporosa:* este parte es la más crítica para determinar la sensibilidad del ensayo, pues su estructura tridimensional y su grado de porosidad afectan a la velocidad de flujo, que a su vez condiciona la sensibilidad. Además, en ella se delimitan las zonas donde tienen lugar las reacciones de reconocimiento molecular, llamadas líneas de test y de control [166]. Los elementos de reconocimiento se dispensan automática y controladamente y son retenidos por interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas [167]. La nitrocelulosa es el material más convencional pues presenta una alta afinidad para proteínas y otras biomoléculas. La dispensación de los reactivos, el secado y el bloqueo de la membrana para evitar adsorciones inespecíficas son parámetros claves para optimizar la sensibilidad del ensayo. Las membranas se comercializan con distintos tamaños medios de poro y siempre presentan una distribución de tamaños que no se distribuye homogéneamente en su longitud. Por ello, las casas comerciales utilizan la velocidad de flujo como parámetro descriptivo al cual se hace referencia en el catálogo [167]. Este parámetro refleja el tiempo que tarda una muestra en

recorrer 4 centímetros de membrana. La velocidad de flujo afecta al tiempo para llevar a cabo el test, así como a la intensidad de la señal determinando la sensibilidad del ensayo (los mayores tiempos de interacción entre la molécula y el elemento de reconocimiento aumentan la sensibilidad del ensayo). El tamaño de poro es por tanto un parámetro a tener en cuenta en la optimización del ensayo [168].

- *Almohadilla absorbente*: típicamente está fabricada de filtro de celulosa. Se emplaza en la parte final de la membrana para absorber el líquido manteniendo el flujo hasta el agotamiento de la muestra. Además, esta almohadilla retiene el flujo de retorno [158]. La capacidad de esta almohadilla desempeña un papel importante en el resultado del ensayo ya que volúmenes mayores de muestra pueden contribuir a mejorar la sensibilidad del test.

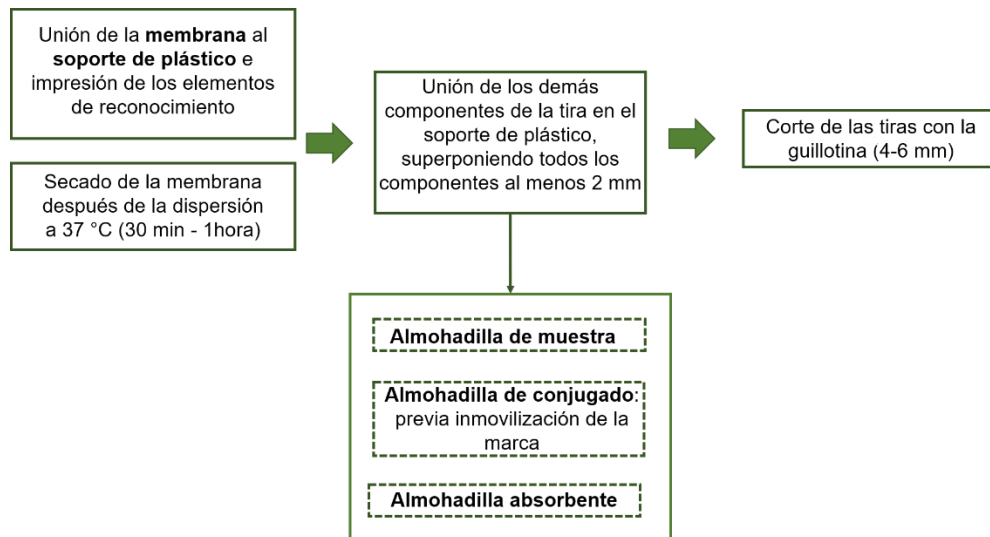


**Figura 6.** Esquema de la forma en la que se ensamblan los diferentes componentes en una tira de flujo lateral y su dirección de flujo.

Los componentes descritos se ensamblan en un soporte de plástico de la forma que se muestra en la Figura 6. Este soporte se utiliza para dar robustez a la tira, mantener la posición de sus componentes y facilitar su manejo. El material utilizado es una lámina de plástico flexible con una cara adhesiva sobre la que se montan los componentes [160]. Generalmente, con fines comerciales la tira se aloja en una carcasa plástica para conseguir una mayor consistencia y resistencia mecánica.

### A.3.1.2 Procedimiento de fabricación de una tira de flujo lateral

El procedimiento para fabricar una tira de flujo lateral consta de diversos pasos que se resumen a continuación y se exponen de forma esquemática en la Figura 7 [159,161].



**Figura 7.** Esquema del proceso de fabricación de las tiras de flujo lateral.

- Los reactivos utilizados como elementos de reconocimiento en la línea de control y la de test son inmovilizados en la membrana de nitrocelulosa mediante un dispensador automático que traza una línea de aproximadamente 0.8 mm sobre la membrana sin cortar (30 cm x 2.5 cm) adherida al soporte plástico (30 cm x 6 cm). Las líneas impresas se dejan secar a 37 °C para facilitar la inmovilización. A continuación, se ensamblan los demás componentes de la tira, superponiéndolos unos milímetros (generalmente 2 mm) para facilitar el flujo por capilaridad. Por último, con ayuda de una guillotina se cortan las tiras con una anchura de 4-6 mm. La longitud de la tira es de 5-6 cm aproximadamente.
- Para bloquear químicamente los sitios libres (donde no hay los elementos de reconocimiento) se utilizan reactivos químicos (por ejemplo, albúmina de suero bovino, BSA) para reducir las interacciones inespecíficas tanto en las líneas como en otros puntos de la membrana (se persigue un ensayo sin interferencias provocadas por un fondo que no esté limpio).

Para llevar a cabo el ensayo, la muestra que contiene el analito que se quiere detectar se añade a la almohadilla de muestra. Desde allí, la muestra fluye por capilaridad pasando por la almohadilla de conjugado en la que el analito se enlaza al primer elemento de reconocimiento. Este elemento de reconocimiento está a su vez unido a la marca de detección, con lo que a partir de este punto el analito queda marcado y, en consecuencia, detectable. El analito y su marca de detección circulan por la fase móvil a través de la membrana (fase estacionaria) e interaccionan con los elementos de reconocimiento dispensados formando las líneas de test y control.

La sensibilidad de los LFIA depende de las características del flujo y de la afinidad de los elementos de reconocimiento.

### **A.3.1.3 Formatos de las tiras de flujo lateral**

Los LFIA se clasifican en dos formatos generales (sándwich y competitivo) que son los más convencionales [160,161], y su clasificación se hace atendiendo al analito objeto [169].

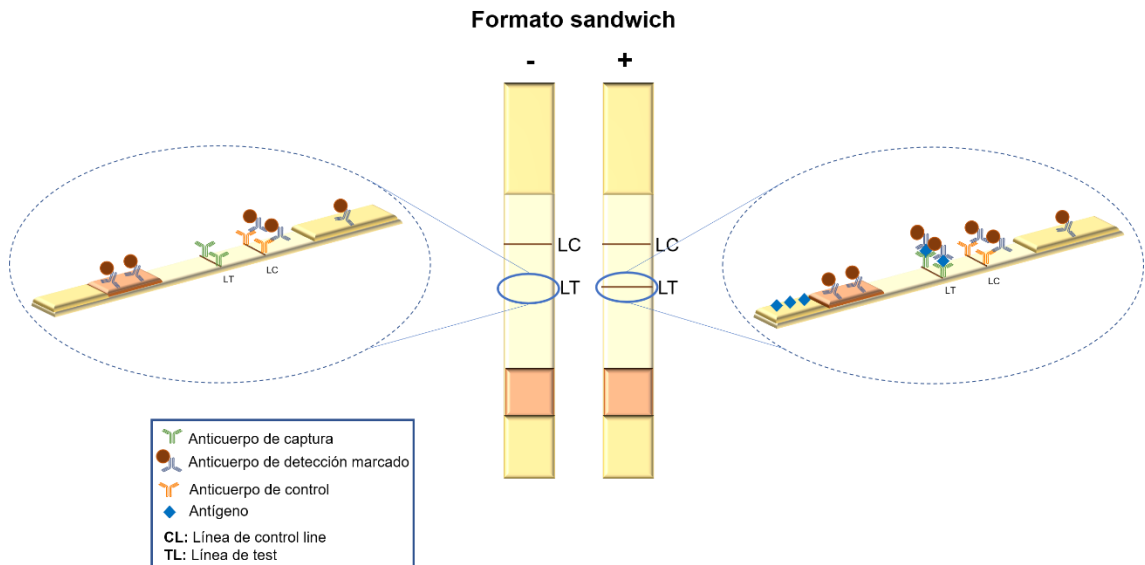
#### *A. Formato sándwich*

Este formato es utilizado para analitos grandes que tienen varias zonas en la molécula que pueden ser reconocidas molecularmente (epítomos). Para el desarrollo de los LFIA que siguen este formato son necesarios tres tipos de elementos de reconocimiento, generalmente anticuerpos [170]. El anticuerpo 1 es el que se une a la marca de detección, y posteriormente se inmoviliza en la almohadilla de conjugado. Este anticuerpo reconoce el epítomo 1 del antígeno y se conoce como anticuerpo de detección. El anticuerpo 2 es el que se inmoviliza en la membrana de nitrocelulosa para formar la línea de test y es denominado anticuerpo de captura. Frecuentemente este anticuerpo reconoce un epítomo diferente al que reconoce el anticuerpo de detección. Por último, el tercer anticuerpo se inmoviliza en la línea de control y se trata de una anti-inmunoglobulina específica de la especie del anticuerpo 1. Este anticuerpo de control interactúa con el anticuerpo 1, y sirve para validar el test, pues asegura que el flujo de líquido llega hasta el final de la tira, además de comprobar que el conjugado anticuerpo-nanopartícula está en buenas condiciones.

Cuando la muestra se añade, el anticuerpo marcado se rehidrata y fluye hacia la membrana por capilaridad [171]. En el caso de las muestras negativas que no contienen analito, solo se observa la línea de control que se forma cuando el anticuerpo control interacciona con el anticuerpo de detección. Para las muestras positivas, el analito se une al anticuerpo de detección marcado, y cuando este conjugado llega a la línea de test es reconocido específicamente por el anticuerpo de captura formando la línea de test [172]. El exceso de anticuerpos marcados forma la línea de control. En la Figura 8 se muestra un esquema del funcionamiento de los LFIA formato tipo sándwich.

Para este tipo de formato, en el blanco (cuando la muestra no contiene analito) solo observamos línea de control, y para las muestras positivas, dos líneas: test y control. La intensidad de la señal de la línea de test es directamente proporcional a la concentración de analito (Figura 8).





**Figura 8.** Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral formato tipo sándwich. En el formato tipo sándwich la respuesta es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra en el caso de muestras positivas. En el caso de ausencia de analito, no se observa señal en la línea de test.

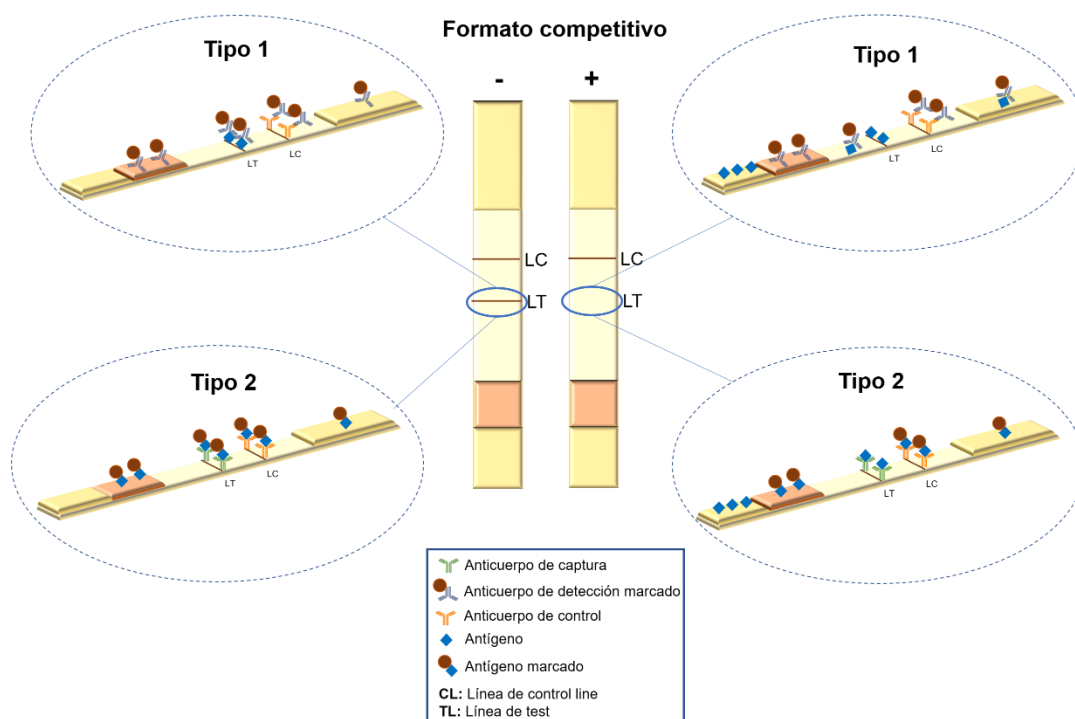
### B. Formato competitivo

Este formato se utiliza cuando el analito de interés tiene un bajo peso molecular. Este condicionante en su estructura química hace que sólo presente un epítipo o determinante antigénico. Los analitos en este caso no pueden unirse simultáneamente a dos elementos de reconocimiento como en el formato sándwich. Generalmente en este caso se utilizan dos anticuerpos (anticuerpo 1 y anticuerpo control). Este formato su vez se divide en dos tipos de ensayo. En ambos tipos, se inmoviliza uno de los anticuerpos (antiimmunoglobulina) en la línea de control.

Para el primer tipo, el anticuerpo se une a la marca de detección y el conjugado resultante se inmoviliza en la almohadilla de conjugado [173] (Figura 9-Tipo 1). En la línea de test se inmovilizan moléculas de analito, generalmente unidas a una proteína para aumentar su peso molecular, y proporcionar más interacciones químicas que faciliten su inmovilización. Para una muestra negativa que no contenga analito, todo el anticuerpo marcado se unirá a la línea de test y a la línea de control, y ambas serán visibles (detectables). En el caso de una muestra positiva, el analito de la muestra se unirá el anticuerpo marcado competirá por el analito de la muestra y el que está en la línea de test. Si la muestra está muy concentrada, el reactivo de detección se agotará con el analito, que lo bloquea, y a su paso por la línea de test no podrá unirse al antígeno inmovilizado en la línea de test. En el segundo tipo, el anticuerpo 1 es inmovilizado en la línea de test, y moléculas de analito unidas a las marcas de detección son

inmovilizadas en la almohadilla de conjugado [174] (Figura 9-Tipo 2). En una muestra negativa, el analito unido a la marca de detección fluye a través de la tira y se une al anticuerpo de la línea de test y control, formándose ambas líneas. En el caso de una muestra positiva, el analito de la muestra y el analito marcado compiten por el anticuerpo en la línea de test, de forma que cuanto mayor sea la concentración de analito en la muestra, menos analito marcado se unirá a la línea de test. Además, el analito marcado se une a la línea de control.

En ambos tipos de ensayo competitivo, la señal más intensa se corresponde con el blanco, y para las muestras positivas la señal de la línea de test es inversamente proporcional a la concentración. En la Figura 9 se muestra un esquema del funcionamiento de los dos tipos de LFIA formato tipo competitivo.



**Figura 9.** Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral de formato competitivo. En este tipo de formato, la respuesta es indirectamente proporcional a la concentración de analito en el caso de muestras positivas. En el caso de ausencia de analito, la respuesta en la línea de test se corresponde con la más intensa. **Formato competitivo tipo 1:** se inmoviliza el antígeno en la membrana. **Formato competitivo tipo 2:** se inmoviliza el anticuerpo de captura en la membrana.

### Formato multiplex

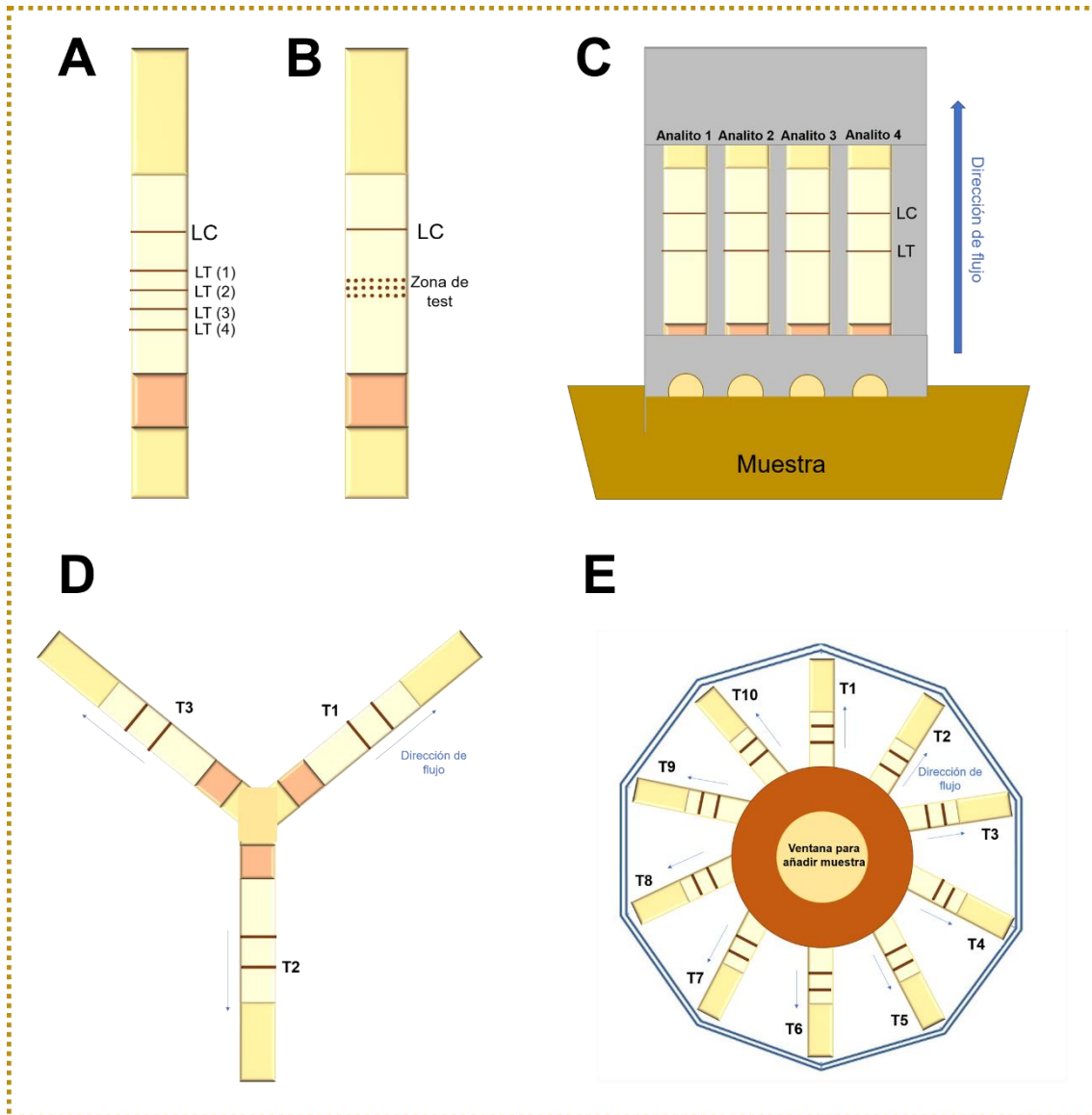
Los LFIA pueden también utilizarse para detectar varias moléculas de forma simultánea siguiendo el formato múltiplex [160,175]. Este tipo de ensayos pueden seguir formatos competitivo o sándwich. Una de las grandes ventajas de los formatos multiplex

es que permite analizar múltiples analitos sin perder las ventajas que nos ofrecen las LFSs, es decir, de una forma sencilla, rápida y económica. Este tipo de ensayos toma un gran interés en el ámbito clínico, ya que, por ejemplo, permite detectar biomarcadores correspondientes a diferentes fases de una enfermedad. Pero, al igual que en el ámbito clínico, también pueden ser utilizados en otros campos con el objetivo de detectar varios analitos que proporcionan información para resolver un problema analítico.

Para el desarrollo de un ensayo multiplex se pueden seguir varias configuraciones como se muestra en la Figura 10 [176].

- Una de las más sencillas es la adición de tantas líneas de test, separadas una distancia, como analitos se quieren detectar en una misma tira (Figura 10A). Con el uso de esta configuración se ha detectado diferentes analitos como contaminantes alimentarios [177,178], antibióticos [179] y pesticidas [180]. El número máximo de líneas que se han incluido en una sola tira son seis (incluyendo la línea de control), por lo tanto, estos test permiten la detección simultánea de cinco analitos [180]. Aunque lo más frecuente es encontrar la detección de dos o tres analitos [177,178]. El número de líneas que se pueden incluir en una sola tira se ve limitado por la longitud de la tira. Esta limitación se podría solventar, aumentando la longitud de la tira, pero esto llevaría desventajas asociadas, como el aumento de la cantidad de muestra, el tiempo para completar el ensayo y problemas de reproducibilidad debido al flujo de la muestra. Una estrategia para aumentar significativamente el número de analitos a detectar, sin aumentar la longitud de la tira, es reemplazar la línea de detección por puntos de detección separados espacialmente haciendo uso de la tecnología microarray, como se muestra en la Figura 10B [181]. La cantidad de puntos individuales que se pueden organizar en una única tira es mucho mayor que el número de líneas, pero se reduce notablemente la zona de detección. En la bibliografía se puede encontrar una tira que sigue esta configuración para la detección simultánea de 32 drogas de abuso en orina [182].

Algunas limitaciones que muestran estos ensayos son las interacciones cruzadas que pueden existir entre los diferentes analitos. La elección de los elementos de reconocimiento es un factor crucial que también debe tenerse en cuenta a la hora de desarrollar este tipo de ensayos pues puede afectar a las características analíticas.



**Figura 10.** Formatos de inmunoensayos de flujo lateral con detección multiplex siguiendo estrategias que implican la modificación del diseño y arquitectura de la tira: **(A)** Varias líneas de test en una misma tira, **(B)** diseño de la zona de test haciendo uso de la tecnología microarray.

Unión de varias tiras con el uso de carcasas con diferentes disposiciones: paralela **(C)**, en forma de estrella **(D)** y disco **(E)**. LT: Línea de test, LC\*: Línea de control y T: número de test.

- Otra configuración multiplex de las más sencillas es la unión de varias tiras con el uso de una carcasa, de forma que en cada una de las tiras se detecta un analito diferente. Las tiras pueden disponerse de forma paralela (Figura 10C) [183] o con configuraciones más complejas como, por ejemplo, una estrella (Figura 10D) [184,185] o un disco (Figura 10E) [186]. Una de las ventajas de este tipo de arquitectura es que cada ensayo se puede hacer de forma singular, y luego combinarse, lo que reduce la optimización del protocolo multiplex y evita la interferencia entre zonas de detección. Por otro lado, la limitación que pueden

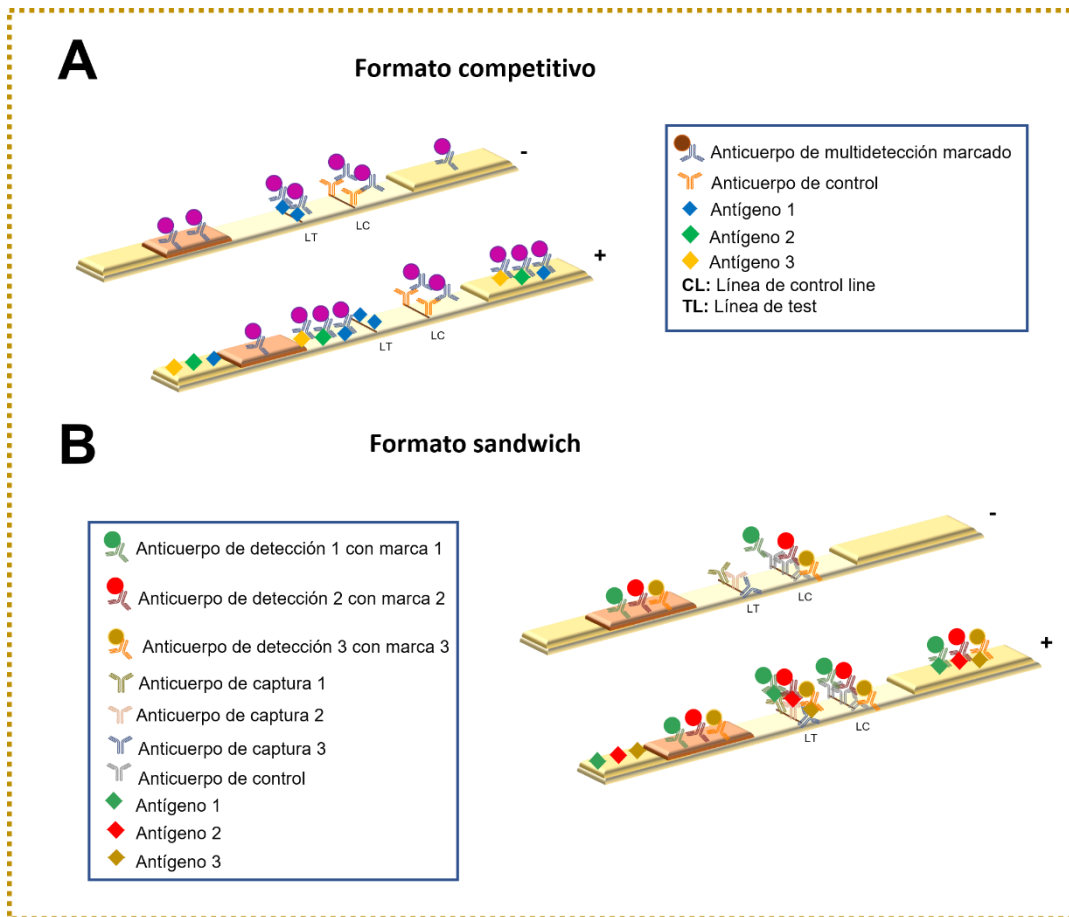
presentar estos ensayos es la dificultad de fabricación pues es más compleja que la de una tira convencional, y en ocasiones es necesario el diseño de una carcasa para facilitar la realización de los ensayos. También es preciso hacer estudios de los flujos de muestra pues se pueden ver influenciados tanto por el diseño como por la complejidad de la muestra.

Esta arquitectura ha permitido la detección de 10 anticuerpos [187] y 10 patógenos [186] colocando 10 tiras sobre un disco. Es muy común encontrar este tipo de test comercializados para el análisis de drogas de abuso, pero en estos casos las tiras se disponen de forma paralela [188,189].

Las estrategias citadas hasta ahora son relativas al diseño y arquitectura de la tira, pero hay otras estrategias que implican la modificación del elemento de reconocimiento o la marca de detección, como se muestra en la Figura 11, para, de esta forma, lograr un formato multiplex:

- *Elementos de reconocimiento:* una de las estrategias utilizadas es el desarrollo de anticuerpos selectivos para una clase de analitos que permita la detección de varios analitos, siempre perteneciendo a la misma clase de compuestos (Figura 11A). Siguiendo esta estrategia se han detectado sustancias peligrosas [190] y antibióticos con algunos de sus derivados [191], tomando las ventajas del desarrollo de anticuerpos monoclonales que tienen la capacidad de detectar varios analitos de la misma familia química.

Este enfoque requiere procesos más complicados debido a la necesidad de producir anticuerpos que reconozcan más de un analito. Además, este tipo de aplicaciones se reduce a los casos en los que la información útil es la detección de una suma de analitos, en lugar de la identificación de un compuesto específico, lo cual reduce su uso práctico debido a la pérdida de especificidad.



**Figura 11.** Formatos de inmunoensayos de flujo lateral con detección multiplex siguiendo estrategias que implican la modificación de los elementos de reconocimiento o marcas de detección. **(A)** Uso de anticuerpos que reconocen una clase de analitos. **(B)** Uso de varias marcas para detectar diferentes analitos en una misma línea de test.

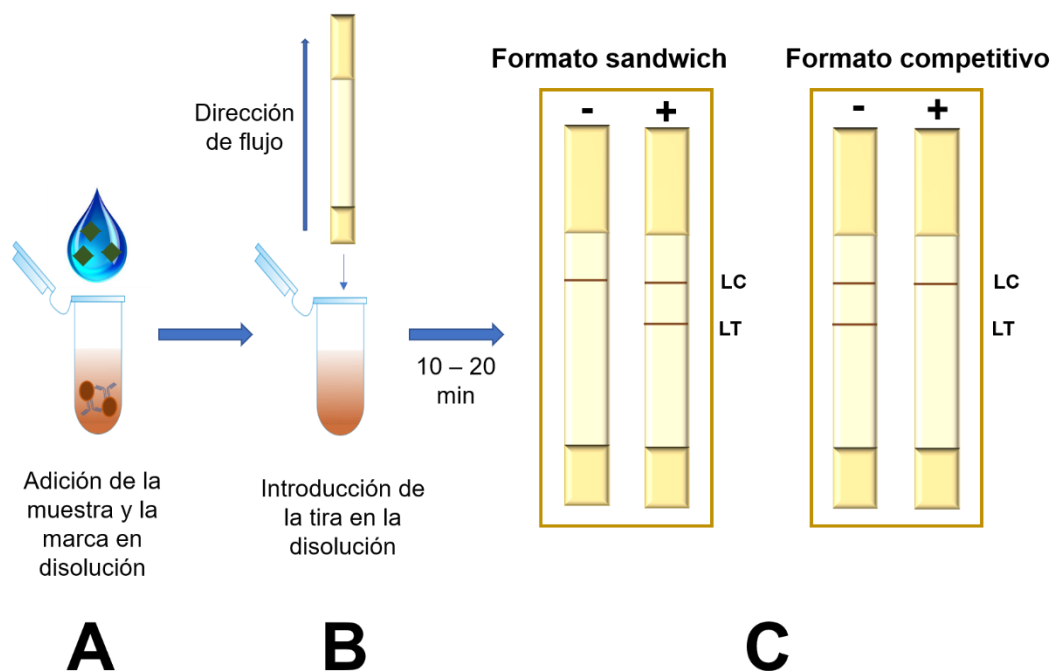
- **Marcas de detección:** el uso de varias marcas de detección puede considerarse una alternativa viable para el desarrollo de LFSs multiplex (Figura 11B). El empleo de varias marcas para detectar diferentes analitos en una misma línea de test ha sido una de las estrategias que se ha desarrollado, encontrándose ejemplos en la literatura para la detección de biomarcadores tumorales, virus y toxinas. Wang *et al.* [192] usaron diferentes puntos cuánticos para la detección de dos biomarcadores tumorales en una misma línea basándose en la diferente señal luminiscente de cada marca para su detección. Yen *et al.* [193] emplearon partículas de plata de diferentes colores (naranja, rojo y verde) para la detección simultánea de tres virus. Di Nardo *et al.* [194] emplearon dos tipos de nanopartículas de oro (rojas y azules) para la detección de dos toxinas y diseñaron un código de colores para un análisis cualitativo a simple vista. Esta estrategia requiere una mayor complejidad, ya que es necesario utilizar instrumentación para la detección y cuantificación de las diferentes marcas de

detección, pues el ojo humano no es capaz de realizar un análisis cuantitativo. El uso de puntos cuánticos se ha explorado de una forma más amplia debido a las diferentes propiedades ópticas que pueden mostrar este tipo de partículas.

Todas las estrategias descritas anteriormente, tanto las referidas al diseño de la tira como al desarrollo de elementos de reconocimiento y marcas de detección, para el desarrollo de LFAs multiplex pueden ser combinadas para desarrollar LFSs multiplex con un mayor potencial.

### Formato dipstick

Una alternativa a las LFSs convencionales, explicadas hasta ahora, es el formato dipstick o formato tubo. En este formato la tira generalmente consta de tres partes: almohadilla de muestra, membrana de nitrocelulosa y almohadilla absorbente [195]. La principal diferencia con las tiras convencionales es la inmovilización del conjugado (elemento de reconocimiento unido a la marca de detección) en un tubo, o simplemente su adición en el tubo en forma líquida o liofilizado. Por este motivo la tira no tiene el componente almohadilla de conjugado. El procedimiento y principio para este tipo de test es similar al convencional, con la diferencia de que la muestra y el conjugado reaccionan en fase líquida en un tubo en lugar de la almohadilla de conjugado. Una vez que ambos componentes están en el tubo la tira es introducida en el mismo verticalmente, de forma que, la muestra líquida entra en contacto con la almohadilla de muestra y el líquido comienza a fluir por capilaridad [104,105,196]. La Figura 12 muestra un esquema del formato y el procedimiento de funcionamiento del formato dipstick.



**Figura 12.** Formato dipstick o formato tubo. (A) Adición de la muestra y la marca de detección. (B) Introducción de la tira en el tubo verticalmente. (C) Posibles resultados según el formato (sándwich o competitivo).

En numerosas ocasiones este concepto de formato dipstick es usado de forma incorrecta en la literatura. Pues varios autores usan este nombre para referirse a LFIAs verticales, en los cuales la tira si contiene el conjugado inmobilizado en la almohadilla de conjugado, pero la muestra líquida se añade en un tubo, en lugar de la almohadilla muestra, lo que implica que el ensayo se realice de forma vertical [197–199].

El formato dipstick o formato tubo será el utilizado para la realización de los LFIAs de esta tesis. Además, se diseñará los dos tipos: competitivo y sándwich.

#### A.3.1.4 Elementos de reconocimiento

Los elementos de reconocimiento son las moléculas que permiten la reacción inmunoquímica entre el analito y la marca de detección, y pueden ser de diferente naturaleza como se explicará posteriormente de una forma más detallada. Estos se pueden encontrar unidos a la marca de detección y/o inmobilizados en la tira, formando la LC y LT, dependiendo del tipo de formato seleccionado para desarrollar el LFIA.

Aunque estos elementos no suponen un elemento físico en la tira, son una parte imprescindible para el desarrollo de los inmunoensayos, pues aportan especificidad al ensayo. Además, la sensibilidad depende, en gran medida, de la afinidad de estos. De una forma general, los elementos de reconocimiento se pueden dividir en tres grandes



grupos, por ser los más utilizados: anticuerpos, ácidos nucleicos y aptámeros (Figura 13) [160,161].



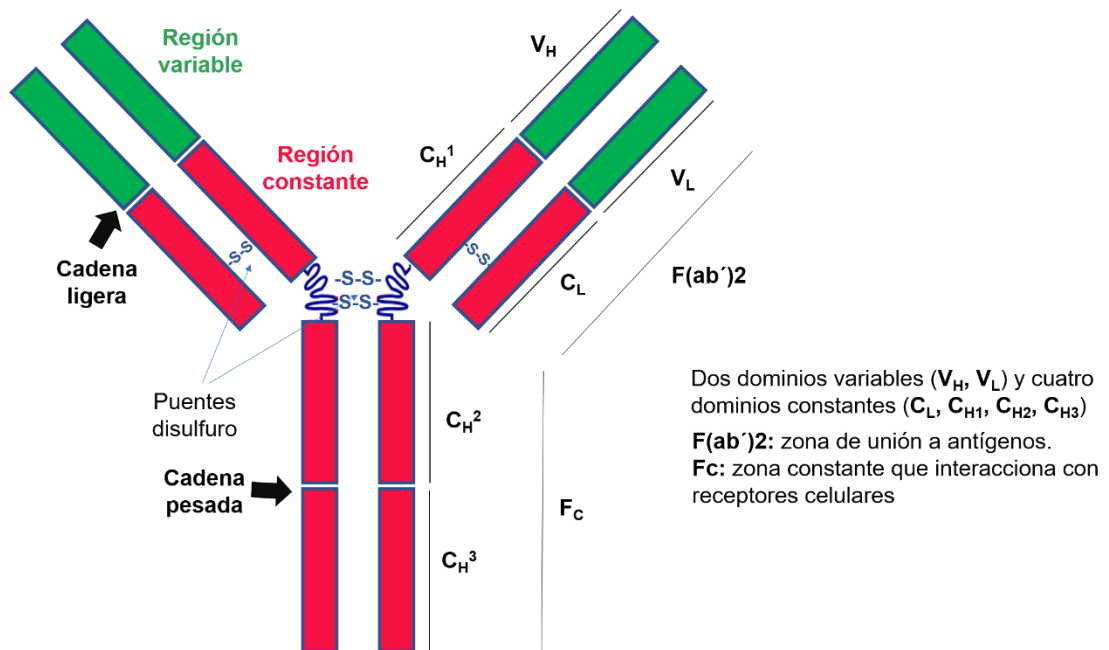
**Figura 13.** Elementos de reconocimiento más empleados en los inmunoensayos de flujo lateral.

### A.3.1.4.1 Anticuerpos

La mayoría de las LFSs actuales se basan en el uso de anticuerpos como elementos de reconocimiento. Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas “protectoras” que son producidas por el sistema inmune como respuesta a la presencia de sustancias catalogadas como “extrañas”, denominadas antígenos. Los anticuerpos reconocen y se adhieren a los antígenos con el objetivo de eliminarlos del cuerpo. El cuerpo tiene la capacidad de considerar un amplio número de sustancias como antígeno, incluyendo microorganismos que causan enfermedades, como virus y bacterias, o sustancias tóxicas. Una vez que el cuerpo reconoce una sustancia extraña, a través de unas proteínas llamadas receptores de antígenos, el cuerpo recurre a una serie de mecanismos, en los que se incluye la producción de anticuerpos, con el objetivo final de eliminar dicha sustancia del cuerpo. Los anticuerpos son producidos por glóbulos blancos especializados a los que se les denomina linfocitos B o células B.

La estructura básica de una Ig consiste en dos pares de cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos dando lugar a una forma monómera en forma de Y flexible (Figura 14). En la estructura del anticuerpo se pueden distinguir dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. En la Figura 14 se muestra un esquema simplificado de la estructura de un anticuerpo. Estas cadenas a su vez se dividen en cuatro dominios constantes y dos dominios variables, respectivamente. Los dominios variables son los que se unen de forma específica al antígeno. Por lo tanto, debido a la simetría de la estructura del anticuerpo, cada anticuerpo tiene dos sitios idénticos de unión al antígeno, cada uno de ellos situado al final de cada brazo. Los sitios de unión al antígeno varían mucho entre los diferentes anticuerpos. El fragmento de región cristalizada (denominado

región Fc) es la región de la cola (Figura 14), y es la parte del anticuerpo que interactúa con los receptores de la superficie celular, denominados receptores Fc. Esta propiedad es la que hace posible que los anticuerpos activen el sistema inmunológico.



**Figura 14.** Esquema de la estructura de una inmunoglobulina.

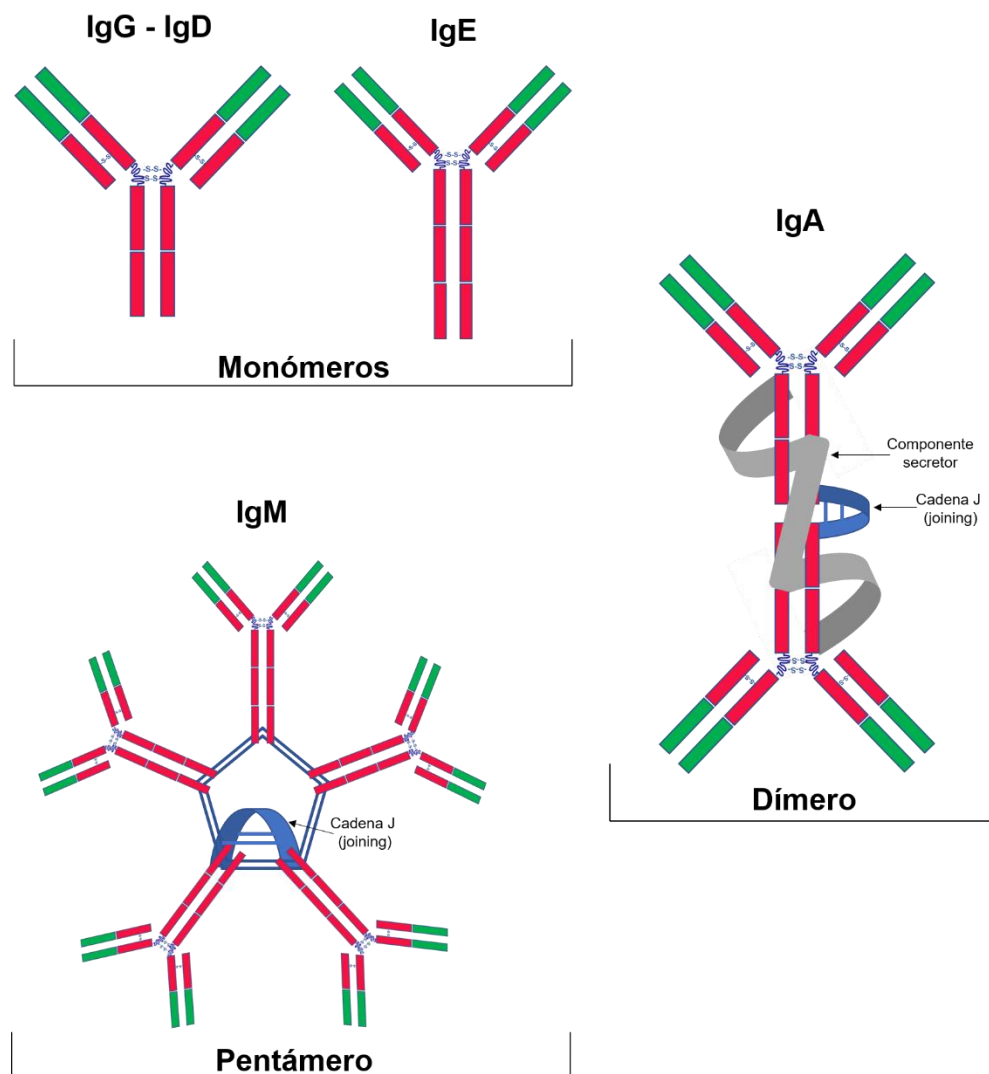
El reconocimiento antígeno-anticuerpo es muy específico porque el antígeno “encaja” en el locus de reconocimiento del anticuerpo, de forma semejante a como lo hace la interacción llave-cerradura. Esta interacción tiene lugar en los extremos de la cadena ligera del anticuerpo, y se debe a una serie de fuerzas e interacciones de atracción las cuales superan las de repulsión posibilitando la unión antígeno-anticuerpo. La zona del antígeno reconocida por el anticuerpo se denomina epítipo antígeno. Las fuerzas que mantienen esta unión son de distinta naturaleza: puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, de van der Waals e hidrofóbicas.

Los anticuerpos o Ig pueden clasificarse para los mamíferos en cinco tipos básicos según su región constante: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Los diferentes tipos pueden también diferir en su actividad. IgM y IgD son sintetizadas por los linfocitos y IgG, IgA y IgE por las células plasmáticas derivadas de ellos.

- IgG: este tipo es el más abundante en los líquidos corporales y confiere protección contra cualquier patógeno (virus, bacterias, hongos, etc).
- IgM: es el primer anticuerpo que el cuerpo genera para combatir una infección siendo de gran utilidad para el diagnóstico de fase aguda de distintas infecciones. Se encuentra principalmente en la sangre, y también en el líquido linfático.

- IgA: se encuentra en grandes concentraciones en las membranas mucosas, como las vías respiratorias, el tracto gastrointestinal, la saliva o las lágrimas.
- IgD: representa un porcentaje muy bajo del total de inmunoglobulinas y participa en el desarrollo de células de memoria en los linfocitos B.
- IgE: se encuentra en un porcentaje muy bajo en el suero y en las secreciones externas. Participa en las reacciones de hipersensibilidad, como reacciones alérgicas, y en respuesta a parásitos.

En cuanto a la estructura de los diferentes tipos de anticuerpos: los anticuerpos IgG, IgD y IgE son monómeros, el tipo IgA un dímero y la IgM un pentámero. En la Figura 15 se muestra las estructuras de los diferentes tipos de anticuerpos.



**Figura 15.** Esquema de los diferentes tipos de anticuerpos.

Debido a la especificidad que los anticuerpos presentan por un determinado antígeno, estos pueden ser utilizados como elementos de reconocimiento en los inmunoensayos, entre los que se encuentran los LFIA [200]. Su uso hace posible que

se pueda detectar de forma selectiva y específica un antígeno de interés. Por este motivo la selección de anticuerpos efectivos, es decir, altamente específicos y con alta afinidad por el antígeno, es una etapa crítica en el desarrollo con éxito de este tipo de inmunoensayos.

La IgG es el tipo de anticuerpo más utilizado como elemento de reconocimiento. Los anticuerpos utilizados para LFIA pueden ser monoclonales y/o policlonales. Los anticuerpos policlonales son una mezcla heterogénea de anticuerpos producidos por diferentes clones de células B, y por lo tanto pueden reconocer y unirse a diferentes epítomos de un solo antígeno. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales son generados por células B idénticas que provienen de clones de una sola célula madre, de forma que este tipo de anticuerpos solo reconocen el mismo epítomo de un único antígeno. La producción de ambos tipos es diferente, como se va a mostrar a continuación, pero en ambos casos el proceso de producción comienza con la inyección del antígeno deseado en un animal para provocar la respuesta inmune frente al antígeno [201,202].

### Producción de anticuerpos policlonales

La producción de anticuerpos policlonales implica la inmunización inicial, seguida de otras administraciones de antígeno posteriores cuyo objetivo es la producción de títulos más altos de anticuerpo contra el antígeno en concreto. Por lo general, se requieren tres o cuatro meses para lograr títulos de anticuerpos que luego comiencen a estabilizarse. A continuación, los animales se someten a programas de producción, y tras varias semanas se pueden recolectar los sueros. Estos sueros, generalmente, requieren una etapa de purificación para eliminar otras proteínas séricas. Los animales más adecuados para la producción de este tipo de anticuerpos son los conejos y las cabras.

### Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales, a diferencia de los policlonales, son producidos en modelos *ex vivo* mediante cultivos celulares. Una vez que el animal desarrolla la respuesta inmune, los linfocitos B se aíslan del animal, normalmente del bazo, y se fusionan con una línea celular de mieloma, creando un híbrido. Este hibridoma generado tiene, por una parte, la capacidad de crecer indefinidamente en cultivo (como la célula de mieloma), y, por otra parte, la propiedad de secretar anticuerpos (como los linfocitos B). Uno de los aspectos críticos para una producción exitosa de anticuerpos de este tipo, es el cribado de los hibridomas para la selección del anticuerpo monoclonal

deseado. La técnica ELISA es la utilizada para la realización de este cribado. Los ratones son los animales más empleados para el desarrollo de estos anticuerpos.

Si se comparan los procesos de producción de ambos anticuerpos se puede concluir que los anticuerpos policlonales requieren menos tiempo (3-4 meses) para su producción, y esta es más barata. Sin embargo, no reconocen un epítipo único, presentan una mayor probabilidad de reactividad cruzada y la variabilidad en lotes es mayor [201]. El tiempo medio de producción de un anticuerpo monoclonal es de 6 meses. Por lo tanto, cada tipo de anticuerpo tiene sus ventajas y desventajas, y existe una clara necesidad de generar ambos tipos para su uso en análisis y clínica. Los anticuerpos monoclonales son los preferidos para el desarrollo de LFSs.

La presencia de impurezas en los anticuerpos puede generar una pérdida de rendimiento del anticuerpo en el desarrollo del inmunoensayo, por este motivo, es de gran importancia el uso de etapas de purificación de anticuerpos previas al uso de estos en las LFSs [203].

Existe una variedad de técnicas de purificación de anticuerpo, pero cabe destacar, por ser la más empleada, el proceso de fraccionamiento de sal seguido de cromatografía de intercambio iónico, con purificación de proteína A o G, o métodos de afinidad [204,205]. Previamente a la purificación de los anticuerpos deben tenerse en cuenta ciertos aspectos para mantener la calidad de estas moléculas [203]:

- Los anticuerpos para su uso en LFSs deben tener una pureza muy alta (idealmente >98%), pues la presencia de impurezas dificulta la unión antígeno-anticuerpo.
- Los cambios de condiciones extremas de anticuerpos, como por ejemplo el pH o la fuerza iónica, pueden provocar la desnaturalización de la estructura del anticuerpo, lo que podría generar interacciones inespecíficas.
- Por último, es estrictamente necesario evitar el agregado de anticuerpos que posteriormente se utilizarán en LFIAs, y para ello se puede recurrir a la centrifugación. Los agregados de anticuerpos pueden ser indicativos de condiciones de desnaturalización leve, lo que también implicaría una pérdida del rendimiento del anticuerpo.

Una vez que los anticuerpos están purificados, otro paso clave es testar su funcionamiento previamente al desarrollo de las LFSs. Esto puede llevarse a cabo a través de ensayos ELISA [203], lo que implicaría más tiempo, o en la propia LFS. El segundo caso sería el idóneo porque las pruebas se realizarían en las mismas condiciones en las que posteriormente se realizaría en el ensayo. Con este tipo de

ensayos se pretende seleccionar anticuerpos con alta afinidad por el antígeno, altamente específicos y de elevada pureza.

En la actualidad existe una multitud de anticuerpos comerciales, tanto monoclonales como policlonales, para la detección de una gran cantidad de analitos de interés en diferentes campos de aplicación. El uso de anticuerpos comerciales puede ofrecer ventajas a corto plazo pues su disponibilidad es casi inmediata, pero los resultados obtenidos con este tipo de anticuerpos son generalmente comparables a las pruebas disponibles en el mercado [203]. Además, el usuario que adquiere este anticuerpo no tiene la capacidad de modificar la calidad del anticuerpo, controlar la producción del anticuerpo, y no se puede garantizar el suministro a largo plazo. Por lo contrario, los anticuerpos de producción propia requieren mucho más tiempo para su obtención, entre 3-6 meses, pero el control de la producción ofrece ventajas a largo plazo. El control de la producción disminuye el coste a largo plazo, y un punto importante es que la producción de un anticuerpo único ofrece la oportunidad de obtener características únicas del inmunoensayo.

A la hora de desarrollar LFIA, se tiene que decidir el tipo de formato que se va a seguir, es decir, competitivo o sándwich, lo cual generalmente viene determinado por el tipo de analito. El tipo de formato seleccionado implica tomar decisiones para la selección de anticuerpos. En el caso de los LFIA competitivos, solo es necesario un anticuerpo para la formación de la línea de test. Los inmunoensayos competitivos generalmente se desarrollan para analitos con bajo peso molecular, lo cual implica una dificultad a la hora de desarrollar anticuerpos para reconocer estos analitos. Es necesario que estas moléculas pequeñas (haptenos) se conjuguen a proteínas portadoras, como ovoalbúmina (OVA) o hemocianina de lapa californiana (KLH), para provocar una respuesta inmune [203]. Para los LFIA sándwich se precisan dos tipos de anticuerpos para detectar el analito de interés. Los anticuerpos monoclonales son preferibles frente a los policlonales, por reconocer un solo epítipo. En el caso de tener que utilizar un anticuerpo policlonal, es necesario hacer estudios para evaluar si es preferible utilizarlo como anticuerpo de captura o de detección. El hecho de que un anticuerpo policlonal pueda unirse a diferentes epítipos puede aumentar la señal que se genera si se usa como anticuerpo de detección, pero, también puede dar lugar a impedimentos estéricos que dificulten la unión del analito al anticuerpo de captura. Por este motivo, el primer paso del diseño de LFIA es hacer pruebas para decidir qué tipo de anticuerpo se usa en cada caso particular. Tanto en los inmunoensayos competitivo como sándwich se usan anticuerpos en la línea de control, pero en este caso se suele tratar de anticuerpos secundarios. Los anticuerpos secundarios son aquellos que

reconocen anticuerpos primarios (los que reconocen al antígeno directamente), concretamente la región Fc de estos. Los anticuerpos secundarios también se suelen utilizar en algunos diseños de inmunoensayos para la obtención de una amplificación [195].

El uso de anticuerpos como elementos de reconocimiento en LFSs tiene varias limitaciones, como son la baja sensibilidad, alto coste de producción, tiempos largos de producción y alta variación entre lotes [206]. Además, la producción de anticuerpos para analitos no inmunogénicos o tóxicos es un cuello de botella en este ámbito [207]. Por este motivo, en los últimos años, muchos investigadores buscan alternativas al uso de anticuerpos.

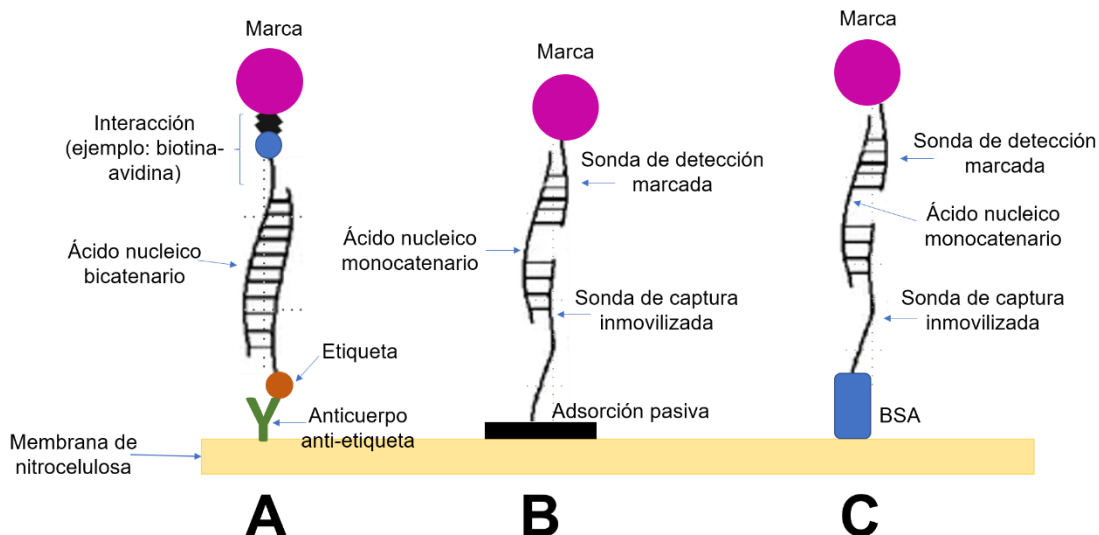
Para el desarrollo de los LFIA de esta tesis se utilizarán anticuerpos como elemento de reconocimiento en todos los casos.

### ***A.3.1.4.2 Ácidos nucleicos y aptámeros***

Los ácidos nucleicos y los aptámeros son alternativas a los anticuerpos para su uso como elementos de reconocimiento.

Un enfoque relativamente novedoso y prometedor es la combinación de la amplificación por “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) con la detección inmunoquímica basada en LFSs. Esta técnica combina el poder de amplificar una secuencia del gen diana (del analito de interés) con alta sensibilidad, y la facilidad de uso que implica el uso de estas tiras. Con el uso de esta técnica es posible la detección de material genético haciendo uso de las plataformas de flujo lateral [161]. Este tipo de LFSs se pueden clasificar en dos formatos pues los ácidos nucleicos se pueden capturar en las tiras con el uso de anticuerpos o de manera independiente al uso de anticuerpos (Figura 16) [208]:

- *Formato dependiente de anticuerpos o inmunoensayo de flujo lateral de ácido nucleicos* (Figura 16A): la detección de una secuencia de ácido nucleico bicatenario amplificado específico para un organismo diana puede lograrse usando un cebador con dos etiquetas (como, por ejemplo, la biotina e isotiocianato de fluorescencia). El reconocimiento del analito se realiza mediante la unión de un anticuerpo inmovilizado en la tira de nitrocelulosa y marcado contra una de las dos etiquetas del cebador. Por otro lado, se usan nanopartículas, u otro tipo de marcas que permitan la detección, conjugadas a una molécula que reconozca la otra etiqueta del cebador.



**Figura 16.** Representación esquemática de diferentes formatos de ensayos de flujo lateral para la detección de ácidos nucleicos. Formato dependiente de anticuerpos o inmunoensayo de flujo lateral de ácidos nucleicos (A). Formato independiente de anticuerpos o tira de flujo lateral de ácidos nucleicos en los que se puede utilizar para la inmovilización de la sonda: adsorción pasiva (B) o albumina de suero bovino (BSA) (C).

- *Formato independiente de anticuerpos o tira de flujo lateral de ácidos nucleicos:* en este caso se utilizan sondas de captura en lugar de anticuerpos. Esta sonda es inmovilizada en la membrana a través de adsorción pasiva (Figura 16B) o se conjuga a través de una proteína, como la BSA, como se muestra en la Figura 16C. La marca de detección que permite la detección se conjuga a otra sonda de detección. Con el uso de las dos sondas es posible la detección de ácido nucleico monocatenario mediante hibridación.

Este tipo de formatos ha cobrado gran interés en los últimos años para la detección de material genético específico de microorganismos, como pueden ser bacterias o virus [209,210].

La PCR fue la primera tecnología desarrollada para la detección de ácidos nucleicos, y en la actualidad sigue siendo la más empleada para la amplificación y detección de estos. Sin embargo, uno de los grandes problemas asociados a esta técnica es que se requieren cicladores térmicos muy grandes y caros, lo que limita en gran medida la aplicación de la PCR en entornos de recursos limitados y/o para su aplicación en dispositivos POCT. Como alternativa a la PCR para la detección de material genético ha surgido la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos. Esta técnica se trata de un proceso simple que permite, de una forma rápida, amplificar de manera eficiente los ácidos nucleicos a una temperatura constante, sin la necesidad de



emplear los termocicladores requeridos para la PCR. Las técnicas de amplificación isotérmica se pueden clasificar, atendiendo a su cinética de reacción, en tres grandes grupos: amplificación exponencial, amplificación lineal y amplificación en cascada [211]. A su vez estos grandes grupos se subdividen en un gran número de técnicas más específicas.

Gracias a esta tecnología se ha logrado la detección de ácidos nucleicos de una forma simple y rápida con una sensibilidad impresionante [212,213], llegando a comercializar algunos de estos métodos [214]. Además, en los últimos años con el uso de la amplificación isotérmica se ha conseguido detectar un amplio espectro de analitos, como por ejemplo proteínas [215], células [216], moléculas pequeñas [217] e iones [218]. En la actualidad el uso de estas técnicas permite el desarrollo de aplicaciones, entre las que se encuentran el desarrollo de biosensores o dispositivos portátiles que mejoran los ensayos *in situ* debido a la alta sensibilidad que confieren los ácidos nucleicos. Entre los dispositivos portátiles a los que se han acoplado la amplificación isotérmica se encuentran los LFIA, permitiendo de este modo la detección de material genético sin la necesidad de recurrir a la PCR [219–221].

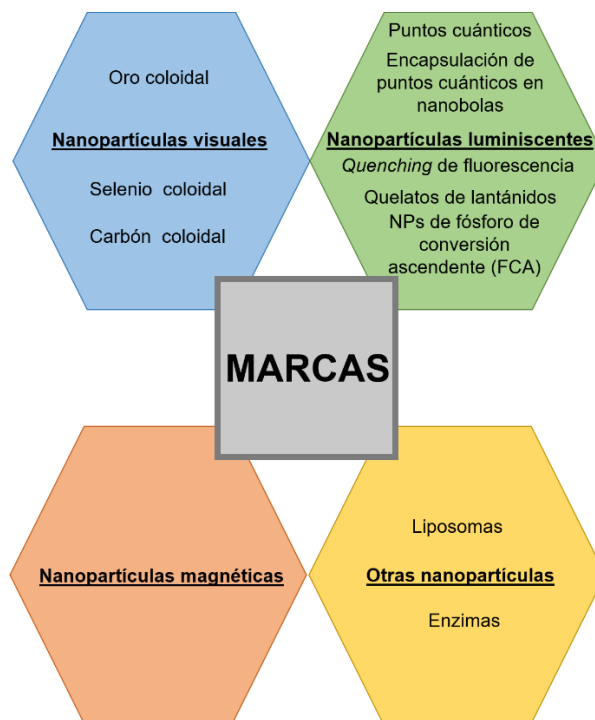
Los **aptámeros** son oligonucleótidos artificiales, cortos y de cadena sencilla (ARN o ADN) que se sintetizan fácilmente. Estas estructuras pueden adoptar conformaciones tridimensionales específicas para combinarse con analitos de interés con alta especificidad y afinidad de manera similar a los anticuerpos. La selección de aptámeros se realiza mediante un método denominado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) que comprende un proceso *in vitro* a partir de poblaciones con una alta diversidad de secuencias, y, por tanto, de estructuras [222].

Los aptámeros son un candidato potencial para sustituir a los anticuerpos debido a las propiedades de reconocimiento que muestran [160], además de ofrecer una amplia versatilidad de diseño. Además, presentan ciertas ventajas frente a los anticuerpos, como su tamaño pequeño, la alta estabilidad, falta de inmunogeniedad, fácil síntesis química, posibilidad de modificación y dificultad para perder su actividad tras ser conjugados con la marca de detección [207]. Los aptámeros son adecuados para casi todos los diseños basados en anticuerpos, por lo tanto, también pueden ser usados para el desarrollo de LFIA. En los últimos años el interés por desarrollar LFSs basadas en esta tecnología ha aumentado exponencialmente [222–225].

### **A.3.1.5 Marcas de detección**

Las marcas de detección son otra parte imprescindible en el desarrollo de LFIA pues el tipo de marca empleado en cada caso será el que determine el tipo de detección

que se usará posteriormente. Para su explicación se van a dividir en los siguientes grupos: nanopartículas visuales, nanopartículas luminiscentes, MNP y otras nanopartículas (Figura 17).



**Figura 17.** Marcas de detección más empleadas en los inmunoensayos de flujo lateral.

El número de materiales utilizadas como marcas de detección en este tipo de ensayos es amplio, como veremos a continuación de una forma más detallada. Pero, una característica común a todos los materiales es que las concentraciones detectables deben ser bajas (concentraciones inferiores a  $10^{-9}$  M son las óptimas) [226] y también deben tener propiedades que permitan la conjugación de biomoléculas de reconocimiento. Además, la conjugación no debe cambiar las características de las nanopartículas, pero tampoco de los elementos de reconocimiento. A la hora de seleccionar las marcas de detección es preferible que su conjugación sea sencilla y que sean estables durante periodos de tiempo relativamente largos. El uso de algunas marcas de detección es más sencillo, es decir, generan una señal directa; sin embargo, se emplean otros tipos en lo que es necesario pasos adicionales para producir una señal analítica. Un ejemplo del segundo caso son las enzimas, que requieren la adición de un sustrato adecuado para producir una señal medible. Por lo tanto, a la hora de seleccionar una marca de detección siempre hay que buscar un compromiso entre el tiempo necesario para la generación de la señal, los límites de detección alcanzados, su estabilidad, así como la facilidad para su conjugación.

### **A.3.1.5.1 Marcas de detección visuales**

Las **nanopartículas de oro** (AuNP) son las marcas de detección más utilizadas y exploradas para su utilización en LFSs debido a diferentes aspectos. El oro coloidal es inerte lo que implica una alta estabilidad, y además es relativamente simple obtener partículas esféricas de tamaño controlado con síntesis sencillas y de bajo coste ofreciendo la posibilidad de variar su tamaño con el uso adecuado de aditivos químicos. Otra ventaja de este tipo de partículas es su alta afinidad por biomoléculas (proteínas y oligonucleótidos), lo que implica su fácil funcionalización. Por ejemplo, los anticuerpos se unen fuertemente a la superficie de las AuNPs mediante interacciones no covalentes, como son las interacciones iónicas, atracciones hidrofóbicas y enlaces dativos entre el metal y los electrones conductores de nitrógeno y átomos de azufre de la proteína [227]. La sensibilidad en los LFIA que usan nanopartículas de oro como marca viene determinada por el coeficiente de absorción molar de estas marcas de detección [228].

Durante años este tipo de nanopartículas se ha usado para el desarrollo de LFSs debido a su simplicidad, rapidez y fácil interpretación, pero solo permiten obtener resultados cualitativos, de decir, una detección visual lo que en ocasiones puede llevar a errores como consecuencia de la interpretación del ojo humano [229]. Además, la sensibilidad obtenida, en muchas ocasiones, no es suficiente para alcanzar los límites requeridos para detectar un analito. Por lo tanto, es necesario recurrir a estrategias con el objetivo de mejorar la sensibilidad. Estas estrategias implican el uso de lectores de tiras o el estudio de estrategias que permitan amplificar la señal [175]. El uso de lectores o dispositivos ópticos dotan a las LFSs de una capacidad cuantitativa, incluyendo dentro de los mismo dispositivos desarrollados para este fin o software que pueden ser utilizados a través de teléfonos móviles o scanner de oficina [230]. Las estrategias de amplificación de señal incluyen:

*a) Mejora de la señal basada en nanomateriales modificados con oro.*

La decoración de nanomateriales con nanopartículas de oro es una de las estrategias utilizadas para mejorar la sensibilidad en las LFSs que usan oro como marca de detección. El objetivo es aumentar el número de nanopartículas de oro con la construcción del nanocompuesto para proporcionar un color púrpura más oscuro, y así mejorar la señal visual. Algunos de los materiales encontrados en la literatura para el desarrollo de esta estrategia son nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  [231], nanorods de sílice [232] o nanoflowers de oro [233]. En todos los casos los límites de detección mejoran notablemente.

*b) Mejora de la señal basada en oro y plata.*

El uso de oro o plata también puede usarse para amplificar la señal colorimétrica en las líneas de una LFS. Esto se debe a que los iones oro o plata se reducen y depositan en la superficie de las nanopartículas de oro, aumentando el tamaño de la nanopartícula y la densidad óptica, lo cual permite una mejora en la sensibilidad [234].

*c) Mejora de la señal basada en el uso de nanopartículas de oro dobles.*

El objetivo principal de esta estrategia es aumentar el número de partículas de oro por analito, y para ello se emplean dos tipos de nanopartículas de oro que se ensamblan mediante interacciones biotina-estreptavidina [235,236] o anticuerpos secundarios [237–240]. De esta forma se aumenta el número de partículas por analito, y como consecuencia aumenta la señal visual mejorando la sensibilidad notablemente.

*d) Mejora de la señal basada en enzimas.*

La amplificación a través del uso de enzimas es ampliamente utilizada en biosensores y bioensayos [241]. El uso de doble marca de detección (nanopartículas de oro y enzimas) aumenta significativamente la sensibilidad en los LFIA, gracias a las reacciones enzimáticas. A través de estas reacciones se puede mejorar también la señal visual del oro, debido al cambio de color que sufre un sustrato, a través de la reacción enzimática, generando, de esta forma, un color más intenso [242,243].

Las **nanopartículas de selenio** (SeNP) son una marca de detección visual alternativa al oro coloidal que no necesita altas temperaturas para su síntesis, lo que hace el proceso más sencillo y menos costoso. Este tipo de partículas presentan una biocompatibilidad favorable y se conjugan fácilmente a biomoléculas sin perder su actividad. Sin embargo, esta especie de nanopartículas inorgánicas son inestables y pueden agregarse fácilmente. En la bibliografía se pueden encontrar LFIA que usan nanopartículas de selenio [244,245], pero su aplicación no está muy explorada.

Las **nanopartículas de carbono** (CNP), también conocidas como carbón coloidal, son una marca de detección visual que permite su detección de forma cualitativa y cuantitativa. Debido a su color negro intenso ofrecen la posibilidad de desarrollar LFIA con una alta sensibilidad pues exhiben una alta relación señal ruido (negro sobre el blanco de la membrana de nitrocelulosa), incluso es posible mejorar los límites de detección alcanzados con otro tipo de marcas de detección, entre las que se encuentra el oro [246,247]. Como marca de detección alternativa a las nanopartículas de oro, el carbón coloidal presenta muchas propiedades excelentes: preparación sencilla y de bajo

coste, alta estabilidad y facilidad para unirse a biomoléculas sin necesidad de previa activación. Sin embargo, la presencia de partículas grandes de forma irregular y la adsorción inespecífica de proteínas y biomoléculas son importantes desventajas que puede presentar este tipo de marca de detección [248]. En la bibliografía se pueden encontrar numerosos ejemplos de LFSs que usan nanopartículas de carbono como marca de detección en diferentes campos de aplicación: medicina [249], microbiología [250], seguridad alimentaria [251] y seguridad ambiental [252].

### ***A.3.1.5.2 Marcas de detección luminiscentes***

Recientemente las nanopartículas luminiscentes han sido utilizadas con el objetivo de reemplazar y mejorar los límites de detección obtenidos por las marcas de detección visuales [253]. A continuación, se van a explicar los tipos de nanopartículas luminiscentes más utilizadas en LFSs.

Los **puntos cuánticos** (conocidos en inglés como quantum dots, QD) son nanocristales semiconductores fluorescentes que, en la actualidad, se consideran como una marca de detección para LFIA con gran potencial, y como un candidato prometedor para desarrollar LFSs más sensibles. Sus propiedades más destacables son espectros de emisión estrechos, amplio rango de excitación y altos rendimientos cuánticos fluorescentes [254]. Además, los QD tienen un gran brillo, emisiones de fluorescencia cuantificables, coeficientes de absorción elevados, buena estabilidad y alta relación señal/ruido, lo que les confiere unas propiedades idóneas para ser un candidato de marca de detección robusta en LFIA sensibles [192]. Los QD no se unen directamente a biomoléculas, por lo tanto, es necesario que tengan disponibles grupos funcionales en su superficie (generalmente son grupos amino o carboxilo) para conjugarlos con biomoléculas, como pueden ser las proteínas. Esta marca de detección se ha empleado para la detección de diversos analitos incluyendo alérgenos [255], toxinas [256], patógenos [257,258], biomarcadores [259,260], entre otros. Además, los QD son utilizados ampliamente en el desarrollo de LFIA multiplex pues sus propiedades simplifican drásticamente la realización del análisis multiplex. El uso de diferentes tamaños ofrecen la posibilidad de excitarlos a una sola longitud de onda y, debido a su pico estrecho de emisión, la señal de emisión procedentes de los diferentes tamaños puede analizarse de forma simultánea sin solapamiento espectral [261].

A pesar de las ventajas que muestran estas marcas de detección, también presentan ciertas limitaciones como son la inestabilidad química y coloidal en entornos biológicos, lo que puede conducir a un análisis cuantitativo inexacto. Con el objetivo de solventar este problema algunos grupos han explorado e investigado estrategias de

dopaje y **encapsulación de puntos cuánticos en nanobolas** para mejorar la estabilidad química y coloidal, y además amplificar la señal detectable aumentando el número de marcas de detección por analito [262–264].

Otra estrategia utilizada para detectar los test positivos y negativos en las LFSs se basa en la amortiguación (*quenching*) de la fluorescencia. Este principio de detección se basa en la inmunoreacción entre un anticuerpo marcado con un reactivo que provoca la disminución de la fluorescencia del analito de interés, que se ha unido a un material fluorescente (inmovilizado en la línea de test). Este tipo de ensayos se desarrollan generalmente para formatos competitivos, y para analitos de bajo peso molecular. Para un blanco, todo el material de *quenching* unido al anticuerpo se unirá a la línea de test donde se encuentra el material fluorescente provocando la extinción de la señal fluorescente. En el caso de las muestras, cuando aumenta la cantidad de muestra se reduce el material de *quenching* de fluorescencia unido a la línea de test, y se recupera la señal de fluorescencia siendo esta proporcional a la concentración de analito [265]. La fluorescencia de la línea de control se mantiene constante. En el caso de usarse para un formato sándwich, el anticuerpo de captura tiene que inmovilizarse junto con un material fluorescente en la línea de test [266]. Las nanopartículas de oro tienen una capacidad de *quenching* excepcional, por este motivo es el material más utilizado en este tipo de ensayos [267]. La plata es otro material empleado para la extinción de la fluorescencia en LFSs [268,269]. Las ventajas de los ensayos que usan esta tecnología son una baja señal de fondo, una alta sensibilidad y la capacidad de usar diferentes elementos de bioreconocimiento.

Las **nanopartículas de fósforo de conversión ascendente (FCA)** (conocidas como *up-converting phosphor nanoparticles* en inglés) son un tipo de lantánido que contiene partículas cerámicas de tamaño submicrométrico, de forma que su composición y estructuras especiales les confieren unas características ópticas excelentes. Este tipo de nanopartículas pueden emitir luz visible o ultravioleta de alta energía cuando son excitadas por luz infrarroja de baja energía. Las nanopartículas de FCA han atraído recientemente una atención considerable porque presentan una estabilidad química alta, un ancho de banda estrecho, colores de emisión ajustables, alta fotoestabilidad y baja citotoxicidad [270]. Además, presentan una vida útil de fluorescencia larga (hasta una magnitud de milisegundos) permitiendo de este modo disminuir la autofluorescencia de fondo para así mejorar la relación señal/ruido, y por tanto disminuir los límites de detección en uno o dos órdenes de magnitud [271]. Una de las desventajas que presentan este tipo de marcas de detección es la dificultad para su síntesis y funcionalización. El primer LFIA que uso esta marca de detección fue

desarrollado en el año 2000 [272], a partir de este momento el uso de estas ha aumentado exponencialmente en diferentes campos de aplicación [273].

Otra alternativa de material fluorescente utilizada como marca de detección en LFIA son los **quelatos de lantánidos** como son: Eu (III), Tb (III), Sm (III) y Dy (III). El principio de estos LFIA se basa en la reacción fluorogénica. Este tipo de quelatos ha sido empleado en las LFSs con el objetivo de aumentar el límite de detección pues estos compuestos eliminan el fondo de fluorescencia lo que permite aumentar la sensibilidad. En comparación con las marcas de detección fluorescentes convencionales y los puntos cuánticos, los quelatos de lantánidos poseen atractivas características, tales como larga vida de fluorescencia, espectros de emisión estrechos, grandes cambios de Stokes y altas fotoestabilidades [274]. Todas estas características hacen posible el desarrollo de LFIA con sensibilidad y precisión altas [275,276].

### ***A.3.1.5.3 Marcas de detección magnéticas***

Este tipo de marcas de detección son parte esencial de esta tesis, por lo que se tratarán en detalle en la sección “Inmunoensayos magnéticos de flujo lateral”.

### ***A.3.1.5.4 Otras marcas de detección***

Las **enzimas** también se emplean como marca de detección en LFIA. En los casos en los que se usan enzimas, la detección se basa en reacciones enzima-sustrato para el desarrollo de color. En esta reacción el sustrato producirá color en las líneas de test y control el cual puede detectarse a simple vista, con estándares de colores o con la utilización de lectores. Generalmente se usan anticuerpos marcados con enzimas naturales, entre las que destacada la peroxidasa de rábano (conocida como HRP por sus siglas en inglés, *horseradish peroxidase*), para generar la reacción enzimática [277]. En la actualidad se están sustituyendo las enzimas naturales por nanomateriales con actividad enzimática (denominadas nanoenzimas), como pueden ser nanopartículas de platino [278], óxido de cerio o óxido de hierro, para su uso como marca de detección en las LFSs [279]. Las enzimas artificiales tienen ciertas ventajas frente a las naturales, siendo la más relevante, su gran estabilidad en un amplio rango de temperaturas y pH [280]. Por ejemplo, esta estrategia se ha utilizado para el desarrollo de una LFS para la detección del virus del *Ébola* empleando óxido de hierro como enzima artificial [281].

Los **liposomas** son vesículas artificiales en forma de esfera formados por una o más bicapas de fosfolípidos. Debido a su tamaño y carácter hidrofóbico e hidrofílico, además de su biocompatibilidad, han sido utilizados ampliamente en la liberación de drogas pues tienen una gran capacidad para encapsular compuestos, tanto hidrofóbicos

como hidrofílicos. Las propiedades de los liposomas difieren considerablemente según su composición lipídica, carga superficial, tamaño y método de preparación. Estas vesículas artificiales son muy estables y su gran volumen facilita la interacción con elementos de reconocimiento, como pueden ser anticuerpos o ácido nucleicos. Estas propiedades los hacen útiles para ser utilizados como marca de detección en LFIA. Además, su capacidad para encapsular altas cantidades de compuesto, como por ejemplo colorantes o compuestos fluorescentes, les permite que sean utilizadas como elemento de amplificación. Las principales limitaciones de los liposomas como marca de detección son su inestabilidad frente a detergentes y cambios de pH. En los últimos años, diferentes LFIA basados en liposomas han sido desarrollados en los cuales se han alcanzado buenos límites de detección gracias a su poder de encapsulación [174,282,283].

### **A.3.1.6 Estrategias de mejora para los LFIA**

Una vez explicados todos los componentes de la tira, tanto los materiales que constituyen la tira como los reactivos que se usan para hacer el inmunoensayo en sí, se van a explicar ciertos aspectos que se deben controlar y tener en cuenta para desarrollar LFIA más sensibles y efectivos en el campo de aplicación requerido. Esto se pueden conseguir controlando diferentes parámetros que intervienen en la tira, entre los que se encuentran los propios materiales que se utilizan. A continuación, se van a enumerar algunas de estas estrategias de mejora:

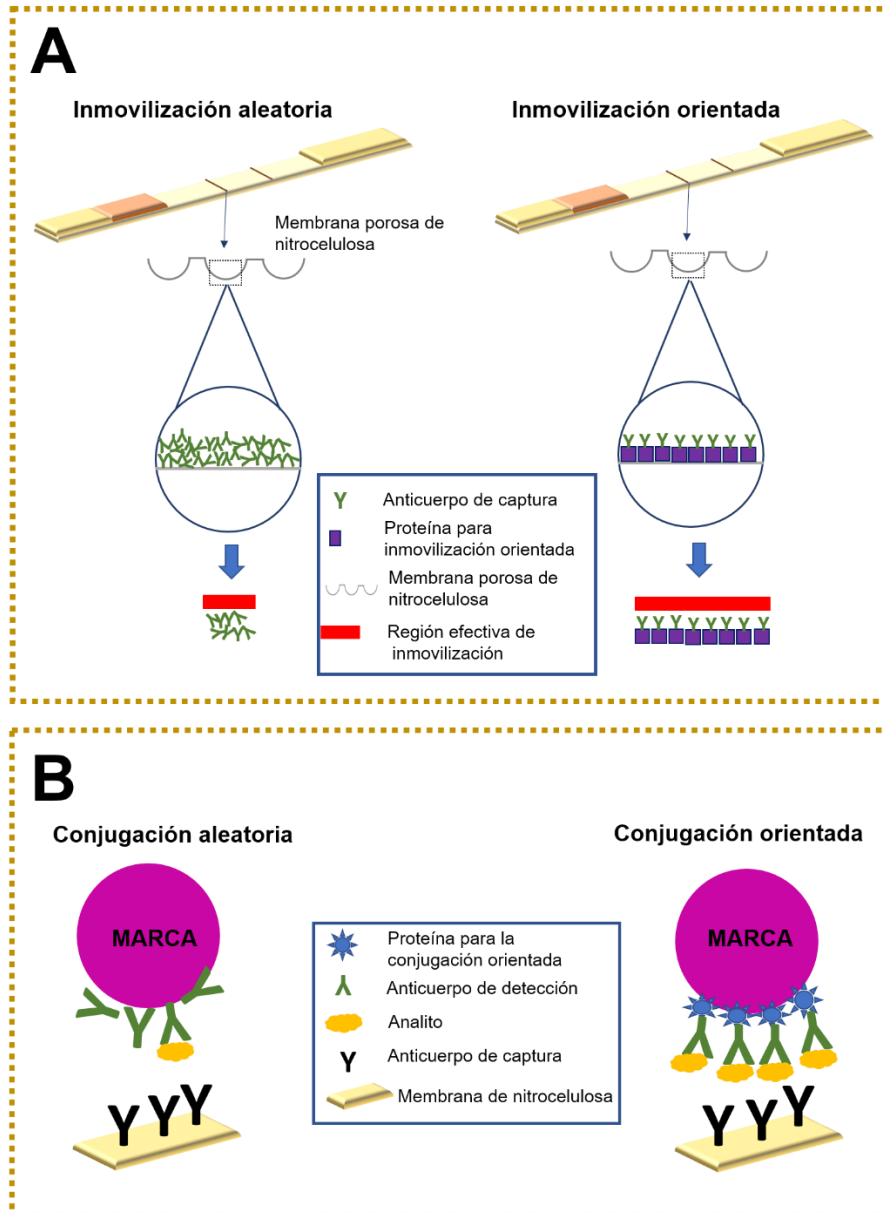
#### *Anticuerpos*

Los anticuerpos, o los elementos de bio-reconocimiento en general, son un aspecto imprescindible que se debe controlar, y con ellos diferentes parámetros relacionados con los mismo.

- Tanto los anticuerpos de detección (conjugados a la marca de detección) como los anticuerpos de captura (inmovilizados en la nitrocelulosa) suelen inmovilizarse de forma aleatoria. Los anticuerpos de captura se dispersan o imprimen en la membrana. Y en el caso de los anticuerpos de detección, se unen a la marca de detección por adsorción pasiva o enlace covalente. Generalmente, en ninguno de los casos se realiza una inmovilización orientada para dejar totalmente disponible la zona de unión del anticuerpo con el antígeno. La conjugación e inmovilización aleatoria pueden reducir el rendimiento de los anticuerpos. Por lo tanto, la búsqueda de estrategias para llevar a cabo una inmovilización orientada puede mejorar la sensibilidad del ensayo. La reducción de puentes disulfuro en la región



*hinge* del anticuerpo para establecer un enlace Au-S o la oxidación de las colas de los carbohidratos en la región Fc para obtener grupos aldehídos son las orientaciones más comunes. Sin embargo, el pretratamiento de anticuerpos reduce la actividad de unión al antígeno. Recientemente se han utilizado proteínas para facilitar la inmovilización y conjugación de los anticuerpos por la región Fc (Figura 18), dejando así la zona de unión al antígeno libre de obstáculos lo que permite mejorar el límite de detección debido al aumento de la región efectiva [284,285]. El uso de este tipo de estrategias puede reducir la cantidad de anticuerpo necesario, tanto de captura (Figura 18A) como de detección (Figura 18B), lo cual es interesante desde un punto de vista económico y de comercialización.



**Figura 18.** Estrategias de mejora para los LFIA. **(A)** Inmovilización aleatoria vs Inmovilización orientada de los anticuerpos de captura en la membrana de nitrocelulosa. **(B)** Inmovilización aleatoria vs Inmovilización orientada de los anticuerpos de detección en la superficie de la marca.

- La cantidad de anticuerpo de captura inmovilizado en la línea de test es otro parámetro que se debe optimizar. Una concentración muy elevada de anticuerpos en la línea de test puede causar adsorción inespecífica de los conjugados, dando lugar a una señal de fondo alta. Además, también pueden aumentar los impedimentos estéricos, disminuyendo de este modo las eficiencia de las inmunoreacciones [286].

- La cantidad de conjugado (marca de detección-elemento de reconocimiento) inmovilizada en la almohadilla de conjugado también puede afectar a la señal de las líneas de test y control [286].
- La calidad y afinidad de los anticuerpos puede afectar a la consecuente calidad de los LFIAs.
- La cantidad de anticuerpo utilizada para conjugar las marcas de detección es otro parámetro que es importante estudiar, porque erróneamente se tiende a pensar que la concentración de anticuerpo inmovilizado en la superficie de la marca de detección es directamente proporcional a la señal en la línea de test [287]. Cuando aumenta el número de antígenos (determinado por el número de anticuerpos) por nanopartículas, la relación señal/antígenos disminuye, por lo tanto, disminuye la sensibilidad. Por este motivo, es importante ajustar la cantidad de anticuerpo de detección, intentando tener todas las nanopartículas recubiertas con moléculas de anticuerpo, pero evitando el exceso. De forma análoga ocurriría lo mismo si se utiliza otro elemento de reconocimiento diferente a los anticuerpos.

### *Nanopartículas/marca de detección*

La nanopartícula seleccionada para ser utilizada como marca de detección en LFIAs también influye en la sensibilidad del ensayo. A la hora de seleccionar la marca de detección se debe tener en cuenta que su unión con el elemento de reconocimiento no debe cambiar la función de reconocimiento de este por el analito. Además, el conjugado tiene que ser estable.

El tamaño de la nanopartícula es otro parámetro que se debe optimizar teniendo en cuenta el tamaño de poro de la membrana de nitrocelulosa pues afecta a la sensibilidad y tiempo de detección del ensayo. Un tamaño demasiado grande puede dificultar el flujo; sin embargo, un tamaño muy pequeño de partícula puede disminuir la sensibilidad del ensayo, pues disminuye el tiempo de reacción entre el conjugado “nanopartícula-elemento de reconocimiento-analito” y anticuerpo de captura, ya que conjugado fluye a mayor velocidad cuanto más pequeño sea el tamaño de la nanopartícula. Un ejemplo es el estudio que realizan Lu *et al.* [288] en el cual evalúan tres tamaños de MNPs (15, 80 y 200 nm) para realizar LFIAs. Los autores llegan a la conclusión de que el tamaño óptimo es el de 80 nm, sin embargo, para las nanopartículas de 200 nm se observó una aglomeración entre la almohadilla de conjugado y la nitrocelulosa, probablemente porque el tamaño de las nanopartículas era demasiado grande para migrar a través de la membrana de nitrocelulosa. En los casos en los que se usó nanopartículas de 15 nm, no se observó línea de test en las muestras

positivas porque la velocidad capilar era demasiado rápida y no había tiempo suficiente para la reacción de unión antígeno-anticuerpo. Wang *et al.* [289] también demuestra la correlación entre el tamaño de las nanopartículas utilizadas y el tiempo de detección, encontrando que el tiempo de detección es directamente proporcional al diámetro de la nanopartícula. Las MNPs más grandes tienen una velocidad de flujo más baja pues sufren una resistencia más fuerte y por este motivo requieren más tiempo de detección, aunque favorecen la unión antígeno-anticuerpo. Hay que tener en cuenta también que las propiedades de detección pueden variar con el tamaño de las nanopartículas. Se demostró que el tamaño de las nanopartículas de oro está relacionado con la sensibilidad del ensayo concluyendo que las nanopartículas de aproximadamente 40 nm son las óptimas [290].

### *Membrana*

Como ya se ha explicado previamente la relación entre el tamaño de poro de la membrana (o el tiempo de migración) y el tamaño de las marcas de detección es un parámetro esencial para determinar la sensibilidad del ensayo [286]. Además, también se pueden encontrar diferencias entre membranas de diferentes fabricantes debido a los tratamientos a los que se somete el material. Por este motivo es importante hacer un estudio con diferentes membranas para conocer cuál es la óptima [168,291,292].

### *Almohadilla absorbente*

La almohadilla absorbente es el material que facilita el flujo por capilaridad, se puede decir que actúa como una “esponja”. Existen en el mercado almohadillas absorbentes con diferentes capacidades para absorber la muestra líquida, de forma que con el uso de este material también se puede controlar la velocidad de flujo. Las almohadillas que absorben más cantidad de líquido tienden a aumentar la velocidad de flujo, por lo tanto, pueden disminuir la sensibilidad. Por este motivo también es imprescindible la optimización del tipo de almohadilla absorbente que se debe usar.

### *Buffer*

El buffer es el líquido, compuesto por diferentes reactivos, en el que se disuelve la muestra para facilitar su flujo. La composición de este buffer puede influir en la velocidad de flujo, y por este motivo cada tipo de ensayo requiere la optimización del buffer pues, por ejemplo, los diferentes analitos y marcas de detección no se comportan de igual forma debido a su diferente naturaleza química. Esta disolución tiene que contribuir a minimizar las adsorciones inespecíficas, mantener un pH adecuado para el reconocimiento molecular, y a aumentar la sensibilidad y la reproducibilidad en los LFAs [286].

### *Muestra*

Las características de la muestra pueden contribuir al rendimiento del LFIA debido a los efectos de matriz [164]. Las muestras en estado sólido necesitan pretratamiento para la extracción de los analitos. En el caso de las muestras menos complejas como son las muestras líquidas (por ejemplo, zumo, leche o agua) una simple dilución con buffer puede ser suficiente para eliminar los efectos de matriz. Para las muestras con concentraciones muy bajas de analito puede ser necesario la preconcentración o enriquecimiento del analito, lo que es una desventaja para los dispositivos POCT.

### *Estructura de la tira*

Un parámetro clave que afecta a la sensibilidad y el límite de detección es la velocidad de flujo. Por este motivo en los últimos años se han desarrollado estrategias que sean capaces de controlar esta velocidad. Estas estrategias pueden englobarse en dos grandes grupos: modificaciones en la arquitectura de la tira o adición de sustancias para la disminución de la velocidad de flujo:

#### *Arquitectura de la tira*

- Parolo *et al.* [293] han demostrado que cambios en la arquitectura de los diferentes componentes que conforman la LFS pueden mejorar la sensibilidad de los LFIA. Con este estudio demuestran que un aumento de la almohadilla de muestra y de conjugado y una disminución de la sección de la membrana pueden contribuir a la mejora de la sensibilidad de los LFIA.
- Otra estrategia existente se basa en el uso de una técnica (laser direct-write) para dispensar un fotopolímero líquido en regiones específicas de la membrana para su posterior fotopolimerización. De esta forma se crean paredes impermeables dentro de la membrana dando lugar a la fabricación de canales fluidicos que reducen la sección transversal de flujo lo que provoca una disminución de la velocidad de flujo y del área de detección. Se demostró una mejora significativa de la sensibilidad y del límite de detección para la detección de proteína-C reactiva (PCR\*) en comparación con los diseños convencionales [294]. Otra alternativa es el uso de membranas con forma cónica para de esta forma producir un aumento en el gradiente de la concentración del conjugado nanopartícula-antígeno, y así aumentar la intensidad del color. El ángulo es optimizado para lograr un alto nivel de sensibilidad analítica [295].

#### *Adición de sustancias o materiales*

- Se ha llevado a cabo un estudio para disminuir la velocidad de flujo, que consiste en la inserción de una esponja de derivación situada entre la membrana y la almohadilla de conjugado. La esponja está fabricada de un material de poliuretano. Su espesor, longitud e hidrofobicidad fueron los parámetros que se estudiaron para optimizar el ensayo. Gracias al uso de esta estrategia se mejoró la señal en un orden de magnitud en los LFIA para la detección del virus de la hepatitis B [296].
- Otra alternativa a esta estrategia es el uso de una fibra de vidrio impregnada en agarosa, situada antes de la membrana, para controlar la velocidad de flujo, y de esta forma optimizar las interacciones con las biomoléculas [297]. El porcentaje de agarosa es optimizado obteniéndose los mejores resultados con un 3%. Con la adición de este material es posible mejorar la detección del virus del dengue hasta 10 veces.
- Por otro lado, la adición de nanofibras de policaprolactona electrohiladas directamente sobre la membrana de nitrocelulosa mejora la sensibilidad del inmunoensayo porque las fibras cambian la hidrofobicidad de la membrana reduciendo la velocidad de flujo lo que mejora la interacción de las moléculas, que consecuentemente mejora la intensidad de la señal [298].

### **A.3.1.7 Sistemas y dispositivos de detección de LFIA**

Como ya se ha mencionado a lo largo de esta memoria los LFIA requieren de lectores o sensores para la obtención de una medida cuantitativa, ya que esta técnica de papel por si misma solo puede proporcionar una medida cualitativa (positivo/negativo) o semicuantitativa si se compara con patrones de colores los cuales pueden proporcionar una estimación de la concentración.

La detección cuantitativa se clasifica en función de la marca de detección utilizada para el desarrollo del inmunoensayo pues es el componente que determina la señal que posteriormente se tiene que detectar para obtener una señal cuantitativa. Los sistemas y/o dispositivos de detección más utilizados se pueden clasificar en: **ópticos (colorimétricos y fluorescentes), magnéticos y electroquímicos**, atendiendo a su principio de detección. El uso de dispositivos para cuantificar los LFIA no deben comprometer la simplicidad y el bajo coste de esta técnica. En los últimos años su demanda ha aumentado con el objetivo de mejorar la sensibilidad, eliminar la interpretación subjetiva que a menuda conduce a resultados falsos negativos y falsos positivos, y principalmente, dotar a esta técnica POCT de una capacidad cuantitativa que permita obtener datos de concentración del analito que se requiera analizar.

Los dispositivos, además, pueden clasificarse atendiendo a su aspecto (forma, tamaño y conformación de los elementos que lo integran) en tres categorías que se resumen en la Tabla 3 con sus correspondientes ventajas y desventajas [299].

**Tabla 3.** Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de dispositivos utilizados para la detección cuantitativa de los inmunoensayos de flujo lateral. En este caso se clasifican atendiendo a su forma, tamaño y conformación de los elementos que los integran.

<b>Tipo de dispositivo</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Dispositivos de sobremesa</b>	Precisión y sensibilidad, siendo los colorimétricos los más rápidos.	No son portátiles. Generalmente requieren control computerizado).
<b>Dispositivos portátiles</b>	Portabilidad y facilidad de manejo.	Limitada duración de la batería y almacenamiento de datos. Vulnerabilidad a las interferencias externas.
<b>Dispositivos y aplicaciones móviles</b>	Sistema operativo rápido e inteligente. Capacidad expandible. Coste efectivo. No es necesaria una fuente de alimentación externa	Limitada duración de la batería. Necesidad de accesorio externo y software. Los accesorios no son universales. Precisión media.

### **A.3.1.7.1    *Sistemas y dispositivos de detección ópticos***

Los dispositivos colorimétricos son los más comunes y explorados en la bibliografía debido, en gran medida, a que las nanopartículas de oro y látex son las más utilizadas y exploradas, tanto en investigación como desde un punto de vista comercial. Además, existen un gran número de lectores comerciales, tanto colorimétricos como fluorescentes.

Los sistemas de detección pueden clasificarse en: sistemas de imagen basados en dispositivos de carga acoplada o sistemas de escaneo, según la forma en la que operan [300]. Los **sistemas de imagen basados en dispositivos de carga acoplada** ofrecen la ventaja de proporcionar la imagen de toda la LFS de forma similar a cómo los usuarios las detectan a simple vista. Con el uso de este sistema y la ayuda de softwares es posible distinguir las partes de las líneas de test y control “malas” y poder excluirlas. Sin embargo, esta exclusión es cuestionable porque es indicativa de que las partes seleccionada de las líneas de test y control (“partes buenas”) no son representativas de toda la tira. Lo estrictamente correcto sería catalogar a estas tiras como invalidas, y, por lo tanto, no deberían ser analizadas con este sistema. Otros parámetros que deben tenerse en cuenta a la hora de hacer uso de estos dispositivos son la iluminación y los efectos de la lente, porque una iluminación no uniforme puede distorsionar hasta la línea

más homogénea. Los parámetros mencionados previamente son especialmente determinantes para la detección fluorescente. Una ventaja de este tipo de sistema es que no cuenta con partes móviles lo que evita imprecisiones en la lectura de imágenes, pero son grandes, pesados y caros. Debido a estas características, los dispositivos contruidos con este sistema son incompatibles con dispositivos portátiles o de mano, por lo tanto, en este caso, se clasificarían como dispositivos de mesa de grandes dimensiones.

Como alternativa a los sistemas descritos previamente, se han diseñado dispositivos con **sistema de escaneo** los cuales cuentan con la ventaja de tiempos de escaneo rápidos y, además, integran la evaluación de datos. El tamaño de la memoria puede ser mucho más pequeño que en el caso de los otros sistemas, pero, se pueden almacenar los datos directamente en la memoria del dispositivo sin la necesidad de usar la conexión externa a un ordenador. Este sistema, debido a sus características, es compatible con el desarrollo de dispositivos de campo los cuales son realmente portátiles. Además, su mayor simplicidad también se ve reflejada en el coste si se compara con los sistemas de imagen basados en dispositivos de carga acoplada. Por otra parte, el usuario también tiene la opción de conectar el dispositivo a un ordenador externo para obtener un mayor almacenamiento y análisis de los datos. La principal desventaja de este tipo de sistemas es que no se obtiene una imagen de la tira completa como los usuarios están acostumbrados a obtener con sus lecturas visuales. A través del software, el cual realiza la interpretación de los datos, el dispositivo puede obtener el resultado cualitativo (positivo/negativo o invalido) o cuantitativo (número con unidades) de la LFS sin la necesidad de procesar la imagen.

A la hora de desarrollar los sistemas y dispositivos de detección hay ciertos factores que son necesario tener en cuenta con el objetivo de obtener resultados cuantitativos precisos y sensibles. Algunos de los factores más significativos que comprometen estas características analíticas son:

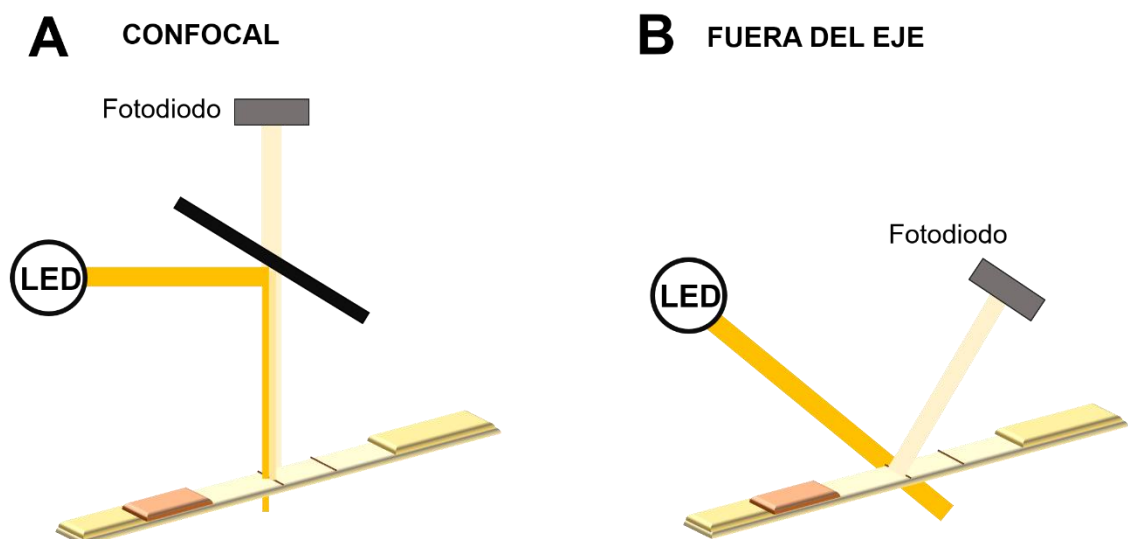
- La iluminación correcta de la muestra, la cual debe de ser homogénea.
- La intensidad de la iluminación es un parámetro crítico para obtener una buena sensibilidad, y para ello se requiere una gran potencia de luz.
- La apertura numérica, que se define como la distancia del detector a la muestra, influye también significativamente en la sensibilidad. De forma que cuanto más cerca este el detector de la muestra iluminada, más fotones se pueden capturar, por lo tanto, es importante colocar el detector cerca de la muestra para obtener sistemas más sensibles. Este parámetro es difícil de modificar en sistemas que necesitan iluminar toda la tira, como es el caso de



los sistemas de imagen basados en dispositivos de carga acoplada, ya que si la cámara se coloca muy cerca de la muestra no se puede ver toda la tira y las imágenes en los bordes se distorsionan debido a los amplios ángulos (cuanto más ancho es el ángulo más grande son los efectos de distorsión de la lente). En contraposición, un sistema de escaneo puede situarse muy cerca de la muestra, dado que en este sistema no se necesita ver toda la tira.

- La forma de la curva de calibración, obtenida por el sistema, que determina la concentración de analito, también condiciona la forma de extraer los resultados. Generalmente, la curva de respuesta de los inmunoensayos tiene forma de S y en las secciones asintóticas de esta no es posible determinar la concentración del analito de forma directa pues apenas existe pendiente.

Las configuraciones de medida pueden dividirse, principalmente, en: medida confocal y medida fuera de eje (Figura 19). Como ya se ha mencionado previamente, la apertura numérica es uno de los factores más importantes que determinan la sensibilidad del dispositivo. Este factor es particularmente crítico para la configuración de medida fuera del eje (Figura 19B) pues un cambio en la distancia entre el detector y la tira puede resultar en una pérdida total de la señal, ya que este cambio se traduce en que el detector este enfocando a un lugar que no esté iluminado, es decir, donde no se encuentra la línea de test y control. Una posible solución a este problema es el uso de una configuración de medida confocal (Figura 19A), la cual no se ve afectada por esta distancia.



**Figura 19.** Configuraciones de medida en los dispositivos de detección ópticos: (A) confocal y (B) fuera del eje.

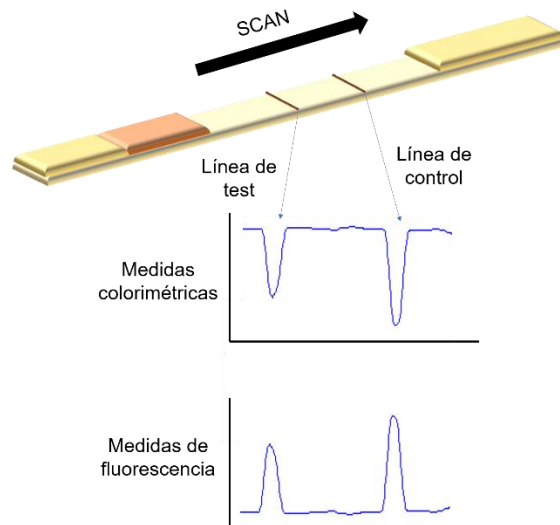
Con la recopilación de todos los contenidos explicados en este apartado, se llega a la conclusión de que los sistemas de escaneo son los más idóneos debido a sus características (posibilidad de miniaturizar), y además la configuración de medida confocal ofrece mayores ventajas frente a la otra configuración existente. Por esta razón, a continuación, se va a explicar los principios de diseño de los dispositivos de escaneo confocal que pueden dividirse en medidas de reflectancia o fluorescencia.

### *Principios de diseño de los dispositivos de escaneo confocal*

Los dispositivos de escaneo colorimétricos realizan el escaneo moviendo la tira sobre la fuente de luz o viceversa. El instrumento es ajustado de forma que la luz reflejada desde la membrana de la tira pueda ser recibida y registrada por un detector confocal como una señal alta. Cuando el haz de luz (diodo emisor de luz, LED) pasa por la línea de test o de control, la luz reflejada disminuye porque las nanopartículas de oro coloidal (u otro tipo de nanopartículas) localizadas en las líneas absorben luz a esa longitud de onda. Esta reducción en la intensidad de la luz se muestra como una banda negativa (Figura 20) El oro coloidal más usual en LFSs tiene un tamaño de 40 nm que tiene una absorción máxima a 540 nm. La absorción y el reflejo de la luz son proporcional a la densidad de partículas de oro en la línea. Por lo tanto, de este modo es posible hacer una cuantificación colorimétrica de las nanopartículas de oro u otras marcas de detección que nos proporciona de forma indirecta una cuantificación del analito a través la curva de calibrado. Es preciso aclarar, que en este tipo de sistemas las medidas descritas no son medidas de absorción ya que la fuente de luz y el detector están dispuestos en un ángulo de 0° (disposición confocal), y no en una configuración de 180°. Por este motivo se realizan medidas de reflectancia (luz reflejada).

Para realizar las medidas de fluorescencia se utiliza el mismo proceso de escaneo que en el caso de las medidas de reflectancia. La única diferencia es que el dispositivo contiene un sensor de fluorescencia, en lugar de reflectancia. El sensor se mueve a través de la tira y excita las líneas de control y test que, en este caso, contienen marcas de detección fluorescentes. La luz fluorescente de ambas líneas es registrada, a través de la configuración confocal, como un aumento de la señal a una determinada longitud de onda en el sensor, y por lo tanto es este caso se obtienen picos positivos (Figura 20). El uso de marcas de detección fluorescentes que emiten a longitudes de onda visible o infrarrojas [301], como pueden ser compuestos orgánicos de bajo peso molecular, puntos cuánticos o partículas de látex fluorescentes, puede ofrecer la ventaja de obtener LFIA más sensibles en comparación con el oro coloidal, como ya se ha explicado en esta memoria previamente [302,303]. Uno de los inconvenientes de este tipo de marcas de detección, es el hecho de que cada tipo de marca tiene que ser excitadas a una

determinada longitud de onda, y en consecuencia emiten también a una longitud de onda determinada, por lo tanto, los dispositivos de detección empleados, en este caso, deben estar dotados de esta configuración.



**Figura 20.** Dispositivos de escaneo confocal para la obtención de medidas ópticas (reflectancia y fluorescencia).

En el mercado existen un gran número de dispositivos ópticos que permiten la interpretación de los resultados de las LFSs de una forma automática, mejorando de esta forma la objetividad de la medida pues el usuario no es el encargado de tomar una decisión sobre la evaluación de los resultados [230]. Algunos de estos dispositivos solo proporcionan una medida cualitativa tras su análisis (como por ejemplo BD Veritor System o Biohit Quick Test Reader (QTR)), es decir, nos proporcionan una respuesta: “no visible” o “visible”. Sin embargo, en la mayoría de los casos es posible obtener un análisis cuantitativo del analito a través de sensores de reflectancia o fluorescencia, como ya se ha explicado anteriormente. Los dispositivos colorimétricos son mucho más comunes que los fluorescentes, aunque en algunos casos es posible encontrar dispositivos que contienen los dos modos de lectura, como por ejemplo AXXIN AX-2X, Immunochromato-Reader C11787, opTrilyzer®Med Fluo, ESEQuant LFR o RAMP®Reader. La mayoría de los detectores comerciales solo permiten usar el dispositivo con los LFIs del mismo fabricante. En este caso es necesario que las LFSs sean reconocidas a través de códigos de barras u otras herramientas de etiquetado para obtener el resultado del análisis. Esta restricción limita sustancialmente el uso de este tipo de equipos. Sin embargo, también existen dispositivos de “tipo abierto” que pueden combinarse con LFIs de diferentes fabricantes, que solo necesitan una configuración y calibración adicional para obtener información cuantitativa útil. AXXIN AX-2X (Axxin, Australia), Digital Strip Reader (Bio AMD, United Kingdom), ESE-Quant LFR (Qiagen,

Germany), Immunochromato-Reader (Hamamatsu, Japan), Lateral Flow Tester LFT 100, FS-Scanner (Maxwell Sensors, United States), opTrilyzer®Med (Optricon, Germany), Scannex readers (Scannex AS, Norway), Kinbio DL2032 (Shanghai Kinbio Tech, China), and Reflecom Multitest (Synteco, Russia) son algunos ejemplos de detectores de “tipo abierto”.

Este tipo dispositivos son una herramienta muy útil para laboratorios de diagnóstico en diferentes campos de aplicación, incluso para ensayos de campo, debido a su precio asequible, su simplicidad a la hora de manipularlo y la rapidez con la que obtienen los resultados. De forma simultánea, como alternativa a estos dispositivos especializados, en los últimos años, se está utilizando la tecnología inteligente [304,305]. Los smartphones son los dispositivos inteligentes más empleados en el análisis de LFSs debido a la gran atención que han captado debido a: su unidad central de procesamiento avanzada, la interacción intuitiva que tiene el hombre para su uso, su fácil manejo, su disponibilidad y los componentes que contienen para el desarrollo de sistemas de detección. La combinación del smartphone con adaptadores 3D, que permiten fijar la LFSs para facilitar la obtención de la imagen, ofrece la ventaja de obtener una alta resolución y sensibilidad para el análisis de LFSs. Estos adaptadores, en ocasiones, incluyen LED en combinación con carcasas [306,307], pero en otros casos usan la intensidad de la luz ambiental, la cual se ajusta con el brillo de la pantalla [308]. El segundo caso permite desarrollar accesorios universales para smartphone lo que permite una mayor versatilidad. Ambos modelos fueron testados para detectar analitos alcanzándose límites de detección prometedores. El desarrollo de dispositivos inteligentes para la detección de fluorescencia requiere siempre un accesorio externo que incluya una fuente de luz de excitación a una longitud de onda específica, lo que hace que los adaptadores para smartphone que detecten marcas de detección fluorescentes sean más complejos que los colorimétricos. A pesar de la complejidad que conllevan el desarrollo de plataformas portátiles fluorescentes para acoplarse a smartphone, en la bibliografía se pueden encontrar diversos ejemplos en los que se detectan diferentes analitos con unos buenos límites de detección [309–311].

Algunos fabricantes, incluso, ofrecen softwares especiales para el análisis de LFIA, los cuales pueden ser instalados en dispositivos para procesar imágenes y obtener análisis de LFIA cuantitativos. Algunos de estos softwares son especiales para Android, iOS y Windows para smartphone y tablets. Novarum™ Readers (novarumreader.com), SkanEasy (skannex.com) y Mobile Diagnostic Rapid Test Reader (mobileassay.com) son algunas empresas que ofrecen este tipo de tecnología la cual proporciona resultados cuantitativos sin la necesidad de ningún equipo adicional [230].

Los productos garantizan un alto nivel de seguridad de transmisión y almacenamiento de datos, y además las plataformas son fáciles de usar y permiten guardar los datos en varios dispositivos simultáneamente con la opción de almacenar los datos en una nube. Actualmente, los smartphones se usan para controlar otros dispositivos de lectura, lo que permite mantener el sistema portátil y realizar el análisis en el punto de atención. Ofrecen la posibilidad de procesar las imágenes con el propio smartphone y, posteriormente, enviar los resultados al destino requerido, o también se pueden transmitir las imágenes a un ordenador para realizar el análisis.

Cabe destacar, que las imágenes de las LFSs que se realizan a través de métodos tradicionales, como es el caso del smartphone, carecen, a menudo, de una reproducibilidad alta. Esta limitación se debe a la imposibilidad de coordinar las posiciones de la cámara y las LFSs para asegurar una iluminación constante y uniforme. Este problema se puede solventar con el uso de adaptadores 3D, como ya se indicó previamente [11]. Un enfoque alternativo a las imágenes digitales es el uso de escáneres de oficina cuyo escaneo permite obtener imágenes de alta resolución que pueden ser procesadas utilizando software que no necesariamente tienen que ser específicos para LFIA. Por ejemplo, una imagen, obtenida con un escáner, no difiere mucho del procesamiento de datos de electroforesis para el cual ya hay softwares desarrollados. CLIQS 1D (TotalLab, totallab.com), MAIIA Diagnostics (MAIIA AB, maiiadiagnostics.com) y Gel Analyzer 2010a (gelanalyzer.com) son los algunos de los softwares más usuales utilizados para este tipo de análisis. El uso de escáneres puede solventar algunos de los problemas que ofrecen los smartphones, pero limitan que el sistema sea realmente portátil [230].

Por último, otro ejemplo de tecnología inteligente que debe ser mencionado son las Gafas de Google que son capaces de detectar diversas LFSs de forma cualitativa y cuantitativa [312]. Estas gafas son capaces de identificar el código de respuesta rápida de la tira y controlar la cámara para capturar imágenes de la tira, para posteriormente transmitir la información a un servidor donde se procesan los datos, y finalmente se obtienen los resultados de cuantificación. Además, a través de un navegador de internet es posible acceder a la información sobre los análisis. Las gafas de Google permiten realizar la detección con manos libres proporcionan una plataforma de diagnóstico prometedora que ha sido demostrada para la detección cualitativa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y la detección cuantitativa de PSA.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizará un dispositivo comercial de escaneo de la casa comercial Qiagen (ESEQuant LFR) que tiene la opción de hacer análisis colorimétricos (medidas de reflectancia) y fluorescentes a una determinada

longitud de onda de excitación y emisión. En este caso solo se realizarán análisis colorimétricos, tanto de oro coloidal como de nanopartícula superparamagnéticas.

### **A.3.1.7.2 Sistemas y dispositivos de detección electroquímicos**

La electroquímica es una herramienta que tiene mucho éxito en el desarrollo de sensores biomédicos miniaturizados y descentralizados que proporcionan medidas altamente sensibles, como es el famoso ejemplo del glucómetro comercial [15]. La integración de métodos electroquímicos con LFSs permite la obtención de señales cuantitativas, obteniendo de este modo, medidas sensibles, selectivas y precisas, gracias al uso de la electroquímica, combinadas con las ventajas de simplicidad, fácil miniaturización y bajo coste que proporcionan los LFIA. La membrana de nitrocelulosa de una LFS es flexible, por lo que se puede combinar fácilmente con un electrodo para que se lleve a cabo una absorción continua del analito en el sistema. Los electrodos tienen que ser incorporados en los LFIA, y además es necesario utilizar una marca de detección electroactiva (compuestos electroquímicos activos o enzimas), es decir, que sean capaces de inducir reacciones electroquímicas para producir señales cuantificables por los electrodos. Zhu *et al.* [313] han desarrollado un método en el que acoplan electrodos con LFSs para la detección cuantitativa de un biomarcador del daño oxidativo del ADN alcanzado un límite de detección de 8.85 ng/ml en muestra reales de orina.

Los electrodos serigrafiados son una herramienta muy utilizada actualmente en electroquímica, pues se caracterizan por su salida lineal, un bajo requerimiento de energía, respuesta rápida, alta sensibilidad, capacidad para operar a temperatura ambiente, bajo coste de fabricación y posibilidad de fabricación en masa. La tecnología de serigrafiado implica la impresión de tinta (oro, grafito y plata) en soportes miniaturizados de cerámica o plástico. El tamaño de este tipo de electrodos es tan pequeño que reduce notablemente el consumo de reactivos y muestra, además su superficie plana permite la modificación de esta de una forma sencilla. Por lo tanto, debido a todas estas ventajas, la combinación de esta tecnología con los LFIA permite desarrollar biosensores con una estructura general más simplificada gracias a la reducción del tamaño y el coste. Lu *et al.* [314] hacen uso de esta tecnología combinada para el desarrollo de LFIA con detección electroquímica para la determinación de la hormona hCG. Los iones  $\text{Bi}^{3+}$  son usados como marca de detección electroactiva en el inmunoensayo, los cuales se cuantifican mediante la técnica electroquímica voltamperometría de redisolución anódica en un electrodo impreso serigrafiado de un

solo uso incorporado en la LFS. Otras marcas de detección electroactivas, como los puntos cuánticos [315] o las enzimas [316–318], se han explorado en este tipo de metodologías con el objetivo de mejorar las señales electroquímicas.

Por último, cabe destacar en el ámbito de la cuantificación electroquímica para LFIAs, el uso de glucómetros como sistema de cuantificación. El glucómetro es uno de los dispositivos POCT basado en detección electroquímica con mayor éxito, que ha sido comercializado y es utilizado diariamente por millones de pacientes con diabetes para controlar sus niveles de glucosa en sangre. Su éxito se debe a su tamaño compacto, bajo coste, fácil funcionamiento, y a la obtención de resultados cuantitativos fiables. En los últimos años, se han aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA) glucómetros habilitados para smartphone que permite la transmisión inalámbrica de recordatorios, resultados y análisis de datos a través de aplicaciones diseñadas para este tipo de dispositivos. Los glucómetros están diseñados únicamente para detectar glucosa, siendo esto una limitación a la hora de ampliar su uso como herramienta de detección electroquímica para su aplicación a la determinación de otro tipo de analitos. Por este motivo, muchos grupos de investigación han trabajado recientemente en el desarrollo de métodos que establezcan una relación directa entre la concentración del analito de interés y la glucosa detectada por el glucómetro, permitiendo, de este modo, detectar cuantitativamente analitos de interés a través del uso de glucómetros [319–322]. La mayoría de estos métodos implican varios pasos para llevar a cabo la reacción enzimática que se precisa (manipulación de mezclas de líquidos), para su posterior adición manual al dispositivo, lo cual dificulta su uso y manipulación. Sin embargo, el acoplamiento de una LFS al glucómetro evita los pasos de mezcla y adición manual de reactivos que involucran los métodos mencionados previamente. En esta dirección de trabajo, algunos grupos de investigación han desarrollado métodos que comprenden el uso de LFSs acopladas a glucómetros para la obtención de medias cuantitativas. Las estrategias utilizadas para establecer una relación directa entre la concentración del analito y la glucosa, determinada por el dispositivo, han sido diversas. La estrategia más explorada es el uso de la enzima invertasa que cataliza la conversión de sacarosa en fructosa y glucosa [323–326]. Zhao *et al.* [327] utiliza liposomas encapsulando glucosa como marca de detección en el inmunoensayo para establecer la relación entre el analito y la medida del glucómetro.

### ***A.3.1.7.3 Sistemas y dispositivos de detección magnéticos***

Dado que la detección magnética de MLFIAs es parte esencial de esta tesis, los sensores utilizados para la detección de marcas magnéticas se tratarán en detalle en el siguiente apartado.

### ***A.3.1.7.4 Espectroscopia Raman sobre superficies metálicas nanoestructuradas (SERS)***

La espectroscopia Raman sobre superficies metálicas nanoestructuradas (SERS) es una técnica analítica ultrasensible que permite la detección de analitos en concentraciones muy bajas. El uso de esta técnica en combinación con los LFIAs permite superar las dos limitaciones más significativas de las LFSs: la baja sensibilidad y la falta de medidas cuantitativa. Para este tipo de técnica se utilizan nanopartículas de oro, plata o core@shell Au@Ag. El principal inconveniente de la técnica SERS es el tiempo que requiere la obtención de la medida cuantitativa, así como la necesidad de equipos especializados y personal cualificado. En los últimos años se están comercializando instrumentos miniturizados, pero todavía tienen un alto coste. Sin embargo, los límites de detección obtenidos son prometedores, ofreciendo una técnica ultrasensible con la que se ha demostrado que se puede llegar a detectar concentraciones del orden del picogramo/mL en combinación con LFSs [328–330]. Además la combinación LFIAs-SERS permite el desarrollo de inmunoensayos multiplex [331,332].





## **A.4 INMUNOENSAYOS MAGNÉTICOS DE FLUJO LATERAL**

---



## **A.4.1 Nanopartículas superparamagnéticas como marca de detección en los LFIA**

### **A.4.1.1 Ventajas que aporta el magnetismo a las marcas de detección en los LFIA**

Los MLFIAs son aquellos que utilizan MNPs como marca de detección o para la inmuno-separación del analito de interés.

El uso de MNPs como marca de detección en los LFIA proporciona varias ventajas: por una parte, las MNPs producen una perturbación magnética en su entorno que habilita su detección cuantitativa; por otra, las MNPs pueden utilizarse para inmuno-separar selectivamente el analito de su matriz; finalmente, las MNPs pueden usarse para colocar los anticuerpos primarios en las líneas de test y control mediante campos magnéticos.

La cuantificación de partículas magnéticas puede hacerse a través de la detección de las líneas de campo magnético que crean en su entorno al ser excitadas magnéticamente. Este tipo de detección puede realizarse con sensores magnéticos adaptados al formato LFIA y al tipo concreto de marca de detección magnética utilizada. En general, la detección magnética presenta varias ventajas respecto a la detección visual u óptica. Las muestras biológicas no contienen sustancias magnéticas, lo cual evita las interferencias. A diferencia de la detección óptica, la magnética no se ve afectada por el envejecimiento, oscurecimiento o manchado de la membrana, lo que la hace particularmente apta para muestras con matrices complejas [289]. El calibrado magnético es independiente de factores ambientales, lo que facilita la interpretación de los resultados. Las características magnéticas de las MNPs en LFIA son muy estables en el tiempo, lo que permite su almacenamiento y posterior evaluación. Es bien sabido que la magnética es una interacción a distancia, por lo que no es necesario el contacto mecánico ni visual; los sensores magnéticos tienen la capacidad de cuantificar MNPs en todo el grosor de la membrana de nitrocelulosa (sobre unos 100  $\mu\text{m}$  de profundidad), al contrario de lo que ocurre con los ópticos que únicamente obtienen la señal de la superficie de la membrana[333], unos 10  $\mu\text{m}$  de profundidad, es decir, solo el 10% de la señal, lo que disminuye notablemente la sensibilidad del ensayo. Además, las MNPs pueden ser también una marca de detección visual detectable de color marrón oscuro gracias a que el rango del coeficiente de absorción molar de las nanopartículas de óxido

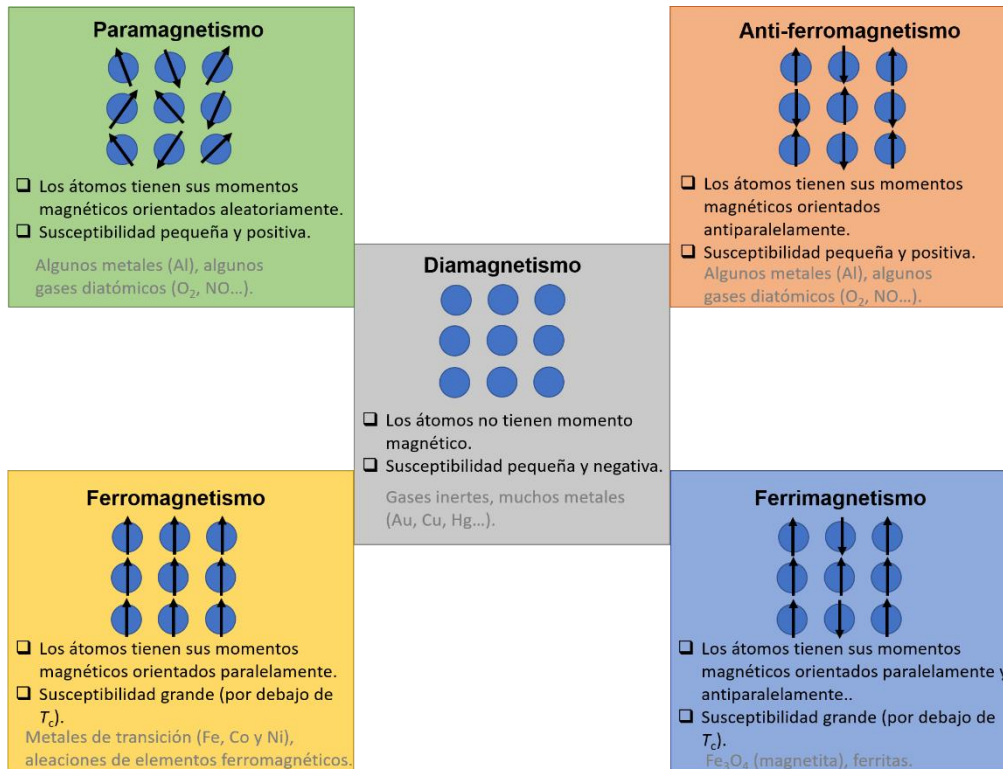
de hierro en el rango visible es comparable al de las nanopartículas de oro [334]. Así, las MNPs son distinguibles a simple vista o con lectores ópticos.

La segunda utilidad de las MNPs, combinada con la anterior o por sí sola, es su capacidad de inmunoseparación magnética (ISM). Para ello, las MNPs son funcionalizadas con un anticuerpo para unirse específicamente al analito de interés y posteriormente son separadas mediante un gradiente de campo magnético (este puede crearse con un simple imán o con un sistema más complejo de bobinas o superficies magnéticas según las necesidades). La ISM se puede utilizar como etapa de pre-concentración si la molécula de interés se encuentra muy diluida o para separarla de la muestra y así eliminar los efectos de matriz; con ambas cosas se logra mejorar la sensibilidad [335]. Esta estrategia puede utilizarse para mejorar la sensibilidad de otros sistemas de detección, en combinación con otras marcas de detección [325,336,337], o en sistemas magnéticos de cuantificación en los que las MNPs tienen la función dual (ISM y detección).

Finalmente, las MNPs pueden usarse para colocar mediante un imán los agentes de reconocimiento en las líneas de test y control [327] e incluso para recolocarlas más próximas a la superficie de la tira [327,338]. En este caso, no se utilizan las MNPs como marcas de detección, sino que se combinan con otro sistema.

### **A.4.1.2 Nanopartículas superparamagnéticas**

Las nanopartículas pueden clasificarse atendiendo a su comportamiento magnético tal y como se resume en la Figura 21. De entre ellas, las más adecuadas como marcas de detección son las ferro o ferrimagnéticas.



**Figura 21.** Resumen de los diferentes tipos de comportamientos magnéticos.

En un material magnético se acumulan energías de distinto origen: energías de canje (que promueve los efectos cooperativos ferro, antiferro o ferrimagnéticos), magnetostática (debida a los campos creados por los momentos magnéticos), de anisotropía magnetocristalina (que favorece una orientación llamada dirección de fácil imanación) y térmica. En ausencia de campo magnético aplicado, el material se divide en regiones llamadas dominios magnéticos en los cuales los momentos magnéticos están alineados paralelamente. Los dominios están separados por paredes de dominio en las que los momentos magnéticos evolucionan gradualmente de una dirección a otra. La configuración multidominio está determinada por la minimización de la energía total del material. Para cada material existe un valor crítico de tamaño (para la magnetita y la maghemita el tamaño crítico es 128 y 166 nm, respectivamente [339]) para el cual la energía asociada a la pared de los dominios es termodinámicamente desfavorable, y la partícula se convierte en un monodominio. En una partícula monodominio todos los momentos magnéticos están orientados en la misma dirección, por lo que también se llama macroespín o superespín. Debido a la anisotropía magnetocristalina, la partícula tiene una (en el caso de la anisotropía uniaxial) dirección de imanación preferente. Por ello, en ausencia de campo aplicado, el momento magnético de la partícula tiene dos posibles orientaciones en la dirección de fácil imanación y la energía necesaria por unidad de volumen para lograr la inversión se conoce como energía magnetocristalina

$K$ . Cuando la partícula es muy pequeña, la energía térmica a temperatura ambiente es suficiente para producir la inversión espontánea del momento magnético a un ritmo elevado. El tiempo de inversión se conoce como tiempo de relajación de Néel y está determinado por el volumen  $V$  de la partícula, la temperatura, la constante de anisotropía y la constante de Boltzmann  $k_B$ :

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad (1)$$

Siendo  $\tau_0$  el tiempo de relajación crítico que se encuentra en torno a  $10^{-10}$ - $10^{-13}$  s [340].

Cuando el tiempo de oscilación del momento magnético es significativamente inferior al tiempo de medida, el momento magnético aparente resulta nulo. Este comportamiento se denomina superparamagnetismo [341]. La temperatura por encima de la cual se considera que la partícula se encuentra en régimen superparamagnético es la que proporciona una energía igual a 25 veces la energía de anisotropía magnetocristalina, y se conoce como temperatura de bloqueo:

$$T_B = \frac{25 KV}{k_B} \quad (2)$$

A cada temperatura, el volumen por debajo del cual la partícula es superparamagnética es el volumen crítico:

$$V_C = \frac{k_B T}{25K} \quad (3)$$

que, en el caso de la magnetita y maghemita corresponde a unos 14 nm a temperatura ambiente.

Es muy interesante para la aplicación que perseguimos que las MNPs sean superparamagnéticas ya que la nulidad de su momento magnético evita su aglomeración por interacciones magnetostáticas. Además, las nanopartículas superparamagnéticas tienen susceptibilidad magnética e imanación a saturación muy elevadas (de aquí su nombre, dado que su comportamiento a campos moderados es lineal, como en el paramagnetismo, pero su imanación a saturación corresponde al material ferromagnético). Esto hace que sean manipulables y fácilmente excitables mediante campos magnéticos externos.

Una de las características más interesantes de las MNPs para la aplicación que nos atañe es su permeabilidad inicial, relacionada con la pendiente de la curva de imanación del material a campo nulo:

$$\mu = 1 + \left( \frac{\mu_0 M}{H} \right)_{H \rightarrow 0} \quad (4)$$

La permeabilidad magnética describe cuán susceptible es el material al campo magnético. Las partículas superparamagnéticas tienen permeabilidades relativamente altas a frecuencias elevadas como las necesarias para el sensor inductivo, lo que las hace particularmente atractivas para esta aplicación.

### **A.4.1.3 Magnetita y maghemita**

Las MNPs más empleadas para los MLFIAs son óxidos de hierro (magnetita o maghemita) debido a su buena respuesta magnética, biocompatibilidad, síntesis sencilla y bajo coste de producción [342,343]. La maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) está formada exclusivamente por iones  $\text{Fe}^{+3}$ , mientras que la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) es un óxido que contiene iones  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  en una proporción 1:2. El hecho de que los iones  $\text{Fe}^{+2}$  sean de mayor tamaño justifica que la estructura de la maghemita sea ligeramente inferior a la de la magnetita. En la estructura cristalina de la maghemita, la mitad de los iones  $\text{Fe}^{+3}$  están coordinados tetraédricamente y la otra mitad octaédricamente. En el caso de la magnetita, la mitad de los iones  $\text{Fe}^{+3}$  están coordinados tetraédricamente y la otra mitad están coordinados octaédricamente, mientras que todos los iones  $\text{Fe}^{+2}$  están coordinados octaédricamente. Ambas estructuras cristalinas son del tipo cúbica espinela inversa donde los iones  $\text{O}^{2-}$  se encuentran formando un empaquetamiento cúbico compacto centrado en las caras (fcc) a lo largo de la dirección [111]. Cada celda unidad está formada por 8 celdillas.

En su estado natural, tanto la maghemita como la magnetita, son ferrimagnéticas. Los cristales de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con un tamaño de 14 nm o menor son superparamagnéticos [344].

En los últimos años el uso de *nanocomposites* (por ejemplo, nanopartículas *core@shell*), que combinan varios materiales, ha aumentado significativamente con el objetivo de aunar sus propiedades. Los *nanocomposites* formados por óxido de hierro y nanopartículas plasmónicas (oro o plata) se utilizan para combinar la ISM con la bioconjugación sencilla y directa que proporciona la superficie plasmónica [345–348]. Otro tipo de *nanocomposites* combinan MNPs con fluorescentes (como, por ejemplo, puntos



cuánticos). En este caso, se aúna la ISM con la cuantificación fluorescente [349]. Finalmente, hay trabajos que utilizan nanocomposites para detección multimodal (magnética, visual y fluorescente) [350].

### **A.4.1.4 Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro**

Las propiedades físicas y químicas de las MNPs requeridas para cada aplicación pueden ser diferentes y deben ser controladas con el proceso de síntesis [351]. Los requisitos más importantes de las MNPs para su uso como marcas de detección son:

- Núcleo magnético: su calidad cristalina y homogeneidad de tamaño pueden controlarse con la ruta y parámetros de la síntesis (temperatura, pH, concentración de los precursores, etc.).
- Medio de suspensión: es vital para la posterior bio-funcionalización de las MNPs. Para los procesos de conjugación es importante que las MNPs estén en medio acuoso. Por tanto, si la síntesis se realiza en medio orgánico será necesario hacer un intercambio de ligandos para dispersarlas en agua [352].
- Recubrimiento: Es crucial para la posterior bio-conjugación.

Se pueden clasificar las rutas de síntesis en tres grupos: químicas (90%), físicas (8%) y biológicas (2%). Las síntesis químicas son las más empleadas para su bio-aplicación ya que proporcionan suspensiones coloidales con tamaños y propiedades fisicoquímicas más homogéneas y facilitan la necesaria modificación superficial. Entre ellas destacan los métodos de coprecipitación, descomposición hidrotérmal, microemulsión, hidrotérmal y polyol.

#### *Método de coprecipitación*

El método de coprecipitación es el más popular para la síntesis de óxidos de hierro debido a su sencillez y efectividad. Es muy utilizada en aplicaciones biomédicas debido a la naturaleza no tóxica de los materiales empleados [353]. La ruta se lleva a cabo en solución acuosa con la disolución de sales de  $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ . El término “coprecipitación”, en este caso, se refiere al fenómeno por el cual un precipitado puede contener una o más sustancias, las cuales, previamente, son solubles en esas condiciones. A continuación, se forma el precipitado a través del fenómeno de nucleación y crecimiento del grano por adición de una base. Es convenientemente llevar a cabo el proceso en atmósfera inerte, generalmente nitrógeno [354]. La relación  $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$  debe ser 1:2. Una pequeña variación en esta relación, así como el tipo de sales, el control del valor de pH, la temperatura, la naturaleza del disolvente y la fuerza iónica pueden afectar a las

propiedades magnéticas de las MNPs, así como a su forma y tamaño [355]. El valor medio del diámetro de las nanopartículas obtenidas por este método varía de 5 a 40 nm.

A continuación, se indican las reacciones que tienen lugar para la obtención de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) por el método de coprecipitación [356]:



### *Método de descomposición termal*

La descomposición térmica es una de las mejores técnicas para el control del tamaño y la morfología de las nanopartículas, aunque el procedimiento resulta más complicado que la co-precipitación. Consiste básicamente en disolver compuestos organometálicos, que actúan como precursores, en solventes no polares para la obtención de nanocristales monodispersos por descomposición térmica a través de la estabilización de tensioactivos. Los carbonilos de hierro y los acetilacetonatos metálicos son los compuestos más usados como precursores organometálicos [357]. Los tensioactivos suelen ser ácidos grasos, como el ácido oleico, o hexadecilamina [358]. En esta síntesis, el argón juega un papel importante para mantener la atmósfera inerte. La temperatura óptima requerida para esta reacción oscila entre 100-350 °C, lo que lleva a la producción de MNPs cristalinas de un tamaño entre 4-30 nm de diámetro con una distribución de tamaños estrecha [359]. El tamaño de las nanopartículas depende en gran medida de la proporción de precursores organometálicos, tensioactivos y solventes, así como del tiempo de reacción y la temperatura.

### *Método de microemulsión*

La microemulsión es una dispersión termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles en presencia de un tensioactivo que forma una monocapa en la interfaz entre el aceite y el agua, exhibiendo una tensión interfacial ultra baja. La fase acuosa contiene sales metálicas u otros reactivos, mientras que la fase oleosa está compuesta por diferentes hidrocarburos y olefinas. Existen dos tipos de microemulsiones: la directa (aceite dispersado en agua, o/w) o la invertida (agua dispersa en aceite, w/o). En las microemulsiones de agua en aceite, la fase acuosa se dispersa como microgotas de un diámetro de 1 a 50 nm, rodeadas por una monocapa de moléculas de tensioactivo en la fase oleosa continua [360]. El tamaño de las micelas inversas está determinado por la relación molar de agua/tensioactivo. Estas micelas se usan para precipitar óxidos de

hierro dentro de las gotas acuosas, para así obtener MNPs con una distribución estrecha pues la microgota actúa como un nanorreactor. Con el fin de extraer el precipitado, se puede agregar acetona, etanol u otro solvente orgánico, y por último se lleva a cabo un paso de filtración o centrifugación. Las propiedades de las nanopartículas obtenidas con el uso de este método dependen esencialmente de la elección del tensioactivo, y como resultado se consiguen nanopartículas de forma esférica con un diámetro que oscila de 10-25 nm [361,362].

### *Método hidrotermal*

Este método permite la síntesis de MNPs de alta calidad debido a las condiciones en las que se realiza la ruta, alta temperatura y presión, lo cual favorece la nucleación y acelera el crecimiento de las nuevas partículas, pudiéndose obtener de este modo partículas de tamaño muy pequeño [363]. En general, la ruta de síntesis incluye varias técnicas químicas húmedas, con el objetivo de cristalizar sustancias en un recipiente sellado en una fase acuosa y no acuosa a alta temperatura (130-250 °C) y baja presión de vapor (la presión requerida es superior a  $10^7$  Pa), y además se requieren tiempos de reacción largos (aproximadamente 72 h). La calidad cristalina de las nanopartículas es alta, pero las condiciones necesarias son muy exigentes. Los tamaños de nanopartículas que se pueden obtener pueden ir de 10-800 nm, siendo los tamaños más pequeños los más interesantes. El tamaño y distribución depende de diferentes parámetros: la concentración del precursor, el tiempo total de la reacción y la temperatura a la que tiene lugar la reacción [364]. Por otra parte, cabe resaltar, que esta ruta de síntesis es ecológica y versátil puesto que no se necesitan disolventes ni tratamientos posteriores.

### *Método polyol*

Este método permite sintetizar MNPs uniformes a una temperatura relativamente baja y se basa en compuestos precursores como óxidos, acetatos y nitratos disueltos o suspendidos en dioles. Es un método versátil y escalable para la producción de grandes cantidades. Además, se pueden obtener un rango amplio de tamaños, que va desde nanopartículas de 4 nm de diámetro hasta 100 nm. El tamaño depende de las condiciones de reacción: temperatura, tiempo de reacción, perfil de calentamiento, naturaleza del disolvente o los precursores organometálicos [365,366].

En la Tabla 4 se muestra las ventajas y desventajas más destacables de los métodos de síntesis de MNPs comentados previamente.

**Tabla 4.** Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de síntesis empleados para la obtención de nanopartículas superparamagnéticas.

<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Coprecipitación</b>	Sencillez.	Amplia distribución de tamaño. Uso de bases fuertes.
<b>Descomposición hidrotermal</b>	Control del tamaño y la forma.	Necesidad de ebullición de los disolventes lo que afecta a la reproducibilidad del tamaño
<b>Microemulsión</b>	Las temperaturas requeridas son bajas y se obtienen distribuciones de tamaños estrechas. Condiciones ambientales de trabajo.	Procesos de lavado y estabilización adicionales para evitar la agregación. Bajo rendimiento de la síntesis lo que implica que sea difícil de escalar.
<b>Hidrotermal</b>	MNPs altamente cristalinas con un buen control del tamaño. Método fácilmente escalable, además de ser ecológico y versátil.	Las condiciones de reacción son muy exigentes: temperatura, presión y tiempo de reacción.
<b>Polyol</b>	MNPs con buena cristalinidad y magnetización. Buena disolución de los disolventes orgánicos polares requeridos.	Alto coste de los reactivos, generación de subproductos y necesidad de postratamientos.

Además existen otros métodos de síntesis de MNPs, menos utilizados que los explicados anteriormente, como el método sol-gel [367], la síntesis sonoquímica [368], síntesis asistida por microondas [369], el método de biomineralización [370] o deposición por bombardeo iónico [371].

#### **A.4.1.5 Modificación superficial de las MNPs**

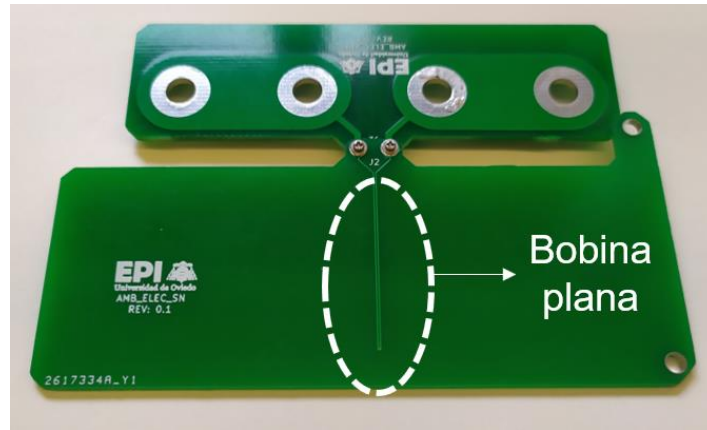
El recubrimiento superficial de las MNPs es una etapa esencial para su aplicación biológica. Por un lado, es imprescindible para evitar la agregación de las nanopartículas; para ello el recubrimiento debe aportar una carga superficial que proporcione la repulsión electrostática que les dé la estabilidad necesaria para su funcionalización. Además, los recubrimientos pueden actuar como capa protectora para evitar la corrosión y oxidación de las nanopartículas. Por otro lado, este recubrimiento juega un papel crucial en la bio-conjugación. Al contrario que el oro coloidal, las MNPs carecen de plasmones que permitan la unión electrostática a los elementos de bio-reconocimiento, y por ello hay que enlazar los grupos funcionales disponibles de los anticuerpos a los del adecuado recubrimiento. En la literatura pueden encontrarse numerosos ejemplos de recubrimientos superficiales que se pueden clasificar en orgánicos e inorgánicos [372,373]. Los grupos funcionales más comunes de los recubrimientos de las MNPs son -NH<sub>2</sub>, -SH y -COOH para los cuales hay varias estrategias químicas que permiten la

conjugación [374]. La química de acoplamiento cruzado EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida) o sulfo-NHS (Sulfo-N-hidroxisuccinimida) permite establecer un enlace amida entre un grupo carboxilo y una amina secundaria, por lo tanto, con ella se pueden conjugar los grupos  $-NH_2$  o  $-COOH$  de las MNPs con grupos  $-COOH$  o  $NH_2$  disponibles en la estructura de las biomoléculas. También las moléculas con grupos  $-SH$  pueden unirse a nanopartículas con grupos  $-NH_2$  a través de diferentes entrecruzadores heterobifuncionales. En los últimos años se está investigando el empleo de reacciones de la química verde. Entre las estrategias de conjugación que siguen esta idea destaca la química “click”, que se basa en una cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre que ofrece la unión rápida y robusta de nanopartículas con moléculas funcionales [375]. La reacción se puede realizar en condiciones relativamente leves, es altamente específica y genera escasos subproductos.

### **A.4.2 Sensor inductivo**

En esta tesis doctoral se ha utilizado un sensor inductivo (ISens) de fabricación propia para la cuantificación de los MLFIAs. Este sensor ha sido desarrollado por nuestro grupo de investigación expresamente para su aplicación a la lectura de los MLFIAs. El principio de funcionamiento es la inducción electromagnética de Faraday. De forma general, en los sensores inductivos el material magnético es excitado por un campo alterno y este reacciona creando un campo opuesto inducido en el sensor. En función del diseño, la señal generada puede ser detectarse como un cambio de autoinductancia, impedancia o frecuencia de resonancia de la bobina.

El sensor ISens está diseñado específicamente para medir tiras de flujo lateral. Su transductor consiste en una bobina plana de cobre en forma de una doble línea que se imprime sobre un sustrato aislante (Figura 22). Por la bobina se hace pasar una corriente de radiofrecuencia (20 MHz) de baja amplitud (20 mA), y se mide de forma continua su impedancia aparente mediante un analizador de impedancia (Agilent 4294A).



**Figura 22.** Bobina plana del sensor inductivo que consta de una doble línea de cobre la cual está impresa sobre un sustrato aislante.

La bobina transductora puede aproximarse, desde el punto de vista eléctrico, por un circuito RL (es equivalente a una resistencia  $R$  y una autoinductancia  $L$  conectadas en serie), cuya impedancia eléctrica  $Z$  depende de la frecuencia  $\nu$  de trabajo y de la permeabilidad magnética  $\mu$  del medio que la rodea (véase ecuación (4)).

$$Z(\nu, \mu) = R(\nu) + i2\pi\nu L\mu(\nu) \quad (5)$$

$R$  y  $L$  son parámetros fijos de la bobina que dependen de sus características geométricas, material de fabricación (en nuestro caso, cobre) y frecuencia de trabajo. En ausencia de partículas cerca de la bobina, la permeabilidad es igual a la del vacío,  $\mu = \mu_0$ . Cuando una fracción  $\psi$  de la bobina está afectada por las nanopartículas, la permeabilidad efectiva en la ecuación (5) es  $\mu = \psi\mu_{\text{MNP}}(\nu) + (1 - \psi)\mu_0$ , siendo  $\mu_{\text{MNP}}(\nu)$  la permeabilidad inicial de las MNPs a la frecuencia de trabajo. Con todo, la impedancia en presencia de las MNPs resulta:

$$Z(\nu, \mu) = R(\nu) + i2\pi\nu L[\psi\mu_{\text{MNP}}(\nu) + (1 - \psi)\mu_0] \quad (6)$$

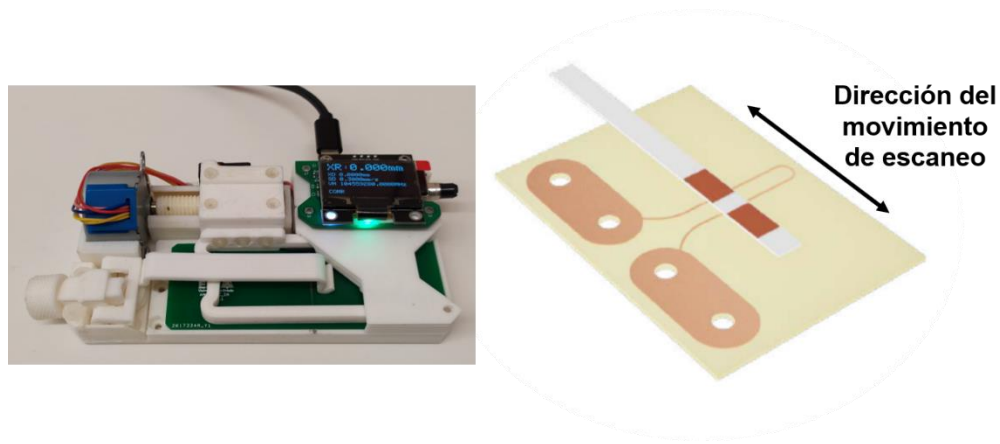
Y la variación de la misma con respecto a su valor sin MNPs es:

$$\Delta Z = i 2\pi\nu L\psi(\mu_{\text{MNP}} - \mu_0) \quad (7)$$

De este modo, para una frecuencia fija, la variación de la impedancia debido a la presencia de una tira de MLFIA sobre la bobina transductora es directamente proporcional a  $\psi$  y, por tanto, a la cantidad de MNPs.

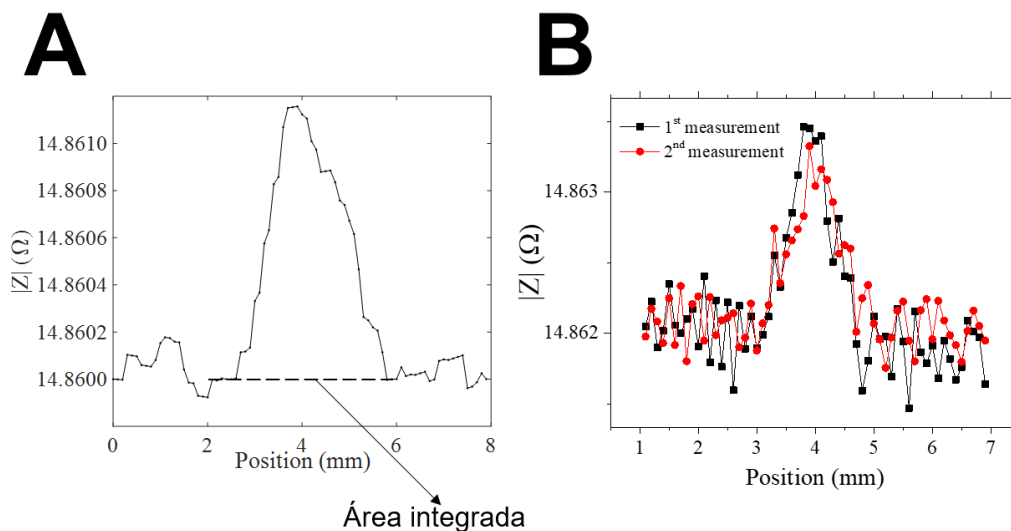
Para realizar la medida de una tira de flujo lateral, esta se pone en contacto suave con la bobina y se desliza sobre ella mediante un microposicionador diseñado

específicamente para este fin (Figura 23). Cabe destacar la ausencia de partes metálicas en los elementos móviles del microposicionador que podrían inducir ruido en la señal.



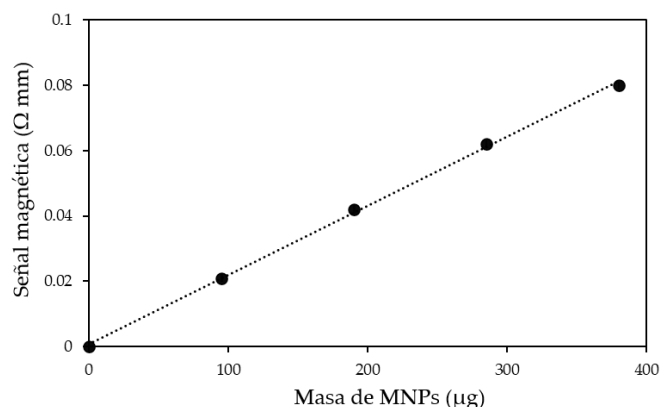
**Figura 23.** Microposicionador diseñado para escanear las tiras de MLFIAs.

La proximidad de las MNPs a la bobina produce un cambio en la impedancia eléctrica que es proporcional a la permeabilidad inicial magnética, volumen total de las mismas y a la frecuencia de la corriente. La sensibilidad y resolución de la cuantificación obtenida con el sensor depende de las características del mismo (geometría, tamaño y electrónica), pero también de las propiedades de las MNPs. Por este motivo, es muy interesante también para la detección que las MNPs sean superparamagnéticas, ya que ello implica una permeabilidad inicial significativa a radiofrecuencia. En la Figura 24A se puede ver como varía la impedancia cuando se escanea una muestra de MNPs. Para obtener la medida de la impedancia se calcula la integral acumulativa del pico y, de esta forma, la medida tiene en cuenta la contribución de todas las MNPs en la línea, independientemente de una posible distribución irregular. El microposicionador permite escanear las tiras en ambos sentidos en la dirección de escaneo. En la Figura 24B se muestra el resultado de dos escaneos consecutivos en direcciones opuestas.



**Figura 24.** (A) Representación gráfica de la variación de la impedancia obtenida del escaneo de una tira de flujo lateral con el sensor inductivo. (B) Reproducibilidad de las medidas de impedancia obtenidas con el sensor inductivo.

Como explica la ec. (7), existe una relación lineal entre la variación de impedancia medida y el volumen o masa de nanopartículas, pudiéndose realizar de este modo una calibración del sistema (Figura 25). El tiempo necesario para analizar una tira es aproximadamente de 5 minutos. El principio de operación del sensor utiliza la misma corriente en la bobina para excitar y detectar las MNPs, y por tanto no requiere la aplicación de campos magnéticos adicionales. Ello permite reducir la complejidad del dispositivo en comparación con otros. De esta forma, con el acoplamiento del sensor inductivo a las tiras de flujo lateral, prevemos el desarrollo una herramienta POCT basada en inmunoensayos magnéticos de flujo lateral.



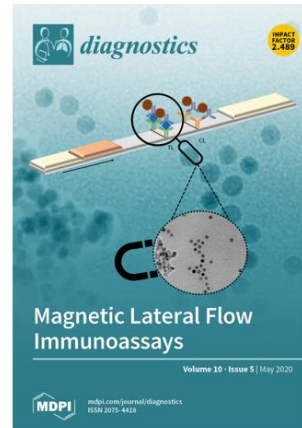
**Figura 25.** Calibración del sensor ISens para diferentes masas de MNPs.



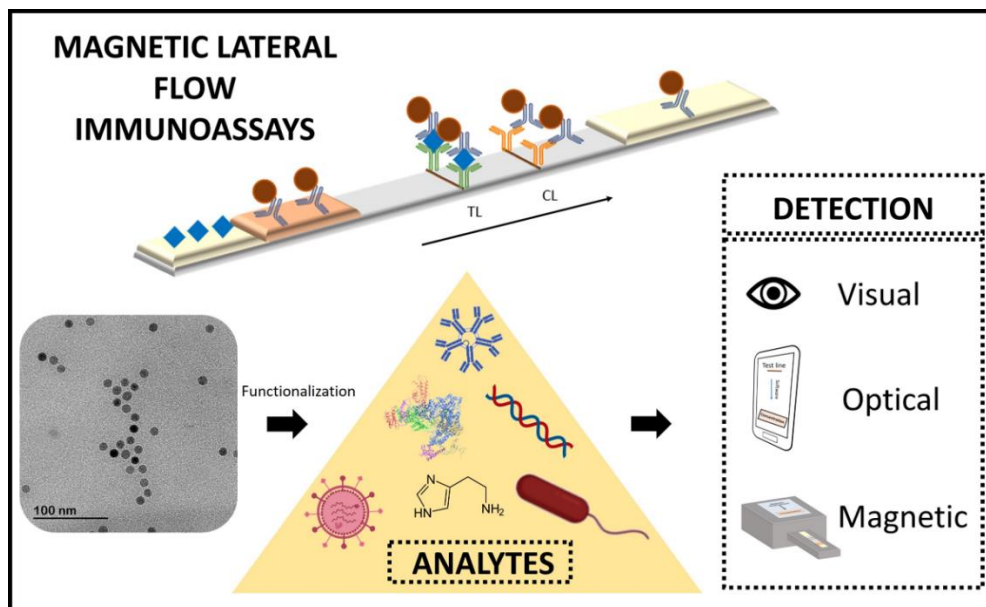
A continuación, se recoge una revisión bibliográfica (el facsímil se ha incluido en el anexo III), recientemente publicada, sobre los MLFIAs y los sensores ópticos y magnéticos para su lectura y cuantificación. En este trabajo también se analiza el tipo de MNPs utilizadas en cada caso, así como la química de conjugación y el tipo de detección empleado.

### A.4.3 Review: Magnetic lateral flow immunoassay

This work has been published as:  
*Diagnostics*, **2020**, 10(5), 288  
and selected as cover issue.



#### GRAPHICAL ABSTRACT





Review

## Magnetic lateral flow immunoassays

A. Moyano<sup>1</sup>, E. Serrano-Pertierra<sup>1</sup>, M. Salvador<sup>2</sup>, J.C. Martínez-García<sup>2</sup>, M. Rivas<sup>2</sup>, M.C. Blanco-López<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry & Institute of Biotechnology of Asturias, University of Oviedo, c/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.

<sup>2</sup> Department of Physics & IUTA, University of Oviedo, Campus de Viesques, 33204 Gijón, Spain.

### ABSTRACT

---

A new generation of magnetic lateral flow immunoassays is emerging as powerful tool for diagnostics. They rely on the use of magnetic nanoparticles (MNP) as detecting label, replacing conventional gold or latex beads. MNP can be sensed and quantified by means of external devices, allowing the development of immunochromatographic tests with a quantitative capability. Moreover, they have an added advantage because they can be used for immunomagnetic separation (IMS), with improvements in selectivity and sensitivity. In this paper, we have reviewed the current knowledge on magnetic-lateral flow immunoassay (LFIA), coupled with both research and commercially available instruments. The work in the literature has been classified in two categories: optical and magnetic sensing. We have analysed the type of magnetic nanoparticles used in each case, their size, coating, crystal structure, and the functional groups for their conjugation with biomolecules. We have also taken into account the analytical characteristics and the type of transduction. Magnetic LFIA have been used for the determination of biomarkers, pathogens, toxins, allergens and drugs. Nanocomposites have been developed as alternative to MNP with the purpose of sensitivity enhancement. Moreover, IMS in combination with other detection principles could also improve sensitivity and limit of detection. The critical analysis in this review could have an impact for the future development of magnetic LFIA in fields requiring both rapid separation and quantification.

---

**KEYWORDS:** Magnetic nanoparticles; lateral flow immunoassay; magnetic biosensors; optical transduction; magnetic transduction; nanocomposites.

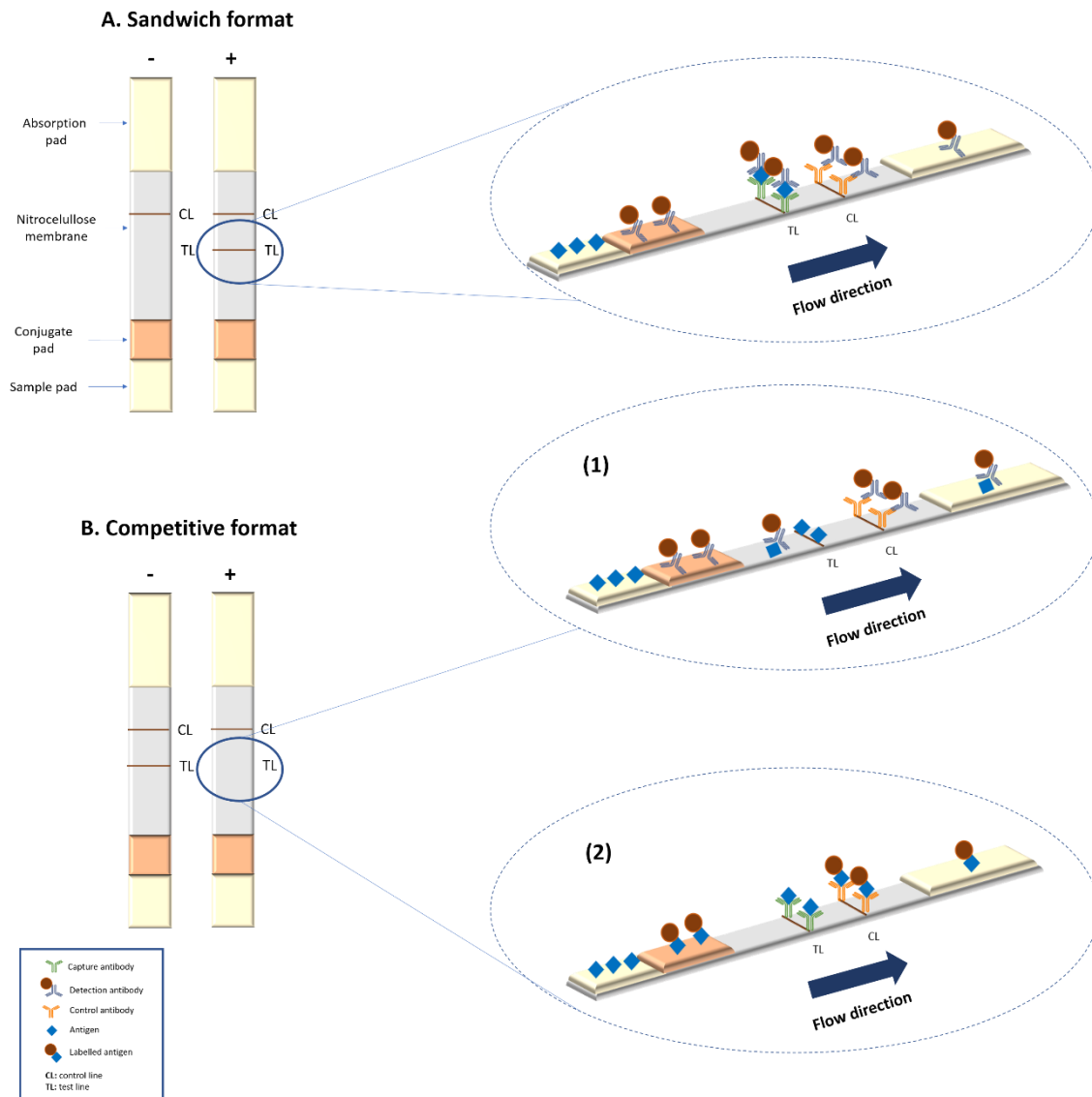
## **1. Introduction**

Point-of-care testing (POCT) devices are diagnostic tools for rapid in-field analysis. They should be simple and accessible to unskilled operators at decentralized settings. They can be classified into several categories such as cell phone-based technologies, paper-based diagnostics tools and lab-on-a-chip-based platforms [1]. The blood glucose meter and the pregnancy test are the most popular examples of this technology [2]. In the last decade, research works have focused on improving sensitivity, quantification and multiplexing [3]. Thus, POCT procedures may be applied in a variety of fields such as clinical diagnosis [4], safety [5], agriculture [6], veterinary [7], drugs [8] and contaminants [9].

Lateral flow immunoassays (LFIA) are widely used as POCT due to their rapidity, simplicity, and low cost. This principle combines a chromatographic system with immunochemical reactions for specific and sensitive detection. Traditionally, LFIAs have been used only as qualitative screening tests, with a visual signal for positive/negative test. The outbreak of the coronavirus disease (COVID-19) is the most recent example of the relevance of these devices in rapid screening and monitoring [10].

The test consists of four components: sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane and absorbent pad. All these parts are assembled onto a plastic card to enable the flow and get robustness. The most critical component is the nitrocellulose membrane, where the recognition elements such as antibodies, antigens or nucleotides are immobilized by means of a dispenser. The fluid test sample flows by capillarity, which means that there is no need to use pumps that require energy to run.

Different formats may be adopted in LFIA, with the sandwich format being the most common. In this assay the labelled antibody (detection antibody) forms a complex with the target analyte. These complexes will be captured at the test lines by the capture antibody immobilised on the membrane (Figure 1A). For low molecular weight molecules (e.g., haptens) the competitive format is used, where the absence of signal in the test line indicates the presence of the analyte (Figure 1B).

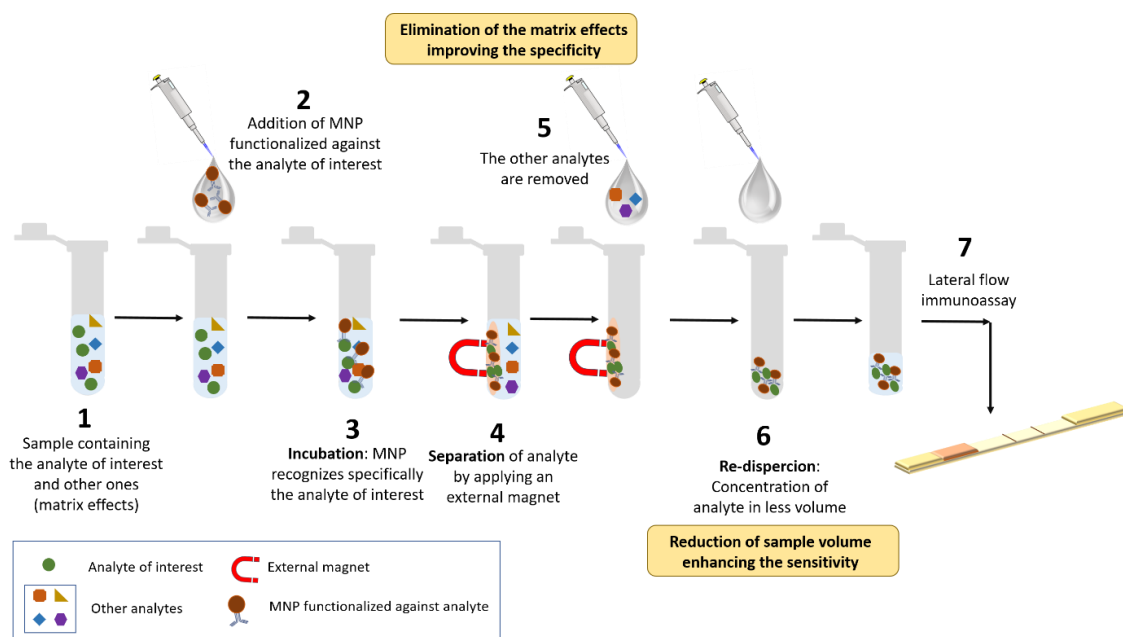


**Figure 1.** Summary of the basic formats of lateral flow assays. **(A)** Scheme of a sandwich format lateral flow immunoassays (LFIA). **(B)** Scheme of a competitive format LFIA: (1) when antigen is immobilized at the test line and labelled antibody is used as detection system; (2) when antibody is immobilized at the test line and labelled antigen is used for detection.

Nanoparticles play an important role as labels for the development of LFIA [11]. Gold nanoparticles (AuNPs) are the most popular labelling system in qualitative analysis. They display an intense red colour due to their localized surface plasmon resonance effects [12]. Latex nanoparticles are also widely employed in commercial LFIA due to their low cost [13]. They provide good performance, but the detection is not as sensitive as those achieved with other systems. Moreover, the low versatility of the latex nanoparticles prevents the development of further strategies to couple the strips to transducers.

There is a recent interest on quantitative LFIA, with the aim of achieving rapid, cheap and simple tests for biomedical or environmental applications. Limitations such as sensitivity and quantification could be overcome by the use of novel nanoparticle labels. Several nanomaterials have been used for optical, electrochemical and other emerging detection principles such as magnetic systems [11]. Fluorescent nanoparticles, which include quantum dots [14] and up-converting phosphor technologies reporter particles [15], are suitable tags to be detected by optical methods. Carbon nanoparticles [16] or nanotubes [17] have also been used with the same purpose. Colloidal selenium [18], magnetic [19], silver [20], Au@Ag core shell [21] and platinum nanoparticles [22] have been employed to improve the performance of the most traditional optical nanoparticles. Liposomes are promising multilabel systems through the encapsulation of dyes, thus enhance the sensitivity [23].

Magnetic nanoparticles (MNP) are key players for the development of a new generation of biosensors based on LFIA. On one hand, they could be used for quantitative measurements provided that they are coupled with an external reader. On the other hand, enable IMS as well [24], which improves selectivity and sensitivity. To achieve this, MNP have to be functionalized with an active biomolecule which recognizes specifically the analyte of interest. Then, these MNP bioconjugates could be used to bind the analyte and separate it from diluted samples by applying an external magnetic field (a simple magnet could be used for many applications). The analyte-MNP complexes can be subsequently transferred to another solution and concentrated in less volume [25] as demonstrated in Figure 2.



**Figure 2.** Scheme of the immunomagnetic separation (IMS) procedure.

Magnetic LFIA, or magnetic immunochromatographic assays, have been developed in different fields of interest. Despite their promising features, they have not yet been transferred to commercial in-vitro tests. In addition, review papers in this field are still scarce at the literature, probably due to the difficulties inherent to interdisciplinary research. The following sections provide a thorough analysis of the use of magnetic nanoparticles (MNP) in LFIA and their recent applications. We have firstly analysed the type of MNP and their features related to the transducers systems. Then the magnetic principles used at research and commercial devices are described, followed by a collection of the main applications of magnetic LFIA. This work aims to have an impact on the development of novel POCT biosensors based on magnetic LFIA.

## 2. Magnetic Nanoparticles as Labels in LFIA

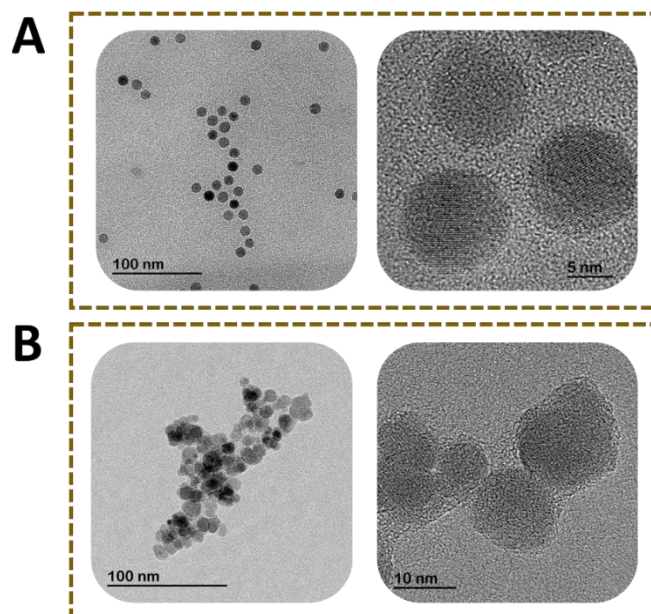
The desired final properties of MNP vary depending on the synthesis routes employed. Synthesis protocols may be classified into three main groups: chemical, physical and biological [26]. Chemical synthesis represents 90% of total. The main chemical routes include: coprecipitation, thermal decomposition, hydrothermal, sol-gel, polyol and microemulsion methods. Chemical synthesis can be non-aqueous or aqueous [26,27], the latter being more suitable for subsequent bioconjugation since the bioreagents have to be dispersed in water. In fact, the synthesis procedures are known to affect the outcome of the bioconjugation process, as reviewed elsewhere [28]. Once MNP are prepared, characterization of their physicochemical properties is an essential step for their control and quality [27,28]. The main parameters are shown in Table 1.

**Table 1.** Characterization techniques and their corresponding information obtained for magnetic nanoparticles (MNPs).

<b>Techniques</b>	<b>Characterization Information</b>
Microscopy: Transmission electron microscopy and Scanning electron microscopy	Morphology, size distribution, crystallinity and composition
X-ray diffraction (XRD)	Crystal structure and size
Dynamic light scattering (DLS)	Hydrodynamic size
Infrared spectroscopy (IR)	Nature of surface and functional groups on surface
Zeta potential	Surface charge and stability
Thermal analysis	Concentration and thermal stability
Mass spectroscopy	Concentration
Superconducting quantum interference device (SQUID)/Vibrating sample magnetometry (VSM)	Magnetic properties

In order to use MNPs as label in immunoassays, they need to be stabilized with chemical compounds holding a functional group for covalent reaction with active biomolecules (antibodies, aptamers, nucleic acids). In contrast to gold nanoparticles, the attachment of the biorecognition elements to MNPs by passive adsorption is not feasible. Various coating chemistries are therefore required for bioconjugation. The surface functional groups are a critical parameter that determines the chemical reactions and enables a proper functionalization [29]. Carboxyl-functionalized MNPs are widely used, since they easily bind the amino groups on bioreceptors and form covalent bonds by using the EDC-NHS (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide/N-hydroxysuccinimide) chemistry. Other approach involves the coating of MNP with gold nanoparticles. These can be directly attached to biological molecules due to hydrophobic attractions, ionic interactions and dative binding [30]. The magnetic nanoparticles used for lateral flow immunoassay in the literature vary in size (10–400 nm), type of chemical coating and crystal phases. Coatings can be classified into two broad groups depending on their chemical nature: organic and inorganic [31]. These surface layers include hydroxyl, carbohydrate, thiol and phosphonate groups [26]. Magnetite and maghemite are the preferred crystal structures due to their good magnetic response, biocompatibility, facile synthesis and low-cost production [32]. The magnetic nanoparticles for LFIA are usually spherical. Figure 3 shows an example of magnetite nanoparticles. Figure 3A shows dispersed nanoparticles with a perfect spherical morphology, whereas Figure 3B shows polydisperse nanoparticle aggregates with an irregular spherical shape.





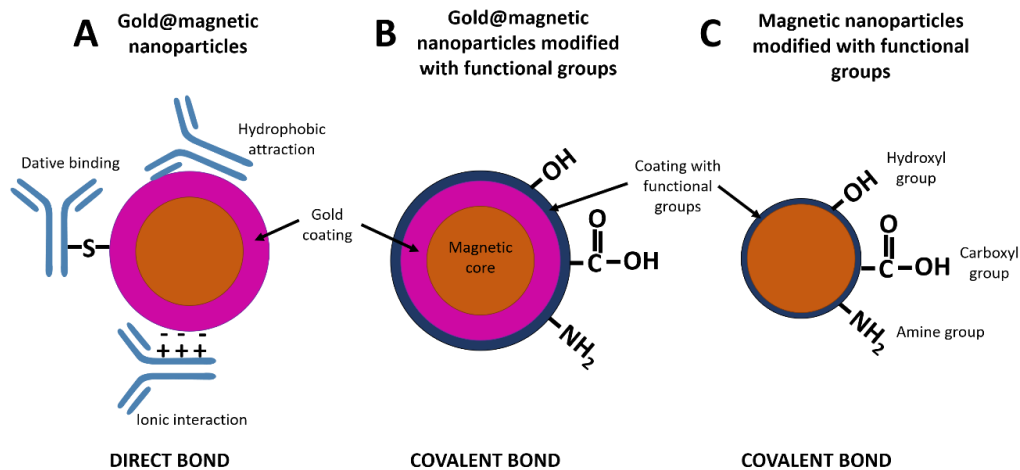
**Figure 3.** Transmission electron microscopy images of magnetite nanoparticles. **(A)** Monodisperse MNP with spherical shape and **(B)** polydisperse nanoparticles with irregular spherical shape.

The optimal type of magnetic nanoparticles depends on the final applications and the magnetic transducing principle. The different parameter related to MNP (size, crystallinity, dispersity, magnetic properties and coating) can be controlled by the synthesis procedure.

In recent years, the interest for the use of nanocomposites or core/shell nanoparticles has increased significantly. This kind of nanocomposites could synergistically combine the advantages of both nanoparticles [33].  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$  core/shell nanoparticles have been used in lateral flow immunoassay to improve the sensitivity of the assay. Gold nanoparticles can be attached to biomolecules directly, and the test line shows intense red colour. In addition, the magnetic core allows easy separation using a magnet. For this reason,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$  core/shell nanoparticles have been widely reported in lateral flow immunoassay as label to detect different analytes [34–37].

Figure 4 shows a scheme of core/shell nanoparticles and different strategies to conjugate biorecognition elements. Gold nanoparticles are attached directly to proteins through i) hydrophobic attractions between the protein and the metal surface, ii) ionic interactions between the negatively charged nanoparticle and the positively charged sites on the protein and iii) dative binding between the metal and the conducting electrons of nitrogen and sulphur atoms of the protein (Figure 4A) [38]. In addition, gold coating could be modified with functional groups (such as hydroxyl, amine or carboxyl)

to establish a covalent bond with proteins. In this case, functional groups have to be activated on the nanoparticle surface in order to attach biomolecules (Figure 4B). In contrast, MNPs have to be modified with functional groups first to enable the binding of the proteins to the particle (Figure 4C).



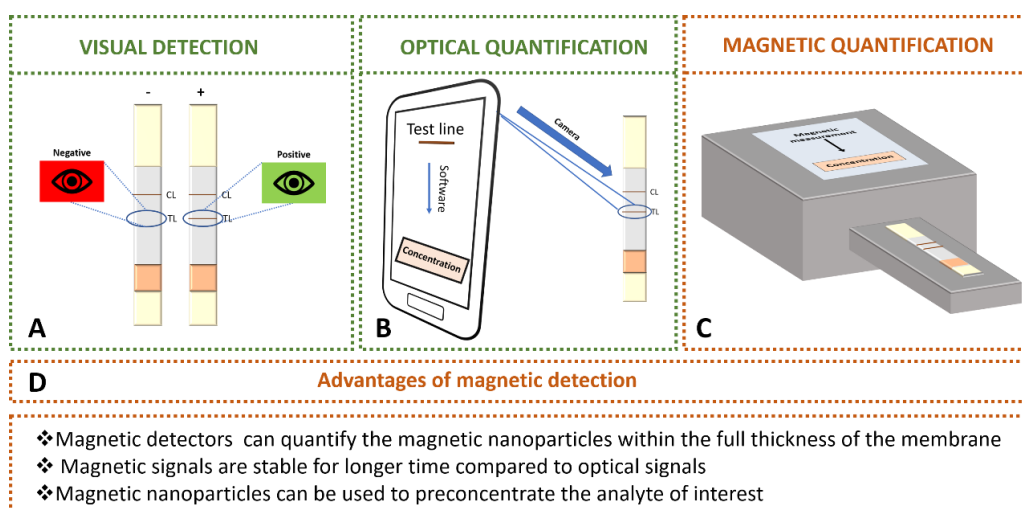
**Figure 4.** Schematic representation of direct bond between gold@magnetic nanoparticles and proteins **(A)**, covalent bond between gold@magnetic nanoparticles and proteins **(B)** and covalent bond between functionalized magnetic nanoparticles and proteins **(C)**.

### 3. Detection of Magnetic Nanoparticles Used as Labels in LFIA

#### 3.1. Optical Transduction

Magnetic nanoparticles can be detected at the test line in LFIA by means of optical techniques (Figure 5). MNP have a molar absorption coefficient comparable with colloidal gold in the visible range [19]. For this reason, the magnetic nanoparticles are used as colorimetric labels in lateral flow immunoassays, showing a dark brown colour easily distinguishable on white nitrocellulose membranes. The optical density signal displayed by magnetic nanoparticles can be observed by naked eye (Figure 5A) or by the use of optical commercial readers and smartphones [39]. Magnetic nanoparticles aggregates have been used in order to decrease the detection limit thanks to the controlled agglomeration with poly-L-lysine [19]. The limit of detection achieved for aggregates is almost 40-fold lower than the values achieved with single dispersed magnetic nanoparticles. Yan *et al.* [40] have reported other advantageous strategy to enhance the optical signal (reflectance) based on the generation of magnetic network complex by means of secondary antibodies.

Mobile phones and home-scanners have been integrated to LFIA as decentralized diagnostic tools (Figure 5B). Their simplicity and affordability make them not only a perfect candidate for devices in developing countries [41], but also an easy-to-use tool for patients requiring regular controls that may eventually reduce costs to the National Health systems. Moreover, some manufacturers provide special software, such as Novarum<sup>®</sup> or Halomic<sup>®</sup> to process strips. Applications for phone devices can provide analytical parameters for rapid tests and in simple way even in field conditions [42]. Several approaches have been reported in order to improve the limits of detection [43,44]. Ruppert *et al.* [43] have designed a statistical software which includes the colorimetric readout of test strip and tools for background and baseline correction. Saisin *et al.* [44] have optimized the camera exposure time in order to improve the sensitivity and limit of detection. They achieved enhancements up to 3-fold and 5-fold, respectively. In addition, numerous optical readers have been commercialized by several companies: Detekt Biomedical (Austin, TX, USA), Qiagen (Hilden, Germany), Axxin Inc. (Fairfield, Australia), LRE medical (Nordlingen, Germany), Abbott (Libertyville, IL, USA), Optricon (Berlin, Germany), Skannex (Oslo, Norway) and BD Company (Franklin Lakes, NJ, USA).



**Figure 5.** Detection of magnetic nanoparticles used as labels in LFIA: **(A)** visual detection by naked eye. **(B)** Optical detection using smartphone with special software. **(C)** Magnetic quantification using magnetic transduction. **(D)** Advantages of magnetic detection over optical detection.

### 3.2. Magnetic Transduction

Magnetic detection offers several advantages over optical detection. Optical detectors only record the intensity of colour from the top layer of the membrane. However, magnetic detectors can quantify the magnetic nanoparticles within the full

thickness of the membrane. In addition, the magnetic signals are stable for longer time than optical signals, and magnetic nanoparticles can be used to preconcentrate the analyte of interest.

Up to now, several methods to quantify magnetic nanoparticles at the detection zones in LFIA have been described in the literature. They are based on different physicochemical transducing principles which can be divided into two groups: magnetoresistive readers and inductive readers. Some of them are commercially available and others have been developed by academic research groups with the aim of improving the analytical characteristics or portability requirements. The different types of nanoparticles used for each transducing principle are shown in Table 1. In order to select the optimal nanoparticles, several parameters must be taken into account. The size depends on the specific applications and the transducing principle, as shown in Table 2. EDC-NHS chemistry was used for bioconjugation in all the cited works.

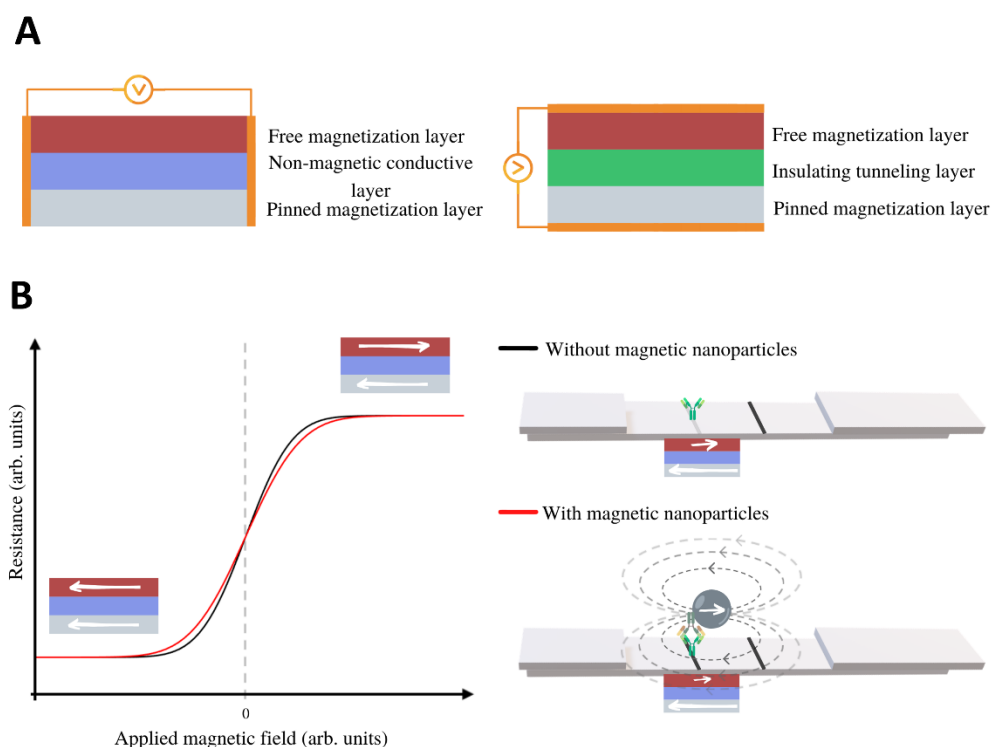
**Table 2.** Type of magnetic nanoparticles used for each magnetic transducing principle.

<b>Transducing Principle</b>	<b>Nanoparticles</b>	<b>References</b>
<b>Magnetoresistive LFIA readers</b>	Superparamagnetic nanoparticles	[45]
	Superparamagnetic maghemite nanoparticles	[46]
	Beads of 440 nm in diameter	[47]
	Superparamagnetic Maghemite nanoparticles (200 nm)	[48]
	Magnetic beads of 200 nm	[49]
	Superparamagnetic nanoparticles (10.5 nm)	[50]
	Superparamagnetic nanoparticles (10.5 nm)	[51]
	Superparamagnetic nanoparticles (80 nm)	[52]
	Superparamagnetic nanoparticles encapsulated in microspheres (198 nm)	[53]
	Paramagnetic particles (760 nm)	[54]
<b>Inductive LFIA readers</b>	Superparamagnetic nanoparticles (50 nm)	[55]
	Superparamagnetic nanoparticles encapsulated in microspheres (198 nm)	[56]
	Magnetic nanobeads (15, 80 and 200 nm)	[57]
	Superparamagnetic nanoparticles (140 nm)	[58]
	Superparamagnetic nanoparticles (15 nm)	[59]
	Superparamagnetic nanoparticles (140 nm)	[60]
	Colorimetric-Fluorescent-Magnetic nanospheres (300 nm)	[61]
	Superparamagnetic nanoparticles (10 nm)	[62]
	Superparamagnetic nanoparticles (200 nm)	[63]
	Superparamagnetic nanoparticles (10.5 nm)	[64]
Superparamagnetic magnetite nanoparticles	[65]	

### 3.2.1. Magnetoresistive LFIA Readers

Magnetoresistance (MR) is the dependence of the electrical resistivity on the applied magnetic field. Sensors based on this principle have been adapted to the dimensions of LFIA to detect the stray field fringes that the magnetic labels produce [45]. After calibration, the change in the sensor electrical resistance provides a measure of the number of particles, and consequently, the number of analytes immobilized at the strip test or control line.

Magnetoresistive sensors for biodetection are based on Giant MR (GMR) or Tunnel MR (TMR). GMR and TMR devices have an underlying common structure, namely, two ferromagnetic metal films separated by a non-magnetic film. The difference between the structures of these devices is in the non-magnetic spacer, which can be conductive (GMR) or insulating (TMR) (Figure 6A) [52]. The electrical resistance depends on the relative angle between the magnetization of the two ferromagnetic layers. When they are magnetized parallel, the resistance is small, and it increases for antiparallel alignment.



**Figure 6. (A)** Schemes of a Giant Magnetoresistance (GMR) sensor (left), and a Tunnel Magnetoresistance (TMR) sensor (right). **(B)** Scheme of the resistance of the MR sensor as a function of the applied field (black line). The MNP's magnetic moments align in the direction of the applied field, and their solenoidal magnetostatic field reduces the magnetization of the free layer (the magnetic field lines are

represented as grey dashed lines.) In consequence, if the applied field is positive, the resistance of the sensor decreases, and if it is negative, the resistance increases (red line).

In GMR, the multilayers can be engineered to have parallel/antiparallel alignment in the absence of field so that the resistance is low/high [66]. Frequently, one of the layers has a pinned or fixed magnetization (meaning that it is hard to revert, either because it is a hard ferromagnet, a field-cooled antiferromagnet or because it is magnetically pinned by an additional layer.) Then, the applied field tends to modify the magnetization of the free layer, so modifying the resistance (see the black line in the graph of Figure 6B). Typically, the relative change of resistance is on the order of 5–10%. There are different types of GMR structures, depending on the non-magnetic conducting spacer and the type of magnetic layers, such as antiferromagnetic superlattices, spin valves or pseudo-spin valves.

Some research groups have developed models adapted of GMR sensors for magnetic LFIA that show an excellent potential sensitivity and spatial resolution [45,46]. The basic idea of this detection is schematized in Figure 6B: When the LFIA is placed on top of the free layer of the sensor, and the magnetic nanoreporters are magnetized by the applied field, they produce below a magnetostatic field (whose field lines are represented by dashed grey lines) that effectively decreases the magnetic field in the free layer. In consequence, the MR response in the presence of the LFIA is given by the red line in Figure 6B. Taton *et al.* [47] achieved detection of only 12 pg/mL of interferon gamma (IFN $\gamma$ ), a result that is comparable to enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Serrate *et al.* [48] have reported a limit of detection for human chorionic gonadotropin hormone that is below the visual inspection limit (5.5 ng/mL). Ryu *et al.* [49] detected down to 0.01 ng/mL of the cardiac biomarker troponin I by reading out magnetic LFIA with a GMR sensor. Chicharro *et al.* [50] have developed a novel technique and detection architecture that include spin valves sensors, which present high sensitivity to the localized magnetic field in a single direction. It allows real-time measurements of flowing nanoparticles along the membrane, and can be used for dynamic quantification of analytes flowing through lateral flow strips [51].

In TMR (or magnetic tunnel junction MTJ) structures, the non-magnetic spacer is an electrical insulator, so thin that the electrons can tunnel through it. The tunnel crossing is more probable when both magnetizations are parallel. Then, also in this case, the applied field that produces alignment reduces the resistance. The magnetoresistance in TMR can be 5–10 times that of GMR, and the temperature drift and aging are smaller.

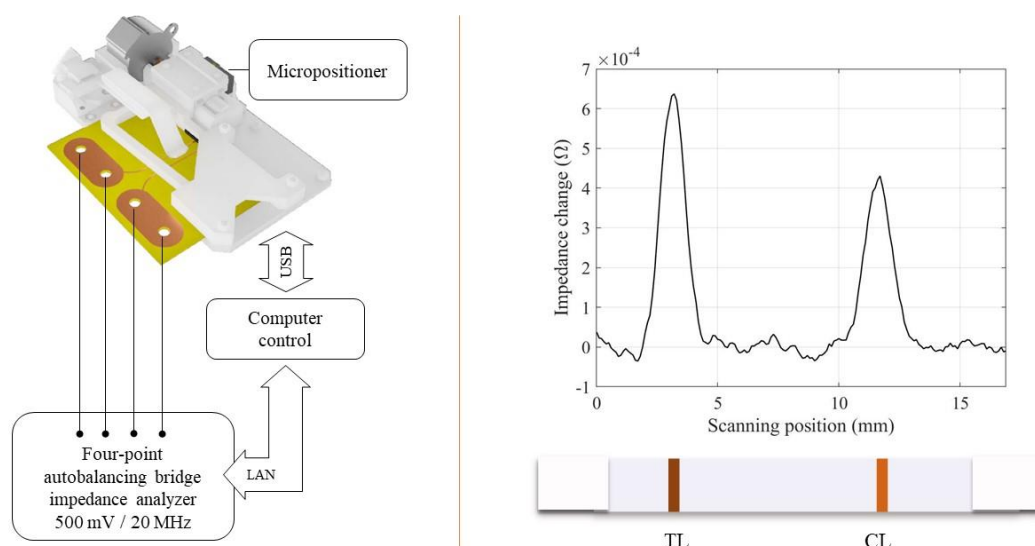
Although they can be more sensitive, the Flicker noise coming from resistance fluctuations in TMR sensors can be larger. The literature of TMR application to LFIA reading is still scarce. Nevertheless, Lei *et al.* [52] have reported promising results on human chorionic gonadotropin hormone quantification.

### **3.2.2. Inductive Readers**

The magnetic sensors based on Faraday electromagnetic induction can also be used for magnetic LFIA reading. Briefly, the magnetic nanolabels are excited by an alternating magnetic field and, in turn, produce a stray magnetic field that is captured by a pick-up coil. Depending on the design, the signal is proportional to a change of self-inductance, impedance or resonance frequency of the pick-up coil. Different solutions are proposed that differ in the geometry and shape of the coils, the connection of several coils or combination of exciting frequencies [53,67].

This technology allowed Barnett *et al.* [54] to quantify prostate specific antigen (PSA) with a LOD of 0.8 ng/mL, and Nikitin *et al.* [55] to quantify small molecules such as fluorescein, biotin and chloramphenicol. Orlov *et al.* [56] extended the system to multiplex detection by the use of multiple pick-up coils wound around the different test lines; they simultaneously detected Botulinum Neurotoxins A, B and E in liquid samples with a LOD around 0.2 ng/mL. Among the commercial magnetic readers, the device of MagnaBioSciences (LLC, CA, USA) is most widely used in research articles, according to the number of papers.[68]. This desktop device excites the particles with a C-shaped magnet, and the signal is picked up by an array of thin-film coils. It has been used, for example, for reading out LFIA for quantification of tumour markers or pathogens [57–61]. Gas *et al.* [63] have used Magnisense portable device [62] for quantification of marine toxic algae with LOD of  $5 \times 10^4$  cells/mL.

Our group has developed a portable inductive sensor that scans the LFIA strip and measures the change of impedance produced by the initial magnetic permeability of the particles at radio frequency (Figure 7). In particles below the critical volume for superparamagnetic behaviour, the thermal energy has an enormous influence on the magnetization orientation. At radio frequencies, these nanoparticles are magnetically very susceptible, which can be used for their inductive detection, even without any externally applied field [69,70]. This fact reduces the complexity and size of the overall device. Mechanical positioning is done by a PLA 3D-printed micro-positioner to avoid the use of any metallic moving parts that may induce artefacts in the measurement. We have applied this technique to the quantification of PSA in the clinical range of interest [64] and histamine directly in red wine [65].



**Figure 7. Left:** Scheme of the scanning inductive reader for magnetic LFIA. **Right:** Signal recorded for histamine competitive LFIA (blank sample, competitive immunoassay).

## 4. Fields of Application

### 4.1. Conventional Magnetic LFIA for Analyte Detection

Magnetic LFIAs have been used extensively in different fields: biomedicine, food, environmental control and drug monitoring. Regarding the agri-food sector, pathogen microorganisms (bacteria and virus), toxins and other hazardous molecules have been controlled and detected by magnetic LFIAs. For clinical analysis, proteins, cells and nucleic acids have been used in order to detect biomarkers, as well as hormones. In addition, the monitoring of drugs such as cocaine has been performed by means of LFIAs employing magnetic nanoparticles as labels. Table 3 and Table 4 summarize the latest magnetic LFIA reported with optical and magnetic detection, respectively.



**Table 3.** Most recent Magnetic LFIA with optical detection.

<b>Nanoparticles</b>	<b>Conjugation</b>	<b>Detection</b>	<b>Analyte</b>	<b>Limit of Detection</b>	<b>Reference</b>
<b>Pathogens</b>					
Gold magnetic nanoparticles	Via Au–S bonds	Visual detection	<i>Salmonella choleraesuis</i>	5 x 10 <sup>5</sup> CFU/mL	[37]
Gold magnetic nanoparticles	Via Au–S bonds	Colour intensity. ImageJ density analysis	<i>Salmonella</i>	10 <sup>3</sup> CFU/mL	[30]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Colour intensity. TotalLab TL120	Potato virus X	0.5 ng/mL	[71]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Colour intensity. TotalLab TL120	Potato virus X	0.25 ng/mL	[25]
Gold magnetic nanoparticles	Via Au–S bonds	Visual detection	Avian influenza virus subtype H7 (AIV H7)	10 <sup>3.5</sup> EID <sub>50</sub>	[33]
<b>Toxins and allergens</b>					
Gold magnetic nanoparticles	Via Au–S bonds	Visual detection	β-Conglutin	8 fM	[35]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Visual detection	Melamine	0.4 ppm for Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PEG 2.2 ppm for Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PEG	[72]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Visual detection	Furazolidone metabolite of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	0.044 ng/mL	[40]
<b>Biomarkers</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC chemistry	Visual detection	Carcinoembryonic antigen (CEA)	0.25 ng/mL	[73]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Reflectance measurements. ESE Quant LR3 (Qiagen Inc., Germany)	Extracellular vesicles (EVs)	10 <sup>7</sup> EVs/mL	[74]
Gold magnetic nanoparticles	EDC chemistry	Visual detection	Genotyping of MTHFR C677T	5 ng	[75]
Gold magnetic nanoparticles	CTAB-PSS modification (direct bonds)	Visual detection	Genotype Apolipoprotein E	10 ng	[76]
Gold magnetic nanoparticles	EDC chemistry	Visual detection	IgM class antibodies related infections	-	[77]

Magnetic nanoparticles	Periodate-based oxidation of the glycosylated Fc residues	Colour intensity. ImageJ density analysis	Human chorionic gonadotropin (hCG)	0.31 ng/mL	[78]
<b>Drugs</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Smart phone camera was used for quantitative analysis	Cocaine	5 ng/mL	[39]

**Table 4.** Most recent Magnetic LFIA with magnetic detection.

Nanoparticles	Conjugation	Detection	Analyte	Limit of Detection	Reference
<b>Pathogens</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.73 × 10 <sup>3</sup> CFU/mL	[60]
Colorimetric-Fluorescent-Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA) Fibre optic spectrometer	<i>Salmonella typhimurium</i>	1.88 × 10 <sup>4</sup> CFU/mL: naked detection 3.75 × 10 <sup>3</sup> CFU/mL: magnetic and fluorescent detection	[61]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Reader Miateks (Magnisense)	<i>Alexandrium minutum</i>	10 <sup>5</sup> cells/L	[63]
<b>Toxins and allergens</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Magnetic particle quantification (MPQ) method	Botulinum neurotoxin (BoNT) types A, B and E	0.22 ng/mL for BoNT-A 0.11 ng/mL for BoNT-B 0.32 ng/mL for BoNT-E	[56]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Novel sensor developed by authors Reflectance measurements. ESE Quant LR3 (Qiagen Inc., Germany)	Histamine	1.2 mg/L for magnetic sensor 1.5 mg/L for optical reader	[65]
<b>Biomarkers</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4)	0.38 IU/mL	[59]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Novel sensor developed by authors Reflectance measurements. ESE Quant LR3 (Qiagen Inc., Germany)	Prostate-Specific Antigen	0.25 ng/mL	[64]

## *Inmunoensayos magnéticos de flujo lateral*

Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Neuron specific enolase (NSE) carcinoembryonic antigen (CEA).	0.094 ng/mL for NSE 0.045 ng/mL for CEA	[57]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Magnetic particle quantification (MPQ) method	Thyroxine	20 fM	[79]
Magnetic nanoparticles	EDC Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP)	100 pg/mL	[80]
Gold magnetic nanoparticles	EDC Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Single nucleotide polymorphisms (SNPs)	0.04 pg/ $\mu$ L with plasmid	[36]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MIR system developed by authors	Troponin I (cTnI) Creatine kinase isoenzyme MB (CKMB) Myoglobin (Myo)	0.0089 ng/mL for cTnI 0.063 ng/mL for CKMB 0.05 ng/mL for Myo	[81]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Unconjugated estriol (uE3)	0.86 nmol/L	[82]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	D-dimer	0.05 $\mu$ g/mL	[83]
Gold magnetic nanoparticles	-	Magnetic quantitative immunoanalyzer	C-reactive protein (CRP)	0.15 mg/mL	[34]

Sandwich and competitive LFIAs are the most common formats. Tables 3, 4 and 5 show several competitive LFIA for detection of molecules of interest in different fields: melamine [72], furazolidone metabolite of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) [40], cocaine [39], histamine [65], thyroxine [79], unconjugated estriol (uE<sub>3</sub>) [82] and aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) [84]. In all cases, the competitive assays have been developed for small molecules. However, sandwich format is more suitable for larger mean size analytes such as proteins, virus or bacteria. The limits of detection for both formats are comparable, which implies that this parameter is independent of immunoassay structure. Hwang *et al.* [30] have reported a magnetic LFIA based on unconventional format. The test line was formed by pressing the nitrocellulose membrane to decrease its thickness instead of immobilizing specific antibodies against bacteria, as it is done at the conventional procedure. The free gold/magnetic nanoparticles passed through the pore until they reached the pressed test line. However, Salmonella–gold/magnetic nanoparticles complexes remained in the solution because they were too large to flow along the membrane. The flow of free gold/magnetic nanoparticles was blocked at the test line displaying the colour on spot, which was inversely proportional to the bacteria concentration.

**Table 5.** Other detection and magnetic nanoparticles used for immunomagnetic separation.

<b>Nanoparticles</b>	<b>Conjugation</b>	<b>Detection</b>	<b>Analyte</b>	<b>Limit of Detection</b>	<b>Reference</b>
Magnetic nanoparticles	Glutaraldehyde chemistry	Visual detection	<i>Campylobacter jejuni</i>	10 <sup>0</sup> with pure culture 10 <sup>1</sup> with poultry samples	[24]
Magnetic nanoparticles	Biotin-streptavidin affinity	Visual detection	<i>Listeria monocytogenes</i>	3.5 × 10 <sup>3</sup> CFU/mL for standards 3.5 × 10 <sup>4</sup> CFU/g in real samples	[85]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Electrochemical detection. Glucose meter	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	6.2 × 10 <sup>4</sup> CFU/mL	[86]
Gold magnetic nanoparticles	Via Au–S bonds	Visual detection	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella typhimurium</i>	23 CFU/mL for E. coli 17 CFU/mL for Salmonella	[87]
Magnetic nanoparticles	Glutaraldehyde chemistry	Visual detection.	<i>Enterobacter cloacae</i>	10 <sup>2</sup> CFU/mL	[88]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Fluorescent detection	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 <sup>4</sup> CFU/mL	[89]
Fluorescent magnetic nanoparticles	EDC chemistry	Fluorescent detection. Fluorescent strip reader (Suzhou Hemai Precision Instrument Co., Ltd. Jiangsu, China).	Aflatoxin B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> )	3 pg/mL in sauce extract 51 pg/mL in real dark soy sauce	[84]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Electrochemical detection. Glucose meter	Phospho-p53 <sup>15</sup>	50 pg/mL	[90]

The limit of detection reported for both systems, optical and magnetic, are similar, thus there are not significant differences when comparing similar type of analytes. However, the possibilities for MNPs combined with preconcentration steps have not yet been fully explored. The detection ranges for bacteria obtained are from  $10^3$  to  $10^5$  CFU/mL. For virus, it was possible to quantify levels as low as ng/mL [71] getting optical enhancement by means of double strategy based on (i) aggregation of magnetic nanoparticles with gold nanoparticles by biotin-streptavidin interactions, and (ii) preconcentration with a magnetic field [25]. The detectable concentration for other analytes is also in the nanogram per mL range for both optical and magnetic detection, although in some case concentrations lower than nanograms have been reached for magnetic-LFIA [36,80].

It is worth remarking that gold-magnetic nanoparticles have been reported widely as alternative nanocomposite. Their use does not affect negatively to the limit of detection and they combine optical and magnetic transduction with an easy conjugation to biomolecules. In addition, they can be used for IMS.

Regarding the crystal structure of magnetic nanoparticles, magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) has been the preferred option in order to develop LFIA. Li *et al.* [83] have used  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  instead of magnetite in order to achieve stronger magnetization. They hypothesized that the hybridization of iron and manganese atoms increased the spin magnetic moment between them, resulting in a higher total magnetic moment for the nanoparticle. Carboxyl groups on the MNP surface are the preferred functional groups for the development of LFIA, as shown in Tables 3, 4 and 5.

#### ***4.2. Immunomagnetic Separation in Combination with Other Transduction Systems***

Tables 3 and 4 show that magnetic nanoparticles have mainly been used as reporters, but they can also be used for IMS, which would lower the limit of detection in comparison with a standard LFIA. A strategy to preconcentrate the analyte from matrix or/and locate it in the detection zone (test line for LFIA) with an external magnetic field has been reported, showing the capacity to decrease the lowest detectable concentration [78]. In some applications, magnetic nanoparticles have been used to perform a double function simultaneously: separation and label for optical detection [25,35,78]. In other cases, gold and fluorescent nanoparticles have been employed in combination with magnetic nanoparticles in order to use optical nanoparticles for the transduction and magnetic nanoparticles for the IMS [85,88,89]. Nanocomposites combining magnetic

nanoparticles with gold or fluorescent nanomaterials have also been reported to get the same double function [84,87]. This approach has enabled the detection of 100 CFU/mL for bacteria [24] and biomarkers in picogram range [36,84].

MNP have been used for IMS in combination with other detection systems to improve sensitivity (visual, electrochemical and fluorescent), as shown in Table 5. Poonlapdecha *et al.* [24] preconcentrated *Campylobacter jejuni* present in poultry samples by IMS for subsequent DNA extraction and nucleic acid detection by LFIA. Li *et al.* [85] employed a similar procedure for detection of *Listeria monocytogenes* in lettuce samples. In addition, IMS as previous pretreatment to fluorescent LFI was employed to detect *Listeria monocytogenes* [89]. Nanocomposites containing magnetic and fluorescent nanoparticles were developed to combine IMS with fluorescence detection of toxins [84]. IMS combined with colloidal gold-based LFIA for detection of *Enterobacter cloacae* enhanced the sensitivity in comparison with conventional LFIA [88]. Other strategy that combine gold nanoparticles based LFIA with magnetic gold nanostructure for bacteria detection was developed [87]. In this case, magnetic nanostructures were used to locate the analyte at the detection zone by means of external magnet, in order to increase the reaction time for the immunoassay. The authors have also employed enzymes conjugated to gold nanoparticles to enable an extra-colour change and enhance the sensitivity.

Electrochemical transductions have been reported coupled to magnetic LFIA by means of personal blood glucose meters, which are widely used as point of care devices for people with diabetes. *Escherichia coli* was quantified by using these personal glucometers [86]. The strategy is based on the use of magnetic nanoparticles attached to invertase and antibodies against *E. coli* in order to carry out both electrochemical transduction and IMS. A different approach using these devices to quantify a biomarker of gamma-radiation exposure has recently been reported [90]. In this case, magnetic nanoparticles functionalized with specific antibodies have been used to locate the analyte in the test line with the help of a magnet. Then glucose-encapsulating liposomes were used as labels for electrochemical detection. The limit of detection obtained by personal glucose meters (Table 5) are comparable with other detection methods described previously.

Table 6 shows the limit of detection improvements by combining the detection principle with IMS.

**Table 6.** Limit of detection improvements using IMS.

Analyte	Limit of Detection Using LFIA	Limit of Detection Using LFIA in Combination with IMS	References
<b>Gold nanoparticles as label</b>			
<i>Campylobacter jejuni</i>	10 <sup>5</sup> cfu/mL for gold nanoparticles (pure culture) 10 <sup>4</sup> cfu/mL for quantum dots (pure culture)	10 <sup>0</sup> cfu/mL (pure culture) 10 <sup>1</sup> cfu/mL (poultry sample)	[24,91,92]
<i>Listeria monocytogenes</i>	10 <sup>4</sup> cfu/mL for superparamagnetic nanoparticles 3.7 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL for gold nanoparticles	3.5 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL (buffer) 3.5 × 10 <sup>4</sup> cfu/g (lettuce samples)	[58,85,93]
<i>E. coli O157:H7</i> and <i>Salmonella typhimurium</i>	<i>E. coli O157:H7</i> 10 <sup>5</sup> cfu/mL for gold nanoparticles 10 <sup>4</sup> cfu/mL for fluorescent microspheres <i>Salmonella typhimurium</i> 10 <sup>4</sup> cfu/mL for gold nanoparticles	23 CFU/mL for <i>E. coli</i> 17 CFU/mL for <i>Salmonella</i>	[87,94,95]
<i>Potato virus X</i>	0.25 ng/mL for combination of magnetic nanoparticles with gold nanoparticles	8 ng/mL	[25]
<i>Enterobacter cloacae</i>	10 <sup>3</sup> cfu/mL for gold nanoparticles	10 <sup>2</sup> cfu/mL	[88]
$\beta$ -conglutin	5 nM for gold nanoparticles	8 fM	[35]
<b>Fluorescent nanoparticles</b>			
Aflatoxin B1	10 $\mu$ g/mL for gold nanoparticles 0.1 ng/mL for silver@gold nanoparticles	3 pg/mL in sauce extract 51 pg/mL in real dark soy sauce	[84,96,97]
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.7 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL for gold nanoparticles	10 <sup>4</sup> CFU/mL	[89,93]
<b>Electrochemical detection</b>			
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	10 <sup>5</sup> cfu/mL for gold nanoparticles 10 <sup>4</sup> cfu/mL for fluorescent microspheres	6.2 × 10 <sup>4</sup> CFU/mL	[86,95]

## 5. Conclusions

The development of LFIA using magnetic nanoparticles has emerged as a research field of great interest in the past five years. Magnetic-LFIA would enable POCT instruments to detect biomarkers, pathogens, toxins, allergens and drugs. At present, there are different magnetic transducers under research that could be coupled to LFIA. Some commercial readers, based on magnetic and optical transduction, are also available.



The control on the properties of the nanoparticles used is crucial for the development of the applications. Gold-magnetic core-shell nanoparticles have been employed as alternative to conventional nanoparticles in order to combine the properties of both materials. Nanocomposites with both materials have attracted a lot of interest to combine both the superparamagnetism of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and the surface chemistry of Au component. This enables an easy functionalization in addition to a simple separation. Although MNP are mainly used as labels, they can be employed for IMS as well, either as a previous step to LFIA or to concentrate the analyte at the detection zone. The most common functional group use to functionalize MNP is carboxyl group, which allows an easy conjugation to biomolecules with amine groups by carbodiimide chemistry. The magnetic nanoparticles sizes reported vary from 10 nm to 400 nm and magnetite has been the most employed crystalline structure.

The analysis of the literature reported in this review indicates that magnetic LFIAs with quantitative capability are a suitable alternative to develop quantitative biosensors for a wide range of applications.

**Author Contributions:** writing—original draft preparation, A.M., M.C.B-L. and M.R.; writing—review and editing, A.M., M.C.B-L., M.R., E.S-P., M.S. and J.C.M-G; funding acquisition, M.C.B-L. and M.R.; supervision, M.C.B-L. and M.R.

**Funding:** This work was supported in part by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under projects MAT2017-84959-C2-1-R and the Principality of Asturias (Spain) under project IDI/2018/000185. Amanda Moyano was supported by a “Severo Ochoa” fellowship (Consejería de Educación y Cultura del Gobierno del Principado de Asturias, grant BP17-152).

**Acknowledgments:** Some figures were created using BioRender.com.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## **References**

1. Vashist, S.K.; Lippa, P.B.; Yeo, L.Y.; Ozcan, A.; Luong, J.H.T. Emerging Technologies for Next-Generation Point-of-Care Testing. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 692–705.
2. Klonoff, D.C. Point-of-care blood glucose meter accuracy in the hospital setting. *Diabetes Spectr.* **2014**, *27*, 174–179.
3. Dincer, C.; Bruch, R.; Kling, A.; Dittrich, P.S.; Urban, G.A. Multiplexed Point-of-Care Testing—xPOCT. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 728–742.

4. Yager, P.; Domingo, G.J.; Gerdes, J. Point-of-Care Diagnostics for Global Health. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2008**, *10*, 107–144.
5. Choi, J.R.; Yong, K.W.; Choi, J.Y.; Cowie, A.C. Emerging point-of-care technologies for food safety analysis. *Sensors* **2019**, *19*, 1–31.
6. Lau, H.Y.; Botella, J.R. Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–14.
7. Cummins, B.M.; Ligler, F.S.; Walker, G.M. Point-of-care diagnostics for niche applications. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 161–176.
8. Luzzi, V. Point of Care Devices for Drugs of Abuse Testing, 2nd ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2019; ISBN 9780128156070.
9. Mandal, N.; Mitra, S.; Bandyopadhyay, Di. Paper-Sensors for Point-of-Care Monitoring of Drinking Water Quality. *IEEE Sens. J.* **2019**, *19*, 7936–7941.
10. Li, Z.; Yi, Y.; Luo, X.; Xiong, N.; Liu, Y.; Li, S.; Sun, R.; Wang, Y.; Hu, B.; Chen, W.; et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J. Med. Virol.* **2020**.
11. Quesada-González, D.; Merkoçi, A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *73*, 47–63.
12. Petrakova, A.V.; Urusov, A.E.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Gold nanoparticles of different shape for bicolor lateral flow test. *Anal. Biochem.* **2019**, *568*, 7–13.
13. Available online: <https://www.expedeon.com/resources/applications/lateral-flow-immunoassay/> (accessed on February 2020).
14. Sotnikov, D.V.; Barshevskaya, L.V.; Zherdev, A. V applied sciences Immunochromatographic System for Serodiagnostics of Cattle Brucellosis Using Gold Nanoparticles and Signal Amplification with Quantum Dots. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 738.
15. Yang, X.; Liu, L.; Hao, Q.; Zou, D.; Zhang, X.; Zhang, L.; Li, H.; Qiao, Y.; Zhao, H.; Zhou, L. Development and evaluation of Up-Converting phosphor technology-based lateral flow assay for quantitative detection of NT-proBNP in blood. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–13.
16. Aktas, G.B.; Wichers, J.H.; Skouridou, V.; van Amerongen, A.; Masip, L. Nucleic acid lateral flow assays using a conjugate of a DNA binding protein and carbon nanoparticles. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 426.
17. Qiu, W.; Baryeh, K.; Takalkar, S.; Chen, W.; Liu, G. Carbon nanotube-based lateral flow immunoassay for ultrasensitive detection of proteins: Application to the determination of IgG. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 436.
18. Wang, Z.; Jing, J.; Ren, Y.; Guo, Y.; Tao, N.; Zhou, Q.; Zhang, H.; Ma, Y.; Wang, Y. Preparation and application of selenium nanoparticles in a lateral flow immunoassay for clenbuterol detection. *Mater. Lett.* **2019**, *234*, 212–215.
19. Liu, C.; Jia, Q.; Yang, C.; Qiao, R.; Jing, L.; Wang, L.; Xu, C.; Gao, M. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle aggregates as color reagents. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6778–6784.

20. Rodríguez, M.O.; Covián, L.B.; García, A.C.; Blanco-López, M.C. Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays. *Talanta* **2016**, *148*, 272–278.
21. Blanco-Covián, L.; Montes-García, V.; Girard, A.; Fernández-Abedul, M.T.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Faulds, K.; Graham, D.; Blanco-López, M.C. Au@Ag SERRS tags coupled to a lateral flow immunoassay for the sensitive detection of pneumolysin. *Nanoscale* **2017**, *9*, 2051–2058.
22. Park, J.M.; Jung, H.W.; Chang, Y.W.; Kim, H.S.; Kang, M.J.; Pyun, J.C. Chemiluminescence lateral flow immunoassay based on Pt nanoparticle with peroxidase activity. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *853*, 360–367.
23. Leem, H.; Shukla, S.; Song, X.; Heu, S.; Kim, M. An Efficient Liposome-Based Immunochromatographic Strip Assay for the Sensitive Detection of SalmonellaTyphimurium in Pure Culture. *J. Food Saf.* **2014**, *34*, 239–248.
24. Poonlapdech, W.; Seetang-Nun, Y.; Wonglumsom, W.; Tuitemwong, K.; Erickson, L.E.; Hansen, R.R.; Tuitemwong, P. Antibody-conjugated ferromagnetic nanoparticles with lateral flow test strip assay for rapid detection of Campylobacter jejuni in poultry samples. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *286*, 6–14.
25. Razo, S.C.; Panferov, V.G.; Safenkova, I.V.; Varitsev, Y.A.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1007*, 50–60.
26. Anwar, S.; Khawja, M.; Ficiar, E.; Ruffinatti, F.A.; Stura, I.; Argenziano, M.; Abollino, O.; Cavalli, R.; Guiot, C.; Agata, F.D. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis , Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System. *Materials* **2019**, *12*, 465.
27. Mourdikoudis, S.; Pallares, R.M.; Thanh, N.T.K. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* **2018**, *10*, 12871–12934.
28. Sandler, S.E.; Fellows, B.; Thompson Mefford, O. Best Practices for Characterization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 14159–14169.
29. Du, J.; Zhao, Y.; Yang, Z.; Xu, C.; Lu, Y.; Pan, Y.; Shi, D.; Wang, Y. Influence of controlled surface functionalization of magnetic nanocomposites on the detection performance of immunochromatographic test. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *237*, 817–825.
30. Hwang, J.; Kwon, D.; Lee, S.; Jeon, S. Detection of: Salmonella bacteria in milk using gold-coated magnetic nanoparticle clusters and lateral flow filters. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 48445–48448.
31. Chen, Z.; Wu, C.; Zhang, Z.; Wu, W.; Wang, X.; Yu, Z. Synthesis, functionalization, and nanomedical applications of functional magnetic nanoparticles. *Chin. Chem. Lett.* **2018**, *29*, 1601–1608.
32. Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, *16*, 023501.

33. Huang, J.; Xie, Z.; Xie, L.; Xie, Z.; Luo, S.; Deng, X.; Huang, L.; Zeng, T.; Zhang, Y.; Wang, S.; et al. Au/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core-shell nanoparticles are an efficient immunochromatography test strip performance enhancer—A comparative study with Au and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 14064–14071.
34. Zhang, L.; Zhang, Q.; Gao, M.; Luo, Z.; Zhang, Y.; Li, X.; Hua, K.; Zhang, C.; Lai, W.; Cui, Y. Clinical experimental study of GoldMag<sup>®</sup> immunochromatography in high sensitive C reactive protein detection from whole blood and plasma. *J. Magn. Magn. Mater.* **2019**, *473*, 68–73.
35. Wu, Z.; He, D.; Xu, E.; Jiao, A.; Chughtai, M.F.J.; Jin, Z. Rapid detection of β-conglutin with a novel lateral flow aptasensor assisted by immunomagnetic enrichment and enzyme signal amplification. *Food Chem.* **2018**, *269*, 375–379.
36. Liu, X.; Zhang, C.; Liu, K.; Wang, H.; Lu, C.; Li, H.; Hua, K.; Zhu, J.; Hui, W.; Cui, Y.; et al. Multiple SNPs Detection Based on Lateral Flow Assay for Phenylketonuria Diagnostic. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 3430–3436.
37. Xia, S.; Yu, Z.; Liu, D.; Xu, C.; Lai, W. Developing a novel immunochromatographic test strip with gold magnetic bifunctional nanobeads (GMBN) for efficient detection of Salmonella choleraesuis in milk. *Food Control* **2016**, *59*, 507–512.
38. Thobhani, S.; Attree, S.; Boyd, R.; Kumarswami, N.; Noble, J.; Szymanski, M.; Porter, R.A. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *J. Immunol. Methods* **2010**, *356*, 60–69.
39. Wu, J.; Dong, M.; Zhang, C.; Wang, Y.; Xie, M.; Chen, Y. Magnetic lateral flow strip for the detection of cocaine in urine by naked eyes and smart phone camera. *Sensors* **2017**, *17*, 1286.
40. Yan, L.; Dou, L.; Bu, T.; Huang, Q.; Wang, R.; Yang, Q.; Huang, L.; Wang, J.; Zhang, D. Highly sensitive furazolidone monitoring in milk by a signal amplified lateral flow assay based on magnetite nanoparticles labeled dual-probe. *Food Chem.* **2018**, *261*, 131–138.
41. Pilavaki, E.; Demosthenous, A. Optimized lateral flow immunoassay reader for the detection of infectious diseases in developing countries. *Sensors* **2017**, *17*, 1–11.
42. Eltzov, E.; Guttel, S.; Low Yuen Kei, A.; Sinawang, P.D.; Ionescu, R.E.; Marks, R.S. Lateral Flow Immunoassays - from Paper Strip to Smartphone Technology. *Electroanalysis* **2015**, *27*, 2116–2130.
43. Ruppert, C.; Phogat, N.; Laufer, S.; Kohl, M.; Deigner, H.P. A smartphone readout system for gold nanoparticle-based lateral flow assays: Application to monitoring of digoxigenin. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 119.
44. Saisin, L.; Amarit, R.; Somboonkaew, A.; Gajanandana, O.; Himananto, O.; Sutapun, B. Significant sensitivity improvement for camera-based lateral flow immunoassay readers. *Sensors* **2018**, *18*, 1–8.
45. Park, J. A giant magnetoresistive reader platform for quantitative lateral flow immunoassays. *Sens. Actuators A Phys.* **2016**, *250*, 55–59.

46. Marquina, C.; De Teresa, J.M.; Serrate, D.; Marzo, J.; Cardoso, F.A.; Saurel, D.; Cardoso, S.; Freitas, P.P.; Ibarra, M.R. GMR sensors and magnetic nanoparticles for immunochromatographic assays. *J. Magn. Magn. Mater.* **2012**, *324*, 3495–3498.
47. Taton, K.; Johnson, D.; Guire, P.; Lange, E.; Tondra, M. Lateral flow immunoassay using magnetoresistive sensors. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1679–1682.
48. Serrate, D.; De Teresa, J.M.; Marquina, C.; Marzo, J.; Saurel, D.; Cardoso, F.A.; Cardoso, S.; Freitas, P.P.; Ibarra, M.R. Quantitative biomolecular sensing station based on magnetoresistive patterned arrays. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35*, 206–212.
49. Ryu, Y.; Jin, Z.; Kang, M.S.; Kim, H.S. Increase in the detection sensitivity of a lateral flow assay for a cardiac marker by oriented immobilization of antibody. *Biochip J.* **2011**, *5*, 193–198.
50. Chicharo, A.; Cardoso, F.; Cardoso, S.; Freitas, P.P. Dynamical detection of magnetic nanoparticles in paper microfluidics with spin valve sensors for point-of-care applications. *IEEE Trans. Magn.* **2014**, *50*, 1–4.
51. Chicharo, A.; Cardoso, F.; Cardoso, S.; Freitas, P.J.P. Real-time monitoring of magnetic nanoparticles diffusion in lateral flow microporous membrane using spin valve sensors. *IEEE Trans. Magn.* **2015**, *51*, 1–4.
52. Lei, H.; Wang, K.; Ji, X.; Cui, D. Contactless measurement of magnetic nanoparticles on lateral flow strips using tunneling magnetoresistance (TMR) sensors in differential configuration. *Sensors* **2016**, *16*, 2130.
53. Guteneva, N.V.; Znoyko, S.L.; Orlov, A.V.; Nikitin, M.P.; Nikitin, P.I. Volumetric registration of magnetic nanoparticles for optimization of quantitative immunochromatographic assays for detection of small molecules. *EPJ Web Conf.* **2018**, *185*, 10006.
54. Barnett, J.M.; Wraith, P.; Kiely, J.; Persad, R.; Hurley, K.; Hawkins, P.; Luxton, R. An inexpensive, fast and sensitive quantitative lateral flow magneto-immunoassay for total prostate specific antigen. *Biosensors* **2014**, *4*, 204–220.
55. Nikitin, M.P.; Orlov, A.V.; Znoyko, S.L.; Bragina, V.A.; Gorshkov, B.G.; Ksenevich, T.I.; Cherkasov, V.R.; Nikitin, P.I. Multiplex biosensing with highly sensitive magnetic nanoparticle quantification method. *J. Magn. Magn. Mater.* **2018**, *459*, 260–264.
56. Orlov, A.V.; Znoyko, S.L.; Cherkasov, V.R.; Nikitin, M.P.; Nikitin, P.I. Multiplex Biosensing Based on Highly Sensitive Magnetic Nanolabel Quantification: Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins A, B, and e in Liquids. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 10419–10426.
57. Lu, W.; Wang, K.; Xiao, K.; Qin, W.; Hou, Y.; Xu, H.; Yan, X.; Chen, Y.; Cui, D.; He, J. Dual Immunomagnetic Nanobeads-Based Lateral Flow Test Strip for Simultaneous Quantitative Detection of Carcinoembryonic Antigen and Neuron Specific Enolase. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10.
58. Shi, L.; Wu, F.; Wen, Y.; Zhao, F.; Xiang, J.; Ma, L. A novel method to detect *Listeria monocytogenes* via superparamagnetic lateral flow immunoassay. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 529–535.

59. Chen, Y.; Wang, K.; Liu, Z.; Sun, R.; Cui, D.; He, J. Rapid detection and quantification of tumor marker carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4) using a superparamagnetic immunochromatographic strip. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 2319–2327.
60. Liu, Y.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Lu, Y.; Xu, X.; Yan, J.; Pan, Y. A highly sensitive and flexible magnetic nanoprobe labeled immunochromatographic assay platform for pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *211*, 109–116.
61. Hu, J.; Jiang, Y.Z.; Tang, M.; Wu, L.L.; Xie, H.Y.; Zhang, Z.L.; Pang, D.W. Colorimetric-Fluorescent-Magnetic Nanosphere-Based Multimodal Assay Platform for *Salmonella* Detection. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 1178–1184.
62. Motte, L.; Benyettou, F.; De Beaucorps, C.; Lecouvey, M.; Milesovic, I.; Lalatonne, Y. Multimodal superparamagnetic nanoplatform for clinical applications: Immunoassays, imaging & therapy. *Faraday Discuss.* **2011**, *149*, 211–225.
63. Gas, F.; Baus, B.; Queré, J.; Chapelle, A.; Dreanno, C. Rapid detection and quantification of the marine toxic algae, *Alexandrium minutum*, using a super-paramagnetic immunochromatographic strip test. *Talanta* **2016**, *147*, 581–589.
64. Lago-Cachón, D.; Oliveira-Rodríguez, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C.; Martínez-García, J.C.; Moyano, A.; Salvador, M.; García, J.A. Scanning Magneto-Inductive Sensor for Quantitative Assay of Prostate-Specific Antigen. *IEEE Magn. Lett.* **2017**, *8*, 1–5.
65. Moyano, A.; Salvador, M.; Martínez-García, J.C.; Socoliuc, V.; Vékás, L.; Peddis, D.; Alvarez, M.A.; Fernández, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C. Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 6615–6624.
66. Hall, D.A.; Gaster, R.S.; Lin, T.; Osterfeld, S.J.; Han, S.; Murmann, B.; Wang, S.X. GMR biosensor arrays: A system perspective. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2051–2057.
67. J. J. Makiranta and J. O. Leikkala. Modeling and Simulation of Magnetic Nanoparticle Sensor. *2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference*, Shanghai, 2005, 1256-1259.
68. MagnaBioSciences, LLC. Available online: <http://www.magnabiosciences.com/> (accessed on February 2020).
69. Lago-Cachón, D.; Rivas, M.; Martínez-García, J.C.; García, J.A. Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 245501.
70. Rivas, M.; Lago-Cachón, D.; Martínez-García, J.C.; García, J.A.; Calleja, A.J. Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits. *Sens. Actuators A Phys.* **2014**, *216*, 123–127.
71. Panferov, V.G.; Safenkova, I.V.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Setting up the cut-off level of a sensitive barcode lateral flow assay with magnetic nanoparticles. *Talanta* **2017**, *164*, 69–76.
72. Huang, W.-C.; Wu, K.-H.; Hung, H.-C.; Wang, J.-C.; Chang, S.-C. Magnetic Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunochromatographic Strip as a Reporter for Rapid Detection of Melamine. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2018**, *18*, 7190–7196.

73. Liu, F.; Zhang, H.; Wu, Z.; Dong, H.; Zhou, L.; Yang, D.; Ge, Y.; Jia, C.; Liu, H.; Jin, Q.; et al. Highly sensitive and selective lateral flow immunoassay based on magnetic nanoparticles for quantitative detection of carcinoembryonic antigen. *Talanta* **2016**, *161*, 205–210.
74. Oliveira-Rodríguez, M.; Serrano-Pertierra, E.; García, A.C.; Martín, S.L.; Mo, M.Y.; Cernuda-Morollón, E.; Blanco-López, M.C. Point-of-care detection of extracellular vesicles: Sensitivity optimization and multiple-target detection. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 38–45.
75. Hui, W.; Zhang, S.; Zhang, C.; Wan, Y.; Zhu, J.; Zhao, G.; Wu, S.; Xi, D.; Zhang, Q.; Li, N.; et al. A novel lateral flow assay based on GoldMag nanoparticles and its clinical applications for genotyping of MTHFR C677T polymorphisms. *Nanoscale* **2016**, *8*, 3579–3587.
76. Lian, T.; Hui, W.; Li, X.; Zhang, C.; Zhu, J.; Li, R.; Wan, Y.; Cui, Y. Apolipoprotein e genotyping using PCR-GoldMag lateral flow assay and its clinical applications. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 4153–4161.
77. Li, X.; Zhang, Q.; Hou, P.; Chen, M.; Hui, W.; Vermorken, A.; Luo, Z.; Li, H.; Li, Q.; Cui, Y. Gold magnetic nanoparticle conjugate-based lateral flow assay for the detection of IgM class antibodies related to TORCH infections. *Int. J. Mol. Med.* **2015**, *36*, 1319–1326.
78. Jacinto, M.J.; Trabuco, J.R.C.; Vu, B.V.; Garvey, G.; Khodadady, M.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros, M.R.; Chang, L.; Kourentzi, K.; Litvinov, D.; et al. Enhancement of lateral flow assay performance by electromagnetic relocation of reporter particles. *PLoS ONE* **2018**, *13*, 1–14.
79. Znoyko, S.L.; Orlov, A.V.; Pushkarev, A.V.; Mochalova, E.N.; Guteneva, N.V.; Lunin, A.V.; Nikitin, M.P.; Nikitin, P.I. Ultrasensitive quantitative detection of small molecules with rapid lateral-flow assay based on high-affinity bifunctional ligand and magnetic nanolabels. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1034*, 161–167.
80. Yang, D.; Ma, J.; Xue, C.; Wang, L.; Wang, X. One-pot synthesis of poly (acrylic acid)-stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystal clusters for the simultaneously qualitative and quantitative detection of biomarkers in lateral flow immunoassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *159*, 119–126.
81. Hong, L.; Wang, K.; Yan, W.; Xu, H.; Chen, Q.; Zhang, Y.; Cui, D.; Jin, Q.; He, J. High performance immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of multiplex cardiac markers based on magnetic nanobeads. *Theranostics* **2018**, *8*, 6121–6131.
82. Wang, C.; Guan, D.; Chen, C.; He, S.; Liu, X.; Wang, C.; Wu, H. Rapid detection of unconjugated estriol in the serum via superparamagnetic lateral flow immunochromatographic assay. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 123–130.
83. Li, X.; Wang, Y.; Tang, Q.; Li, Q. MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoclusters as labels for the quantitative detection of D-dimer in a lateral-flow immunochromatographic assay. *J. Chinese Chem. Soc.* **2019**, *66*, 297–302.
84. Guo, L.; Shao, Y.; Duan, H.; Ma, W.; Leng, Y.; Huang, X.; Xiong, Y. Magnetic Quantum Dot Nanobead-Based Fluorescent Immunochromatographic Assay for the Highly Sensitive Detection of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Dark Soy Sauce. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 4727–4734.

85. Li, F.; Li, F.; Luo, D.; Lai, W.; Xiong, Y.; Xu, H. Biotin-exposure-based immunomagnetic separation coupled with nucleic acid lateral flow biosensor for visibly detecting viable *Listeria monocytogenes*. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1017*, 48–56.
86. Huang, H.; Zhao, G.; Dou, W. Portable and quantitative point-of-care monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 using a personal glucose meter based on immunochromatographic assay. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *107*, 266–271.
87. Ren, W.; Cho, I.H.; Zhou, Z.; Irudayaraj, J. Ultrasensitive detection of microbial cells using magnetic focus enhanced lateral flow sensors. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4930–4933.
88. Zhang, X.; Zhou, J.; Zhang, C.; Zhang, D.; Su, X. Rapid detection of *Enterobacter cloacae* by immunomagnetic separation and a colloidal gold-based immunochromatographic assay. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 1279–1287.
89. Li, Q.; Zhang, S.; Cai, Y.; Yang, Y.; Hu, F.; Liu, X.; He, X. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using fluorescence immunochromatographic assay combined with immunomagnetic separation technique. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52*, 1559–1566.
90. Zhao, Y.; Chen, X.; Lin, S.; Du, D.; Lin, Y. Integrated immunochromatographic strip with glucometer readout for rapid quantification of phosphorylated proteins. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *964*, 1–6.
91. Xu, F.; Xu, D.; Ming, X.; Xu, H.; Li, B.; Li, P.; Aguilar, Z.P.; Cheng, T.; Wu, X.; Wei, H. Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid detection of *Campylobacter jejuni*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 4552–4559.
92. Xu, D.; Wu, X.; Li, B.; Li, P.; Ming, X.; Chen, T.; Wei, H.; Xu, F. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* using fluorescent microspheres as label for immunochromatographic strip test. *Food Sci. Biotechnol.* **2013**, *22*, 585–591.
93. Wang, W.; Liu, L.; Song, S.; Xu, L.; Kuang, H.; Zhu, J.; Xu, C. Identification and quantification of eight *Listeria monocytogenes* serotypes from *Listeria* spp. using a gold nanoparticle-based lateral flow assay. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 715–724.
94. Moongkarndi, P.; Rodpai, E.; Kanarat, S. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Salmonella enterica* serovars typhimurium and enteritidis. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2011**, *23*, 797–801.
95. Xie, Q.Y.; Wu, Y.H.; Xiong, Q.R.; Xu, H.Y.; Xiong, Y.H.; Liu, K.; Jin, Y.; Lai, W.H. Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 262–265.
96. Liao, J.Y.; Li, H. Lateral flow immunodipstick for visual detection of aflatoxin B1 in food using immuno-nanoparticles composed of a silver core and a gold shell. *Microchim. Acta* **2010**, *171*, 289–295.
97. Moon, J.; Kim, G.; Lee, S. A Gold Nanoparticle and Aflatoxin B1-BSA Conjugates Based Lateral Flow Assay Method for the Analysis of Aflatoxin B1. *Materials* **2012**, *5*, 634–643.





© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## **PARTE B: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

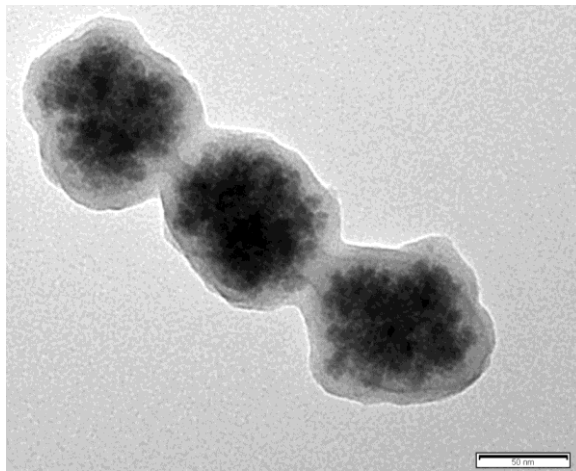


## CAPÍTULO B.1: Nanoflores como marca de detección en MLFIAs

---

### B.1.1 Introducción y motivación

Esta tesis persigue el aumento de la sensibilidad y eficacia de los LFIA. Para ello, siguiendo los resultados previos del grupo, se decidió estudiar la forma de amplificar la señal de las marcas de detección magnéticas utilizando partículas superparamagnéticas aglomeradas. En este capítulo se presenta el estudio realizado con nanopartículas multicore consistentes en pequeños núcleos de magnetita embebidos en una matriz de carbono con grupos funcionales carboxílicos ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ ). Estas partículas y parte de su caracterización fueron aportadas por el grupo NanoMag de la Universidad de Santiago de Compostela dirigido por el Prof. José Rivas en el marco de una colaboración científica. Hemos llamado “nanoflores” a estas partículas por su morfología que recuerda a la de una flor con múltiples pétalos (Figura 26)



**Figura 26.** Imagen de TEM para las MNPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ .

Las partículas tienen unos 130 nm y están compuestas por varios núcleos de magnetita (con un tamaño de 10-20 nm) recubiertos por una capa de carbono de 12 nm. Con estas partículas como marcas de detección se persiguieron varios objetivos:

- Amplificar la señal magnética respecto a MNPs de un solo núcleo. Con la estructura multi-core se aumenta el número de núcleos magnéticos por analito en el inmunoensayo.

- Mejorar la señal óptica en el inmunoensayo con respecto a otras MNPs con recubrimientos más convencionales. Se ha demostrado en la literatura que los nanomateriales de carbono, entre los que se encuentran las nanopartículas de carbono, muestran buenas señales visuales y ópticas.
- Permitir la separación magnética con el uso de imanes gracias a su estructura multicore. En general, las nanopartículas superparamagnéticas monodispersas son muy estables en disolución acuosa. Su aglomeración aumenta el momento magnético de cada partícula, lo que favorece su separación. Por tanto, este tipo de nanopartículas son prometedoras para su uso en inmunoseparación magnética.

Este capítulo engloba la caracterización de las nanopartículas y su primer estudio como potencial marca de detección con el sistema modelo de afinidad biotina-neutravidina. Una vez comprobada su viabilidad, se desarrolló un inmunoensayo de flujo lateral de tipo sándwich para la determinación de EVs a través de sus proteínas de membrana las tetraspaninas.

Se comprobó la habilidad de las partículas para la ISM y para la detección por reflectancia, tanto de neutravidina como de EVs. En este tipo de detección las partículas dieron resultados excelentes, superando a las tradicionales marcas de detección de oro. No así en la medida magnética, que resultó insuficiente para la determinación de EVs en los rangos de interés clínico (cabe destacar que no se utilizó en estas pruebas la ISM para aumentar la sensibilidad del método). Como conclusión de esta investigación destaca la posibilidad de utilizar las ventajas de estas partículas para realizar una pre-concentración magnética combinada con detección óptica.

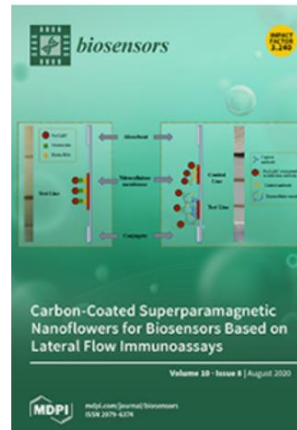
Este trabajo dio lugar a un artículo científico que se presenta a continuación y que contiene todos los detalles de la investigación. Fue publicado en la revista *Biosensors* en 2020 y seleccionado como portada de la edición (*cover issue*).

## B.1.2 Artículo científico

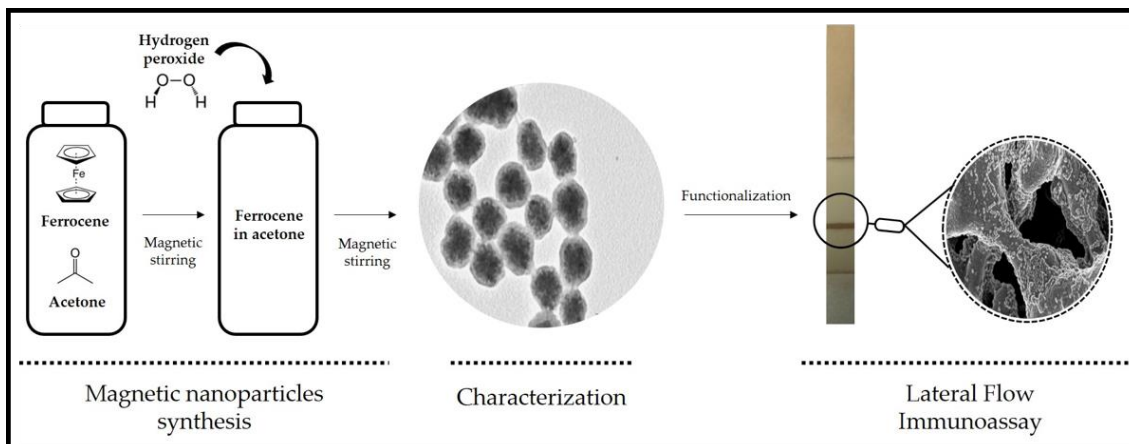
This work has been published as:

*Biosensors*, **2020**, 10(8), 80

and selected as cover issue



### GRAPHICAL ABSTRACT







Article

## Carbon-Coated Superparamagnetic Nanoflowers for Biosensors Based on Lateral Flow Immunoassays

Amanda Moyano<sup>1</sup>, Esther Serrano-Pertierra<sup>1</sup>, María Salvador<sup>2</sup>, José Carlos Martínez-García<sup>2</sup>, Yolanda Piñeiro<sup>3</sup>, Susana Yañez-Vilar<sup>3</sup>, Manuel González-Gómez<sup>3</sup>, José Rivas<sup>3</sup>, Montserrat Rivas<sup>2</sup> and M. Carmen Blanco-López<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry & Institute of Biotechnology of Asturias, University of Oviedo, c/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.

<sup>2</sup> Department of Physics & IUTA, University of Oviedo, Campus de Viesques, 33204 Gijón, Spain.

<sup>3</sup> Department of Applied Physics, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Spain

### ABSTRACT

---

Superparamagnetic iron oxide nanoflowers coated by a black carbon layer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ ) were studied as labels in lateral flow immunoassays. They were synthesized by a one-pot solvothermal route, and they were characterized (size, morphology, chemical composition, and magnetic properties). They consist of several superparamagnetic cores embedded in a carbon coating holding carboxylic groups adequate for bioconjugation. Their multi-core structure is especially efficient for magnetic separation while keeping suitable magnetic properties and appropriate size for immunoassay reporters. Their functionality was tested with a model system based on the biotin–neutravidin interaction. For this, the nanoparticles were conjugated to neutravidin using the carbodiimide chemistry, and the lateral flow immunoassay was carried out with a biotin test line. Quantification was achieved with both an inductive magnetic sensor and a reflectance reader. In order to further investigate the quantifying capacity of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoflowers, the magnetic lateral flow immunoassay was tested as a detection system for extracellular vesicles (EVs), a novel source of biomarkers with interest for liquid biopsy. A clear correlation between the extracellular vesicle concentration and the signal proved the potential of the nanoflowers as quantifying labels. The limit of detection in a rapid test for EVs was lower than the values reported before for other magnetic nanoparticle labels in the working range  $0\text{--}3 \times 10^7$  EVs/ $\mu\text{L}$ . The method showed a reproducibility (RSD) of 3% ( $n = 3$ ). The lateral flow immunoassay (LFIA) rapid test developed in this work yielded to satisfactory results for



EVs quantification by using a precipitation kit and also directly in plasma samples. Besides, these Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles are easy to concentrate by means of a magnet, and this feature makes them promising candidates to further reduce the limit of detection.

---

**KEYWORDS:** superparamagnetic iron oxide nanoflowers; lateral flow immunoassays; biosensor; extracellular vesicles; exosomes

## **1. Introduction**

The small size and the unique properties of magnetic nanoparticles have aroused considerable interest in the field of nanomedicine. In fact, they are currently being studied for biomedical applications such as hyperthermia, drug delivery, biosensors, and imaging [1,2]. Superparamagnetic nanoparticles (SPM NPs) are especially attractive due to their large saturation magnetization and initial magnetic permeability [3]. One of the most interesting features of SPM NPs is the possibility to be attracted by magnetic field gradient and then redispersed when the field is removed. This enables remote manipulation at immunoseparations for analytical determinations and other customized applications.

Magnetite and maghemite are the preferred crystal structures of iron oxide superparamagnetic nanoparticles due to their good magnetic response, biocompatibility, facile synthesis, and low-cost production. In addition, they can be modified with different surface coatings for electrosteric stabilization to prevent their uncontrolled agglomeration in solution [4]. Core/shell superparamagnetic nanoparticles are considered as a superparamagnetic core coated with other materials such as polymers, gold, silver, fatty acids, or surfactants, which increase colloidal stability and biocompatibility, preventing the oxidation of the iron oxide core and enhancing chemical versatility by linking functional groups [5]. A chemical versatile shell is desirable for the conjugation of bioreceptors such as antibodies, nucleotides, or peptides, which are used for molecular recognition of specific targets at analytical tests and devices [6].

Carbon coatings have several advantages as capping agents, since they are chemically stable, cheap, and light and allow an easy encapsulation of iron oxide cores [7–9]. Additionally, carbon films include carboxylic groups enabling the bioconjugation of nanoparticles with receptors for molecular recognition [10,11]. Carbon nanoparticles and other carbon nanomaterials have been reported as novel labels in lateral flow due to their advantages such as its strong color and its high contrast against the white background of nitrocellulose membrane [12,13]. Moreover, the limit of detection reached for these labels have been demonstrated to be better than those obtained with gold nanoparticles [14,15]. Therefore, the carbon coating can develop a strong visual signal as other carbon materials, and this could be advantageous when the nanoparticles are used in biosensors based on immunoassays.

In recent years, biosensors based on superparamagnetic nanoparticles have received considerable attention due to magnetic nanoparticles properties mentioned above, because they enhance the analytical figures of merit of biosensors such as

electrochemical, optical, and piezoelectric sensors [16]. The magnetic nanoparticles are generally used to attract the analyte towards the detection surface by an external magnetic field. Sometimes, they are even integrated into the sensor transducer. Numerous biosensors based on superparamagnetic nanoparticles have been reported by using electrochemical [17–19], optical [20,21], piezoelectric [22,23], and magnetic [24–27] transducers.

Lateral flow immunoassay (LFIA) is a rapid test that meets the requirements for point of care (POC) testing. It is simple and provides results within a short time without the necessity of centralized laboratory at low cost [28]. The tests consist of different cellulosic elements (sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane, and adsorption pad), which are assembled on a plastic backing to get robustness. Biorecognition elements are immobilized on the nitrocellulose membrane displaying lines (generally control and test lines), which become active upon flow of the liquid sample that contains the analyte of interest and nanoparticles. Generally, this kind of test relies on a visual signal, providing a yes/no response by means of colored nanoparticles such as gold or latex [29]. Magnetic nanoparticles are key players for the development of quantitative LFIA in combination with external magnetic transducers [30]. Additionally, magnetic nanoparticles have been used as colorimetric labels detected by naked-eye and optical readers due to their dark brown color easily distinguishable on white nitrocellulose membranes [31–33]. To date, several LFIA based on magnetic nanoparticles have been reported to detect and quantify human immunodeficiency virus (HIV) [34], allergen parvalbumin [35], and *Bacillus anthracis* spores [36,37] by means of a magnetic assays readers (MAR) system. The magnetic measurements require the excitation of the magnetic nanoparticles used as labels in the immunoassay by an oscillating magnetic field in order to quantify the magnetization of the nanoparticles. Moreover, magnetic nanoparticles can be used in order to purify and enrich analytes, enhancing the limits of detections and selectivity of conventional LFIA [38–41].

Our research group developed a novel magnetic sensor coupled to LFIA to quantify superparamagnetic nanoparticles immobilized at test and control lines. We used it to determine prostate specific antigen concentrations in the clinical range of interest by using a sandwich format [42] and histamine in wine following a competitive immunoassay [43]. For those studies, we used 10–12 nm size magnetic nanoparticles, which are stable in solution due to their electrostatic repulsion. The sensor is simpler compared with others, because the external field is not required. However, the superparamagnetism of the nanoparticles should be carefully optimized in order to produce the desired increase of impedance on a radio frequency (RF) current-carrying copper conductor [44,45]. This

impedance change is directly proportional to the number of magnetic nanoparticles. Thus, this device allows an indirect detection of analyte of interest thanks to magnetic reporters.

The aim of this work was to study the use of iron oxide nanoflowers coated by a black carbon layer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ ) as labels for LFIA. The nanoflower structure consists of several superparamagnetic cores embedded with an external carbon surface. This core-shell structure was designed aiming its use at both immunoseparation and detection; multiple cores are suitable for immunoisolation, and the carbon coating provides a strong optical signal, keeping the magnetic properties unaltered.

In order to test their applicability to LFIA, we firstly studied these  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles with a model affinity molecular recognition system. With this aim, we bioconjugated the particles to neutravidin and tested them against biotin printed across the membrane. Then, the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles were applied to an immunoassay for extracellular vesicles (EVs). EVs are nanovesicles produced by all cells via endocytosis processes. They carry proteins and nucleic acids from the original cell and therefore can be used to get molecular information about their parent cells. They are attracting a lot of attention in recent years as a source of non-invasive biomarkers for liquid biopsy. The bottleneck at EV research that is limiting industrial and clinical translations is the current isolation from biological fluids and the development of simple quantification methods. Our research group developed LFIA for EVs based on tetraspanin recognition [46,47]. In this work, as proof of concept, we tested the potential of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles to EVs separation and quantification.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Chemicals and Instruments**

Ferrocene ( $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ , 98%), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%), acetone ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ , 99.9%), bovine serum albumin (BSA), 1-ethyl-3 [3dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride (EDC), and 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) were of analytical reagent grade purchased from Aldrich (Madrid, Spain) and were used without further purification. NeutrAvidin protein was obtained from Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). For biotin–neutravidin tests, glass fiber membrane (GFCP001000) used as sample pad and backing cards (HF000MC100) were purchased from Millipore (Darmstadt, Germany). Other materials used were nitrocellulose membranes (UniSart CN95, Sartorius, Spain) and absorbent pads (Whatman, Madrid, Spain). The sample

buffer consisted of 10 mM phosphate buffer (PB) pH 7.4 with 0.5% Tween-20 and 1% BSA.

For EVs tests, nitrocellulose membranes (HF07504XSS) were purchased from Millipore (Germany). Other materials used for the preparation of strips were similar to the biotin-neutravidin test. Based on previous results, the sample buffer consisted of 10 mM HEPES pH 7.4 with 0.5% Tween-20 and 1% BSA. HEPES was purchased from Fisher Scientific (Madrid, Spain). Anti-tetraspanin antibodies anti-CD9 and anti-CD63 were provided by Immunostep (Salamanca, Spain). Anti-mouse IgG was purchased from Sigma-Aldrich (Spain). Lyophilized commercial exosomes purified from plasma (HBM-PEP) of healthy donors were purchased from HansaBioMed (Tallinn, Estonia).

In order to dispense the control and the detection lines, an IsoFlow reagent dispensing system (Imagene Technology, Lebanon, NH, USA) was used with a dispense rate of 0.100  $\mu\text{L}/\text{mm}$ . A guillotine Fellowes Gamma (Madrid, Spain) was used to cut the strips. For quantification at the test line by reflectance measurements, a portable strip reader ESE Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., GmbH, Hilden, Germany) was used.

### ***2.2. Synthesis and Characterization of Carbon-Coated Nanoflowers***

#### ***2.2.1. Synthesis***

The synthesis was carried out following a one-pot solvothermal method as previously reported by Wang [48]. Typically, ferrocene ( $m = 0.3 \text{ g}$ ) was dissolved in acetone ( $V = 25 \text{ mL}$ ) under vigorous magnetic stirring for 30 min; then, hydrogen peroxide ( $V = 1.5 \text{ mL}$ ) was slowly added into the above mixture solution and vigorously stirred for another 30 min. This precursor solution was transferred to the Teflon-lined stainless-steel autoclave (Parr Instrument, Illinois, IL, USA) with a total volume of 45.0 mL and heated to 210  $^{\circ}\text{C}$  for 96 h. Finally, the autoclave was cooled to room temperature, the reaction products were magnetically collected, and the supernatant was discarded. The precipitates were washed with acetone four times, and again, the products were magnetically separated to eliminate the acetone and were repeatedly washed with water.

#### ***2.2.2. Characterization***

Hysteresis loops were recorded with a vibrating sample magnetometer (VSM, DMS, Lowell, MA, USA) at room temperature and under external magnetic fields from -10,000 to 10,000 Oe.

Room temperature X-ray diffraction (XRD) patterns of powder samples were obtained with a Philips PW1710 diffractometer (Panalytical, Callo End, UK) with a Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.54186 \text{ \AA}$ ) between  $10^\circ$  and  $80^\circ$  with steps of  $0.02^\circ$  and 10 s/step.

The composition was analyzed with a TGA Perkin Elmer model 7 (Perkin, Waltham, MA, USA).

Fourier transform infrared (FTIR) spectra were performed in a Thermo Nicolet Nexus spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) using the attenuated total reflectance (ATR) method from 4000 to  $400 \text{ cm}^{-1}$ .

Scanning electron microscopy (SEM) with a Zeiss FE-SEM ULTRA Plus (5 kV) microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and transmission electron microscopy (TEM) with a JEOL JEM-1011 microscope (100 kV) were employed to study the morphology.

### **2.3. Bioconjugation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoflowers Coated by $\text{Fe}_3\text{O}_4@C$**

#### **2.3.1. Functionalization**

$\text{Fe}_3\text{O}_4@C$  with carboxyl functional groups were functionalized using neutravidin to test their performance as label in immunoassays through the neutravidin–biotin interaction. Firstly, 100  $\mu\text{L}$  of nanoflowers were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of neutravidin (different concentrations were studied) and 20  $\mu\text{L}$  of EDC (1 mg/mL in MES 1 mM, pH 6.00) under continuous sonication for one hour. Then, 20  $\mu\text{L}$  of EDC were added one hour and two hours after under sonication. After the last addition of EDC, the mixture was sonicated for 10 min.

The protocol to cover nanoflowers with neutravidin was adapted to bioconjugate the nanoflowers to antitetraspanin antibodies against EVs. Firstly, 50  $\mu\text{L}$  of nanoflowers were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of anti-CD63 (1 mg/mL) and 20  $\mu\text{L}$  of EDC (1 mg/mL in MES 1 mM, pH 6.00) under continuous sonication for one hour. Then, 20  $\mu\text{L}$  of EDC were added one hour and two hours after under sonication. After the last addition of EDC, the mixture was sonicated for 10 min.

#### **2.3.2. Characterization of Nanoparticles Conjugates by Dynamic Light Scattering**

A Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a solid-state He–Ne laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) was used to measure size distribution and  $\zeta$ -

potential. In order to monitor the conjugation process, 30 measurements of the backscattered (173°) intensity were carried out at 25 °C and averaged. For data analysis, Zetasizer software version 7.03 was used.

### **2.4. Enrichment and Quantification of EV from Real Samples**

Extracellular vesicles derived from human plasma samples were isolated using ExoQuick™ precipitation reagent (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Freshly isolated EVs were analyzed using a NanoSight LM10 instrument (Malvern, Worcestershire, UK) and NTA 3.1 software at Nanovex Biotechnologies S.L (Asturias, Spain).

### **2.5. Lateral Flow Assays**

#### **2.5.1. Preparation of the Strips**

The immunoassay was based on a dipstick format. The strips consist of four parts: sample pad, nitrocellulose membrane, absorbent pad, and backing plastic card. The first step was to incorporate the nitrocellulose membrane into the backing plastic card to get robustness. Then, for biotin–neutravidin affinity test, a biotin-BSA test line was immobilized on the membrane with a concentration of 1 mg/mL. An IsoFlow dispenser at a rate of 0.100 µL/mm was employed.

For EVs tests, two lines of antibodies were immobilized across the nitrocellulose strip: (i) the test line gave us the result of the analysis following a sandwich format and (ii) the control line was used to validate the strip indicating that the liquid sample flowed adequately along the strip. Both lines were applied by the IsoFlow dispenser at a rate of 0.100 µL/mm with 1 mg/mL concentration of anti-CD9 and anti-IgG for test line and control line, respectively.

The nitrocellulose membrane after dispensing was kept for 20 min at 37 °C. Finally, the absorbent pad and the sample pad were stuck onto the backing card overlapping them 2 mm. Finally, individual strips of 5 mm were cut. For storage, strips were kept at room temperature and preserved with desiccant bags to avoid moisture.

#### **2.5.2. Magnetic Quantification**

Quantification of the test line in the LFIA was provided by a Scanning MagnetInductive Sensor (SMISensor) specifically designed in-house for this task. The

sensing head consists of a double copper line printed on a rigid insulating substrate across which an alternating current is continuously flowing. A precision impedance analyzer (Agilent 4294A, Agilent Technologies, Madrid, Spain) was used to monitor the magnitude and the phase of the sensing head impedance. For this purpose, 16048G test leads and a 500 mV/40 MHz excitation voltage were used. The test lines on the strips were scanned laterally over the sensing head by a micro-positioner producing an increase of the impedance of the circuit due to the large magnetic permeability of the superparamagnetic particles present on it. This variation proved to be directly proportional to number of nanoparticles at the test line in previous studies. To account for all the particles in the test line, the signal was integrated across the position. For further information, please, see Supplementary Materials.

### 2.5.3. Optical Measurements

In order to quantify the color intensity of the test line by reflectance measurements, a portable strip reader ESE-Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., Hilden, Germany) was used.

### 2.5.4. Characterization of the Strip by SEM

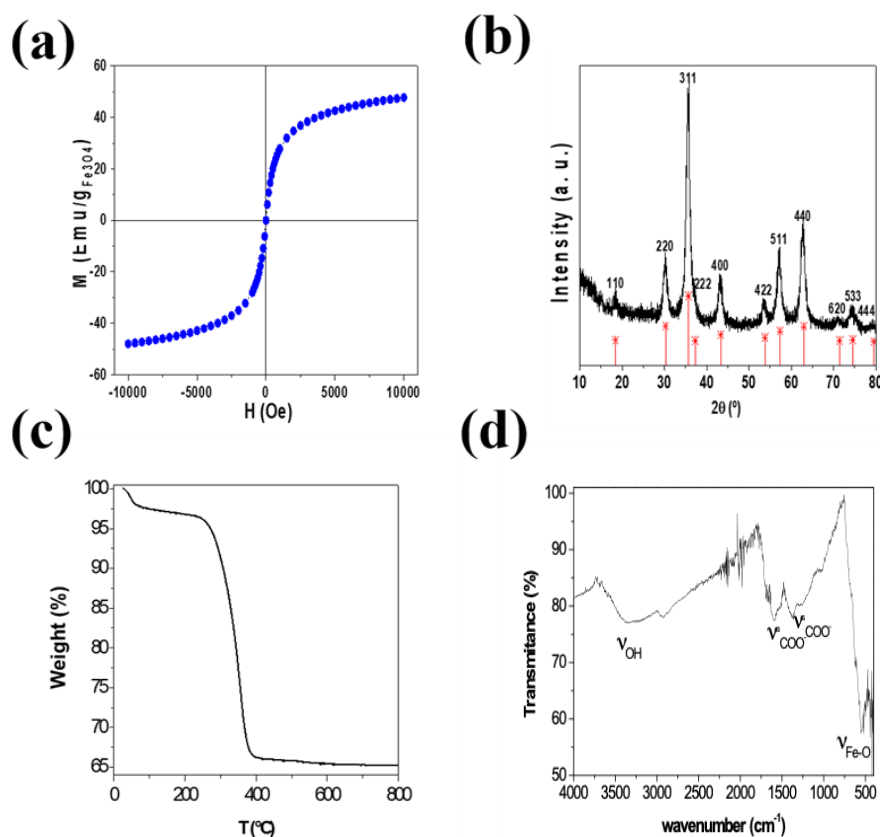
The morphology of the strips was characterized by SEM in a Zeiss FE-SEM ULTRA Plus (5 kV) microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. *Characterization of the Carbon-Coated Nanoflowers before Bioconjugation*

After synthesis, carbon-coated nanoflowers were characterized using various analytical techniques: VSM, X-ray diffraction,  $\zeta$  potential, thermogravimetric analysis (TGA), FTIR, SEM, and TEM (Figure 1).





**Figure 1.** (a) Hysteresis loops of core/shell structure of magnetite/carbon performed at room temperature with a vibrating sample magnetometer (VSM) (-10, +10) Koe. (b) X-ray diffraction (XRD) pattern of the core/shell structure of magnetite/carbon colloidal nanoparticles compared to the XRD pattern of magnetite from JCPDS 19-0629 data base (c) thermogravimetric analysis (TGA) curves of the core/shell structure of magnetite/carbon colloidal nanoparticles. (d) FT-IR.

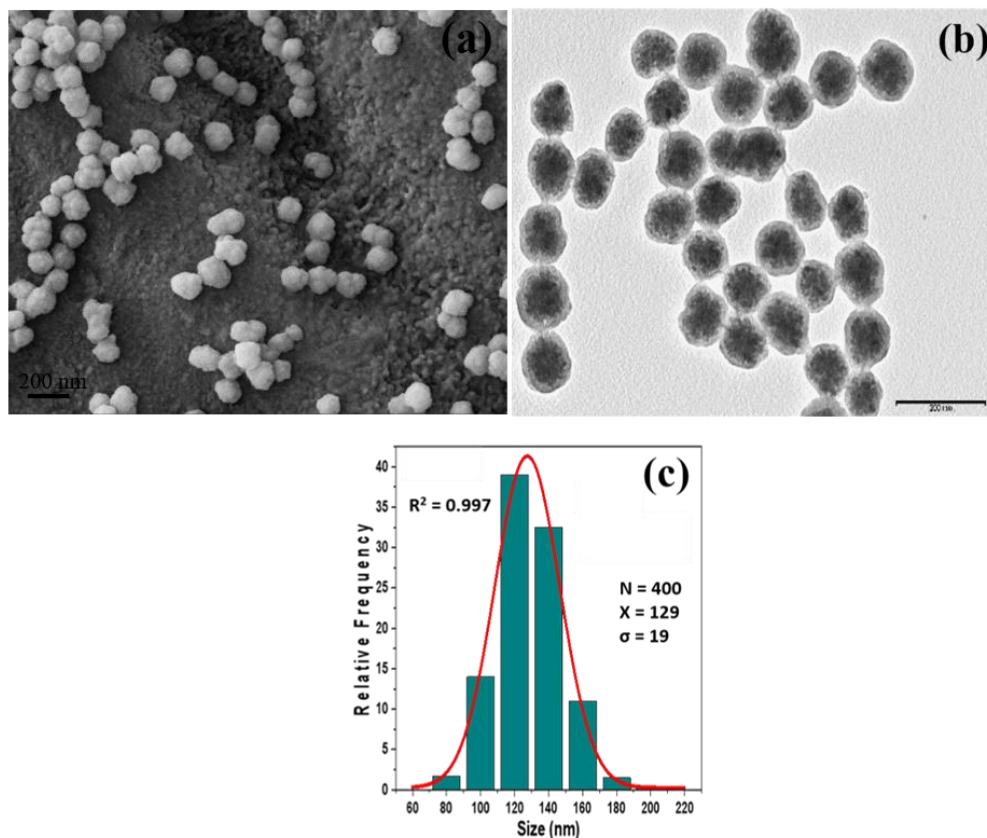
Magnetic characterization of the dried samples performed with a VSM at room temperature showed a magnetization normalized to the content of magnetite with a saturation at 10 Koe around 50 emu. This indicated superparamagnetic behavior (Figure 1a), in concordance with the dominant surface effects in small nanoparticles, for which the dead magnetic layer significantly decreased the magnetization. Moreover, negligible coercivity and absent remanence were observed. This can be ascribed to the superparamagnetic behavior of small magnetite nanoparticles.

Figure 1b shows X-ray diffraction spectra of the carbon coated multicore NP shown together with the theoretical diffraction peaks of magnetite (JCPDS card No. 19-0629) [49]. It can be seen that both the location and the relative intensity of m-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles coincided with the main theoretical 111, 220, 311, 400, 422, 511, 440 magnetite reflections (red lines in Figure 1b). This confirmed that magnetite was the

crystalline phase of iron oxide present in the sample. To obtain the crystallite size, Scherrer formula [50] was applied to main reflection peak 311, providing an average  $D_{hkl} = 16.3$  nm and  $\sigma = 2.8$  nm. Moreover, on low diffraction angles, a broad band corresponding to the amorphous carbon coating shell could be seen.

The surface charge of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles was negative with a  $\zeta$  potential value of -32 mV and a rate of magnetite/total mass of 0.651% ( $W_{\text{magnetite}}/W_{\text{sample}}$ ) (Figure 1c). The  $\zeta$  potential value confirms the stability of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles in water suspension. Figure 1d shows the FT-IR spectra of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles. The peak observed around  $550\text{ cm}^{-1}$  was characteristic of Fe-O vibrations [51]. Additionally, a large band around  $3400\text{ cm}^{-1}$  was also observed due to the -OH groups adsorbed on the nanoparticle surface. Besides, two peaks appeared around  $1595$  and  $1384\text{ cm}^{-1}$ , which corresponded to the asymmetric and the symmetric stretching vibrations of  $\text{COO}^-$  groups.

The morphology of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and by transmission electron microscopy (TEM), as shown in Figure 2a,b respectively. It can be seen (Figure 2a) that the obtained particles had a nearly spherical shape and uniform size with a regular core@shell structure where the carbon coating homogeneously encapsulated dozens of magnetite nanocrystals with a size 10–20 nm (Figure 2b). From TEM images, distribution of sizes was analyzed showing a mono-modal histogram with slight polydispersity, with an average diameter of  $129\text{ nm} \pm 19\text{ nm}$  (Figure 2c).

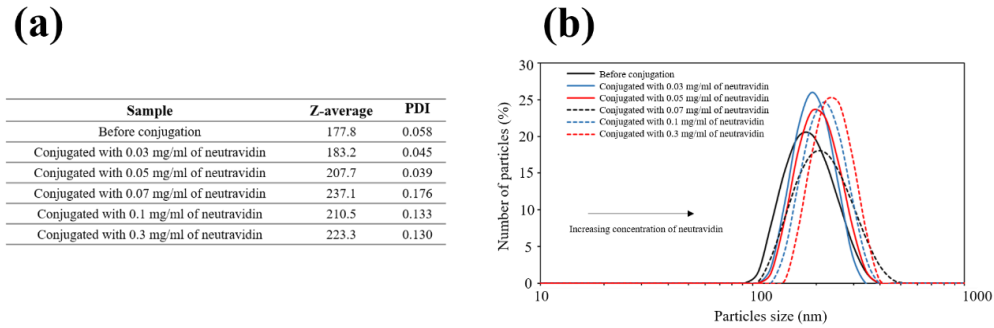


**Figure 2.** (a) SEM and (b) TEM images of the core/shell structure of magnetite/carbon colloidal NPs. (c) Analysis of size distribution obtained from (b).

### 3.2. Study of Neutravidin Concentration during the Bioconjugation Process

Increasing neutravidin concentrations were used to coat the nanoflowers: 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, and 0.3 mg/mL. Phosphate buffer was used as diluent to prepare the neutravidin standards. Dynamic light scattering (DLS) measurements were carried out to compare nanoparticles hydrodynamic size before and after conjugation reaction. The hydrodynamic diameter of nanoparticles before conjugation was 178 nm (polydispersity index 0.058). The Figure 3a shows the values for Z-average of the hydrodynamic sizes for the different concentration of neutravidin used during the conjugation process. The hydrodynamic diameter of nanoparticles was higher when the concentration of neutravidin increased (Figure 3b). The bioconjugation process was confirmed by the increase of the hydrodynamic diameter of nanoparticles before and after conjugation. The mean size of neutravidin is around 2–3 nm (60 kDa). Therefore, considering the neutravidin size, it can be confirmed that this protein was bound to nanoparticles surface though the carboxyl functional groups available. The Z-average of the hydrodynamic

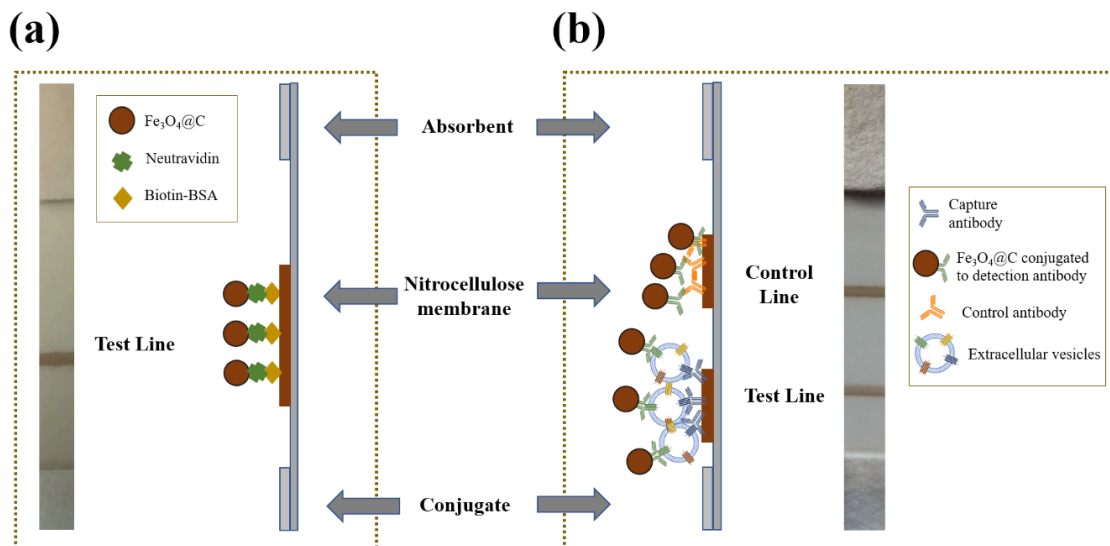
sizes increased directly with the concentration of neutravidin. This could be because more than one molecule of neutravidin can be bound to a nanoparticle through their multiple functional groups on their surface.



**Figure 3.** (a) Results obtained by dynamic light scattering (DLS) (Z-average and polydispersity index) for study performed with neutravidin. (b) Hydrodynamic size distribution profiles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles before (solid black line) and after conjugation with neutravidin concentrations of 0.3 mg/mL (solid red line), 0.1 mg/mL (solid blue line), 0.07 mg/mL (dashed black line), 0.05 mg/mL (dashed red line), and 0.03 mg/mL (dashed blue line) of neutravidin.

### 3.3. Lateral Flow Assay Procedure

A biotin–neutravidin affinity test (Figure 4a) and a lateral flow immunoassay for extracellular vesicles (Figure 4b) were developed.



**Figure 4.** (a) Photography (front view) and schematic illustration of the biotin–neutravidin affinity test (side view). (b) Photography (front view) and schematic representation of the lateral flow immunoassay for extracellular vesicles (side view).

### **3.3.1. Biotin-Neutravidin Affinity Test**

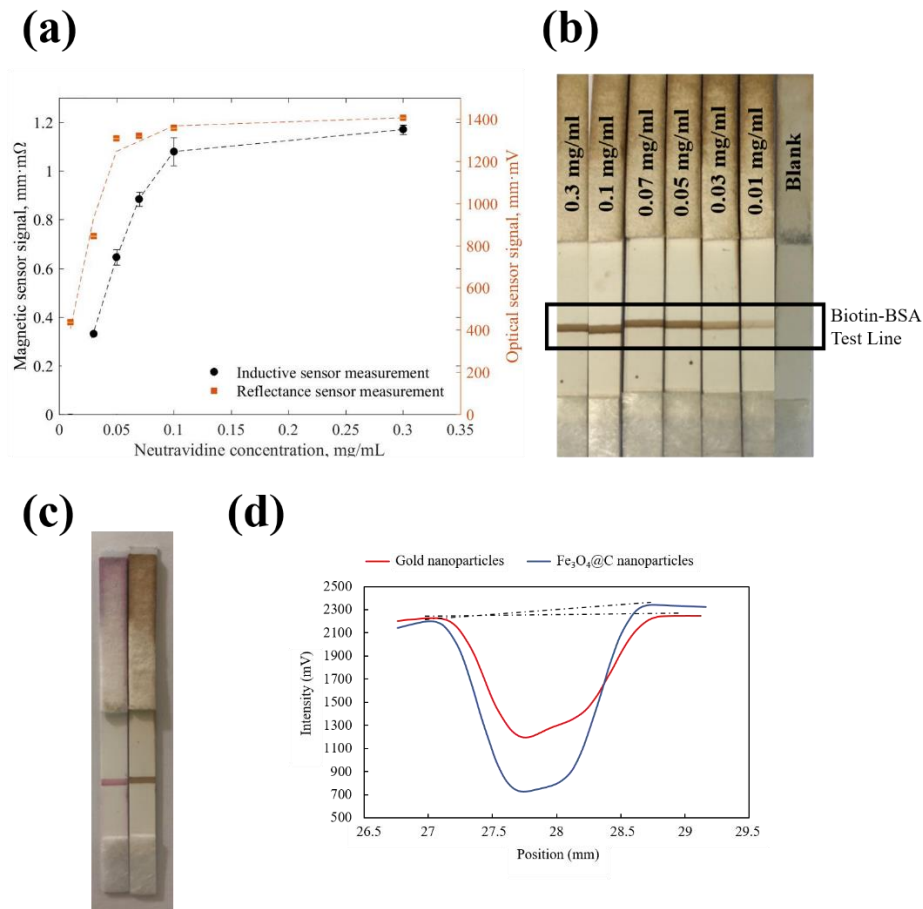
The biotin-streptavidin/neutravidin/avidin system has been widely used in immunoassays because it is a powerful non-covalent interaction with high specificity and strong affinity [52,53]. Streptavidin, neutravidin, and avidin are molecules that contain four binding sites with an extraordinarily high affinity for biotin. This system is very attractive for biosensing because of its amplification capability [54–56]. In addition, biotin can be easily covalently bonded to proteins such as antibodies, nucleotides, and enzymes, enabling a strong binding between biotinylated proteins and streptavidin, neutravidin, or avidin. In this case, the biotin–neutravidin system was used as model system for affinity interactions as a first step to study the feasibility to bioconjugate these nanoparticles.

In order to test the suitability of the NP for LFIA, 20  $\mu\text{L}$  of suspensions with different concentration of neutravidin and 80  $\mu\text{L}$  of running buffer were transferred into a microtube. The sample pad was introduced into the mixture, and the buffer started to flow through the strip by capillary action. Only the nanoflowers coated with neutravidin were retained at the biotin-BSA line, as shown in Figure 4. A simplified schematic representation of biotin–neutravidin interaction in LFIA is shown in Figure 4.

### **3.3.2. Magnetic and Optical Quantification for Biotin-Neutravidin Test**

The test line, once dried, was analyzed by reflectance and magnetic measurements. Figure 5a shows the results for both measurements. The optical and the magnetic signals increased with neutravidin concentration until saturation was reached. The saturation was produced due to the depletion of free biotin molecules at the test line, thus the nanoflowers coated with neutravidin were not retained. The optical and the magnetic methods showed a reproducibility (RSD) of 1% ( $n = 3$ ) for both cases. Figure 5b shows a representative example of strips for an increase in neutravidin concentration. Both curves followed the same trend, achieving a slightly better fit for the magnetic one. The signal corresponding to nanoparticles coated with 0.01 mg/mL of neutravidin was difficult to distinguish from the blank at the inductive sensor. However, the optical signal was significantly different from the blank, as Figure 5b shows. For the blank,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles without neutravidin coating were assayed in order to test that bare nanoparticles were not attached to biotin-BSA test line. The Figure 5b confirms that there were not non-specific interactions between bare  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles and biotin-BSA

test line. A higher concentration of neutravidin (0.03 mg/mL) on the nanoparticles could be easily detected by both magnetic and optical instruments.



**Figure 5.** (a) Magnetic and optical signals as function of the concentration of neutravidin. (b) Representative example of results obtained in the strips for the different concentrations of neutravidin. (c) Comparison of different labels: gold nanoparticles (left) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles (right). (d) Intensity profiles measured using ESEQuant reader for gold (red line) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C (blue line) nanoparticles.

Colloidal gold was used as label at the same immunoassay (biotin-neutravidin interaction test) to compare the results with those of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles. Colloidal nanoparticles have been widely used as labels in LFIA, the 40 nm size being the most popular choice for this kind of assay due to their higher sensitivity [57]. Gold nanoparticles were conjugated to neutravidin by passive binding [58]. The optimal concentration of neutravidin to stabilize the colloidal gold was found through a titration assay as described in reference [58]. The protocol for the titration was executed as described elsewhere [58]. The results indicated that 0.4 mg/mL of neutravidin was the lower concentration needed for the conjugation with gold nanoparticles (data no shown). To perform the comparison, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles were conjugated to 0.3 mg/mL of

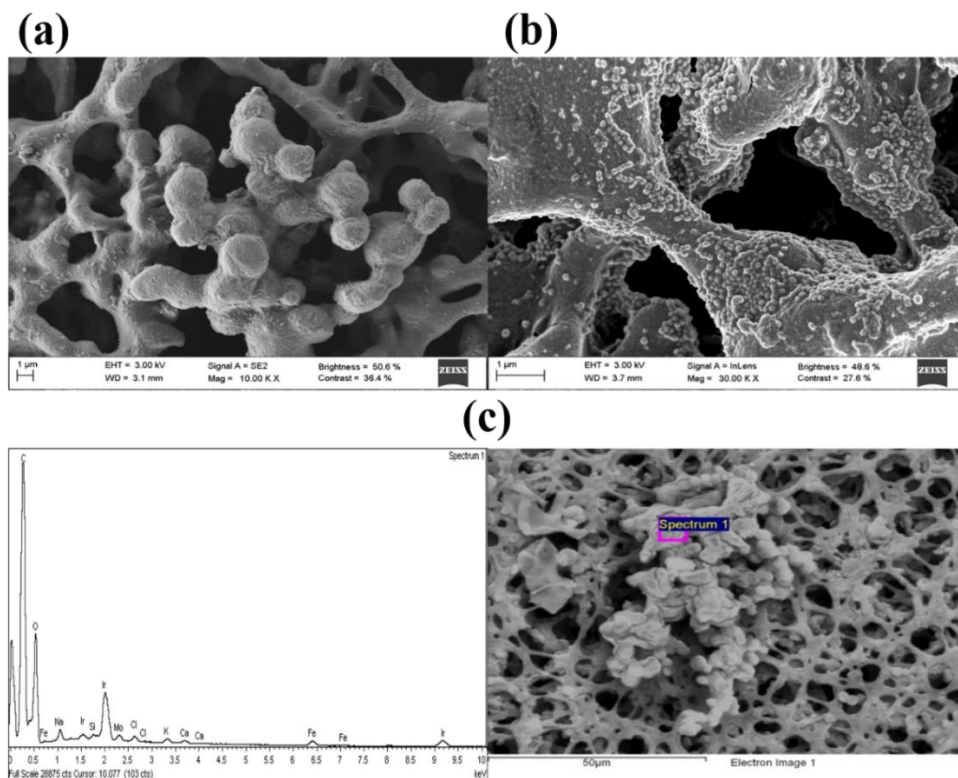
neutravidin, because at this concentration, the optical signal has reached the saturation (Figure 5a), and therefore the intensity of this signal should be similar to that obtained by 0.4 mg/mL of neutravidin. Therefore, the concentrations chosen were comparable for both labels.

The test was carried out using the same protocol described above, and the optical reader was used to analyze the signals. Figure 5c shows that naked-eye signals for gold and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles at the test line apparently looked equivalent. However, when the test lines were quantified by optical reader, the results show that the nanoflowers displayed a significantly stronger optical signal (1405.9 mm·mV) compared with gold nanoparticles (937.3 mm·mV). Figure 5d shows the intensity profiles measured using ESEQuant reader for gold nanoparticles (red line) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles (blue line). The intensity profiles were based on reflectance measurements. The ESEQuant reader scanned the test line by moving the light source over the strip. The reader was adjusted so that the light reflected from the strip was collected by a confocal detector and registered as intensity (mV). When the incident beam passed across the test line, the reflected light decreased compared with the light reflected from the membrane (base line). This was because the nanoparticles at the test line absorbed light, and this effect reduced light intensity. This was shown as a negative peak (Figure 5d). Hence, the recorded graph represents intensity (mV) versus position (mm). The result of reflectance measurements for gold and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles were obtained by integration of negative peak area (Figure 5d, dashed black lines). Absorption and reflection of the light were proportional to the overall intensity of the nanoparticles of the test line. Therefore, the results indicate that the density of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles was higher than the density of gold nanoparticles at the biotin-BSA test line for a similar concentration of neutravidin.

### **3.3.3. Characterization of the Strip by SEM**

Morphological characterization of the strips was carried out by SEM in order to observe the distribution of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles after using the strip in the detection device. Figure 6a shows an image of the porous structure of a non-colored part of the strip. Spheres with size between 3–5 μm embedded in a network of fibers were clearly observed in the region corresponding to the test line (Figure 6b). We tried several membranes with different pore sizes to let Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles flow along membrane until the end of the strip. It could be observed that the pores of this cellulose network were large enough to allow the diffusion of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles through the membrane (Figure 6b).

An energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis was also carried out in order to confirm that these spherical nanoparticles corresponded to  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles agglomerates. The EDS spectrum showed the presence of Fe on the analyzed area (Figure 6c). With this analysis, we confirmed the presence of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles on the test line.



**Figure 6.** (a) SEM images of the cellulose membrane and (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticle agglomerates attached to the cellulose network at the test line. The strips were examined after use in the detection device. (c) energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) spectrum obtained from one particular location in a SEM image of the strips with presence of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles.

### 3.3.4. Applications of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ Nanoparticles for Detection of EVs by LFIA

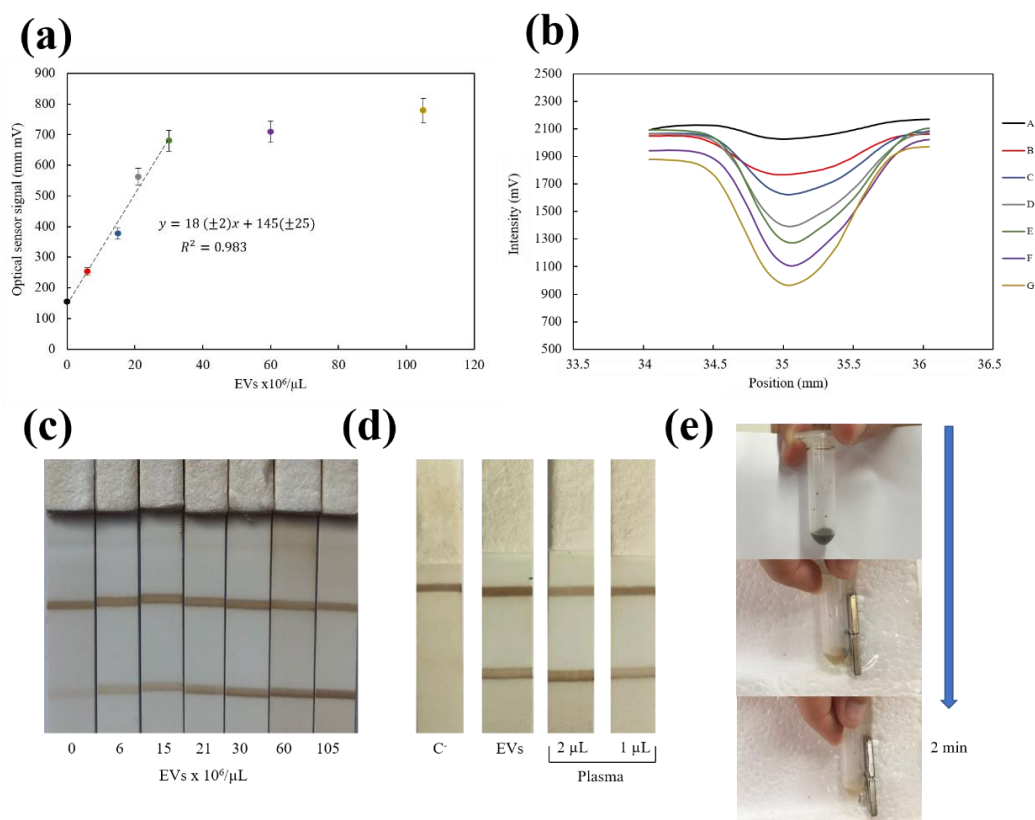
Finally, as proof of concept, we developed a lateral flow immunoassay for EVs by using these nanoflowers as label. The immunoassay relies on sandwich format developed in our research group [46,47]. Anti-CD9 and anti-CD63 were used as capture and detection antibodies, respectively. Capture antibody was immobilized on the nitrocellulose membrane at the test line, and detection antibody was conjugated to the nanoflower surfaces. Figure 4b shows a schematic illustration of the immunoassay for



EVs. Commercial standard exosomes were used to study these magnetic nanoparticles as labels and to evaluate the magnetic signal in this application.

In order to carry out the test, different concentrations of standard commercial exosomes ( $6.00 \times 10^6$ ,  $1.50 \times 10^7$ ,  $2.10 \times 10^7$ ,  $3.00 \times 10^7$ ,  $6.00 \times 10^7$ ,  $1.05 \times 10^8$  EVs/ $\mu\text{L}$ ) were added into a microtube that contained 10  $\mu\text{L}$  nanoflowers coated with anti-CD63 and buffer until a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . HEPES was used to dilute the standard commercial exosomes.

The strips were analyzed at both the magnetic sensor and the optical reader, but quantification was possible only with the optical reader. Previous results were based on the plain biotin–neutravidin interaction, but the assay used for the EVs detection was more complex; it involved a capture antibody of bulky EVs at the test line and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  bioconjugated antibody for detection. The optical signal corresponding to the highest concentration of EVs was 779 mm·mV (Figure 7). If we look at Figure 5a, the corresponding value at the magnetic sensor curve for that concentration would be below the quantification possibilities of this device. Further work is in progress to optimize the microelectronics for amplification.



**Figure 7.** (a) Optical calibration curve for extracellular vesicles (EVs). (b) Intensity profiles measured using ESEQuant reader for different concentration of EVs: blank

(A),  $6.00 \times 10^6$  (B),  $1.50 \times 10^7$  (C),  $2.10 \times 10^7$  (D),  $3.00 \times 10^7$  (E),  $6.00 \times 10^7$  (F),  $1.05 \times 10^8$  (G) EVs/ $\mu$ L. (c) Representative example of results obtained in the strips with different concentrations of standard EVs. (d) Representative strips of lateral flow immunoassay (LFIA) tested with real samples: negative control (C<sup>-</sup>), EVs isolated from plasma sample using ExoQuick (EVs), and plasma. © Separation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles using a conventional magnet.

Nevertheless, a direct relationship between the concentration of exosomes and the optical signal was found (Figure 7). Figure 7b shows the intensity profiles obtained by commercial optical reader for different concentration of EVs. Reflectance peak area increased proportionally with EVs concentration since the density of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles at the test line was higher. The limit of detection (LOD) achieved was  $4 \times 10^6$  EVs/ $\mu$ L (calculated with the  $3 S_B/m$  criterium), and the method showed a reproducibility (RSD) of 3% ( $n = 3$ ). This LOD agrees with the values reported before with this type of tests [46,47] by using gold nanoparticles ( $8.5 \times 10^5$  and  $4.5 \times 10^6$  EVs/ $\mu$ L), carbon black nanoparticles ( $9.2 \times 10^6$  EVs/ $\mu$ L) or other commercial magnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid ( $1.0 \times 10^7$  EVs/ $\mu$ L). Figure 7c shows a representative example of the strips for standard EVs. Prompted by these results, this LFIA system was next tested with freshly isolated EV from human plasma and also directly with different volumes of plasma (Figure 7d). Quantification of isolated EVs using the optical calibration curve (Figure 7a) was compared to that obtained by NTA. Despite the different basis of these measuring principles, results were in the same range of concentration ( $3 \times 10^9$  EVs/ $\mu$ L determined in LFIA vs.  $7 \times 10^9$  EVs/ $\mu$ L determined by NTA). Estimation of the number of EVs by NTA is based on the tracking of their Brownian displacements, whereas LFIA is a single step procedure, in which EVs are recognized by targeting their surface markers. Moreover, human plasma without previous treatment was used for the first time directly on the test strips. An excellent agreement was achieved for the number of EVs obtained in two different volumes using the calibration curve:  $21.4 \times 10^6$  EVs/ $\mu$ L in 1  $\mu$ L and  $20.9 \times 10^6$  EVs/ $\mu$ L when a 2  $\mu$ L plasma aliquot was tested. This is an indication of the absence of matrix effects. Thus, the magnetic LFIA developed in this work with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoflowers was found suitable for analysis of complex samples such as plasma or serum with minimum sample preparation in a simple protocol.

In addition, another important strength of these particles is their rapid separation with a conventional magnet in 2 min (Figure 7e) while keeping their superparamagnetic behaviour. Therefore, they show a great potential to easily enrich CD63<sup>+</sup> EV for further functional or analytical assays.

## 4. Conclusions

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles were synthesized with the purpose of having the double function of separation and quantification at immunoassays. Their characteristics are summarized in Table 1. They exhibited superparamagnetic behavior, and their value of  $\zeta$  potential confirms their stability in suspension.

**Table 1.** Characteristics of carbon-coated superparamagnetic oxide nanoflowers Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C.

<b>Carbon-Coated Superparamagnetic Oxide Nanoflowers (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C)</b>	
Synthesis	One-pot solvothermal method
Composition (core/shell)	Magnetite cores Black carbon coating
Magnetite crystals size (d)	10–20 nm
Magnetization saturation	50 emu per g of magnetite
Mean size	129 nm
Mean hydrodynamic diameter	178 nm
Electrokinetic potential ( $\zeta$ )	–32 mV
Rate magnetite/total mass	0.651%

These carbon coated nanoflowers were conjugated to neutravidin by using the carbodiimide chemistry and tested at lateral flow immunoassays with a biotin test line. The conjugations process was monitored by DLS and confirmed by LFIA based on biotin–neutravidin interaction line. Quantification was carried out by means of an optical reader and a magnetic sensor. With this basis, the nanoflowers were used to develop a lateral flow immunoassay for detection of EVs. In summary, these Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C magnetic particles proved to be effective for bioconjugation purposes due to the availability of carboxylic groups on their surface. Their carbon coating provided a strong optical signal when using them as labels in lateral flow assays. In fact, the LFIA developed in this work achieved lower LOD values than those obtained by means of other commercial magnetic nanoparticle labels for EV detection. Therefore, the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C magnetic particles employed in this study have a great potential of application as labels in EV enrichment and detection.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-6374/10/8/80/s1>, Figure S1: (a) Photograph of the sensing planar coil. (b) Image of the device integrating the planar coil and the micropositioner. (c) 40 MHz Impedance variation measured in a scan of a sample of nanoparticles containing 32 µg of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (d) Impedance recording observed for the scan of an LFIA with 1 mg/mL of neutravidin in two consecutive scans in the sensor

**Author Contributions:** Methodology, A.M., E.S.-P., S.Y.-V., and M.G.-G.; investigation, A.M., E.S.-P., M.S., J.C.M.-G., S.Y.-V., and M.G.-G.; writing original draft preparation, A.M. and S.Y.-V.; writing—review and editing, E.S.-P., Y.P., J.R., M.R., and M.C.B.-L.; supervision, Y.P., J.R., M.R., and M.C.B.-L.; project administration, Y.P., J.R., M.R., and M.C.B.-L.; funding acquisition, Y.P., J.R., M.R., and M.C.B.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported in part by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under projects MAT2017-84959-C2-1-R and the Principality of Asturias (Spain) under project IDI/2018/000185 and the Consellería de Educación Program for Development of a Strategic Grouping in Materials (AEMAT) at the University of Santiago de Compostela under Grant No. ED431E208/08, Xunta de Galicia. Amanda Moyano was supported by a “Severo Ochoa” fellowship (Consejería de Educación y Cultura del Gobierno del Principado de Asturias, grant BP17-152)

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Colombo, M.; Carregal-Romero, S.; Casula, M.F.; Gutierrez, L.; Morales, M.P.; Boehm, I.B.; Heverhagen, J.T.; Prospero, D.; Parak, W.J. ChemInform Abstract: Biological Applications of Magnetic Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 4306–4334.
2. Zhang, L.; Dong, W.-F.; Sun, H.-B. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: design, synthesis and biomedical photonic applications. *Nanoscale*, **2013**, 5, 7664–7684
3. Knobel, M.; Nunes, W.C.; Socolovsky, L.M.; De Biasi, E.; Vargas, J.M.; Denardin, J.C. Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: A review on ideal and real systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, 8, 2836–2857.
4. Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, 16, 10.1088/1468-6996/16/2/023501.
5. McNamara, K.; Tofail, S.A.M. Nanoparticles in biomedical applications. *Adv. Phys.* **2017**, 2, 54–88.

6. Salvador, M.; Moyano, A.; Martínez-García, J.C.; Blanco-López, M.C.; Rivas, M. Synthesis of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: SWOT Analysis towards Their Conjugation to Biomolecules for Molecular Recognition Applications. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *19*, 4839–4856.
7. Rafiee, E.; Khodayari, M. Starch as a green source for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@carbon core-shell nanoparticles synthesis: A support for 12-tungstophosphoric acid, synthesis, characterization, and application as an efficient catalyst. *Res. Chem. Intermed.* **2016**, *42*, 3523–3536.
8. Mendes, R.G.; Koch, B.; Bachmatiuk, A.; El-Gendy, A.A.; Krupskaya, Y.; Springer, A.; Klingeler, R.; Schmidt, O.; Büchner, B.; Sanchez, S.; et al. Synthesis and toxicity characterization of carbon coated iron oxide nanoparticles with highly defined size distributions. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 160–169.
9. Prajapat, C.L.; Sharma, P.; Gonal, M.R.; Vatsa, R.K.; Singh, M.R.; Ravikumar, G. Synthesis and magnetic study of carbon coated iron oxide nanoparticles by laser ablation in solution. *AIP Conf. Proc.* **2016**, *1731*, 130011.
10. Taylor, A.; Krupskaya, Y.; Costa, S.; Oswald, S.; Kramer, K.; Füssel, S.; Klingeler, R.; Büchner, B.; Borowiak-Palen, E.; Wirth, M.P. Functionalization of carbon encapsulated iron nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12*, 513–519.
11. Bonanni, A.; Ambrosi, A.; Pumera, M. On oxygen-containing groups in chemically modified graphenes. *Chem.-A Eur. J.* **2012**, *18*, 4541–4548.
12. Zhang, X.; Zhao, F.; Sun, Y.; Mi, T.; Wang, L.; Li, Q.; Li, J.; Ma, W.; Liu, W.; Zuo, J.; et al. Development of a highly sensitive lateral flow immunoassay based on receptor-antibody-amorphous carbon nanoparticles to detect 22 β-lactams in milk. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *321*, 128458.
13. Guoa, J.; Chenb, S.; Jinhong Guoa, J.; Ma, X. Nanomaterial Labels in Lateral Flow Immunoassays for Point-of-Care-Testing. *J.mater sci.technol.* **2020**, *60*, 90-104.
14. Zhang, X.; Yu, X.; Wen, K.; Li, C.; Mujtaba Mari, G.; Jiang, H.; Shi, W.; Shen, J.; Wang, Z. Multiplex Lateral Flow Immunoassays Based on Amorphous Carbon Nanoparticles for Detecting Three Fusarium Mycotoxins in Maize. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 8063–8071.
15. Liu, B.; Wang, L.; Tong, B.; Zhang, Y.; Sheng, W.; Pan, M.; Wang, S. Development and comparison of immunochromatographic strips with three nanomaterial labels: Colloidal gold, nanogold-polyaniline-nanogold microspheres (GPGs) and colloidal carbon for visual detection of salbutamol. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 337–342.
16. Rocha-Santos, T.A.P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *62*, 28–36.
17. Hervás, M.; López, M.Á.; Escarpa, A. Simplified calibration and analysis on screen-printed disposable platforms for electrochemical magnetic bead-based immunosensing of zearalenone in baby food samples. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1755–1760.
18. Yang, Z.; Zhang, C.; Zhang, J.; Bai, W. Potentiometric glucose biosensor based on core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-enzyme-polypyrrole nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51*, 268–273.

19. Yola, M.L.; Eren, T.; Atar, N. A novel and sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe@Au nanoparticles decorated graphene oxide. *Electrochim. Acta.* **2014**, *125*, 38–47.
20. Wang, J.; Sun, Y.; Wang, L.; Zhu, X.; Zhang, H.; Song, D. Surface plasmon resonance biosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au nanocomposites. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *81*, 600–606.
21. Wang, Y.; Dostalek, J.; Knoll, W. Magnetic nanoparticle-enhanced biosensor based on grating-coupled surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6202–6207.
22. Li, D.; Wang, J.; Wang, R.; Li, Y.; Abi-Ghanem, D.; Berghman, L.; Hargis, B.; Lu, H. A nanobeads amplified QCM immunosensor for the detection of avian influenza virus H5N1. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4146–4154.
23. Gan, N.; Wang, L.; Li, T.; Sang, W.; Hu, F.; Cao, Y. A Novel Signal-Amplified Immunoassay for Myoglobin Using Magnetic Core-Shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @Au-Multi Walled Carbon Nanotubes Composites as Labels Based on One Piezoelectric Sensor. *Integr. Ferroelectr.* **2013**, *144*, 29–40.
24. Haun, J.B.; Yoon, T.J.; Lee, H.; Weissleder, R. Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 291–304.
25. Srinivasan, B.; Li, Y.; Jing, Y.; Xing, C.; Slaton, J.; Wang, J.P. A three-layer competition-based giant magnetoresistive assay for direct quantification of endoglin from human urine. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2996–3002.
26. Zu, P.; Chan, C.C.; Koh, G.W.; Lew, W.S.; Jin, Y.; Liew, H.F.; Wong, W.C.; Dong, X. Enhancement of the sensitivity of magneto-optical fiber sensor by magnifying the birefringence of magnetic fluid film with Løyt-Sagnac interferometer. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *191*, 19–23.
27. Hathaway, H.J.; Butler, K.S.; Adolphi, N.L.; Lovato, D.M.; Belfon, R.; Fegan, D.; Monson, T.C.; Trujillo, J.E.; Tessier, T.E.; Bryant, H.C.; et al. Detection of breast cancer cells using targeted magnetic nanoparticles and ultra-sensitive magnetic field sensors. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 1–13.
28. Sajid, M.; Kawde, A.N.; Daud, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *J. Saudi Chem. Soc.* **2015**, *19*, 689–705.
29. 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.* **2015**, *75*, 166–180.
30. 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.
31. Panferov, V.G.; Safenkova, I.V.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Setting up the cut-off level of a sensitive barcode lateral flow assay with magnetic nanoparticles. *Talanta.* **2017**, *164*, 69–76.
32. Liu, C.; Jia, Q.; Yang, C.; Qiao, R.; Jing, L.; Wang, L.; Xu, C.; Gao, M. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle aggregates as color reagents. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6778–6784.

33. Wu, J.; Dong, M.; Zhang, C.; Wang, Y.; Xie, M.; Chen, Y. Magnetic lateral flow strip for the detection of cocaine in urine by naked eyes and smart phone camera. *Sensors*. **2017**, *17*, 1286.
34. Workman, S.; Wells, S.K.; Pau, C.P.; Owen, S.M.; Dong, X.F.; LaBorde, R.; Granade, T.C. Rapid detection of HIV-1 p24 antigen using magnetic 164harac-chromatography (MICT). *J. Virol. Methods*. **2009**, *160*, 14–21.
35. Zheng, C.; Wang, X.; Lu, Y.; Liu, Y. Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control*. **2012**, *26*, 446–452.
36. Wang, D.B.; Tian, B.; Zhang, Z.P.; Deng, J.Y.; Cui, Z.Q.; Yang, R.F.; Wang, X.Y.; Wei, H.P.; Zhang, X.E. Rapid detection of Bacillus anthracis spores using a super-paramagnetic lateral-flow immunological detectionsystem. *Biosens. Bioelectron*. **2013**, *42*, 661–667.
37. Wang, D.B.; Tian, B.; Zhang, Z.P.; Wang, X.Y.; Fleming, J.; Bi, L.J.; Yang, R.F.; Zhang, X.E. Detection of Bacillus anthracis spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on “Road Closure.” *Biosens. Bioelectron*. **2015**, *67*, 608–614.
38. Sharma, A.; Tok, A.I.Y.; Lee, C.; Ganapathy, R.; Alagappan, P.; Liedberg, B. Magnetic field assisted preconcentration of biomolecules for lateral flow assaying. *Sens. Actuators B Chem*. **2019**, *285*, 431–437.
39. Razo, S.C.; Panferov, V.G.; Safenkova, I.V.; Varitsev, Y.A.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta*. **2018**, *1007*, 50–60.
40. Huang, Z.; Xiong, Z.; Chen, Y.; Hu, S.; Lai, W. Sensitive and Matrix-Tolerant Lateral Flow Immunoassay Based on Fluorescent Magnetic Nanobeads for the Detection of Clenbuterol in Swine Urine. *J. Agric. Food Chem*. **2019**, *67*, 3028–3036.
41. 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.
42. Lago-Cachón, D.; Oliveira-Rodríguez, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C.; Martínez-García, J.C.; Moyano, A.; Salvador, M.; García, J.A. Scanning Magneto-Inductive Sensor for Quantitative Assay of Prostate-Specific Antigen. *IEEE Magn. Lett*. **2017**, *8*, 10.1109/LMAG.2017.2702108.
43. Moyano, A.; Salvador, M.; Martínez-García, J.C.; Socoliuc, V.; Vékás, L.; Peddis, D.; Alvarez, M.A.; Fernández, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C. Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine. *Anal. Bioanal. Chem*. **2019**, *411*, 6615–6624.
44. Lago-Cachón, D.; Rivas, M.; Martínez-García, J.C.; García, J.A. Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles. *Nanotechnology*. **2013**, *24*, 245501.
45. Rivas, M.; Lago-Cachón, D.; Martínez-García, J.C.; García, J.A.; Calleja, A.J. Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits. *Sens. Actuators A Phys*. **2014**, *216*, 123–127.

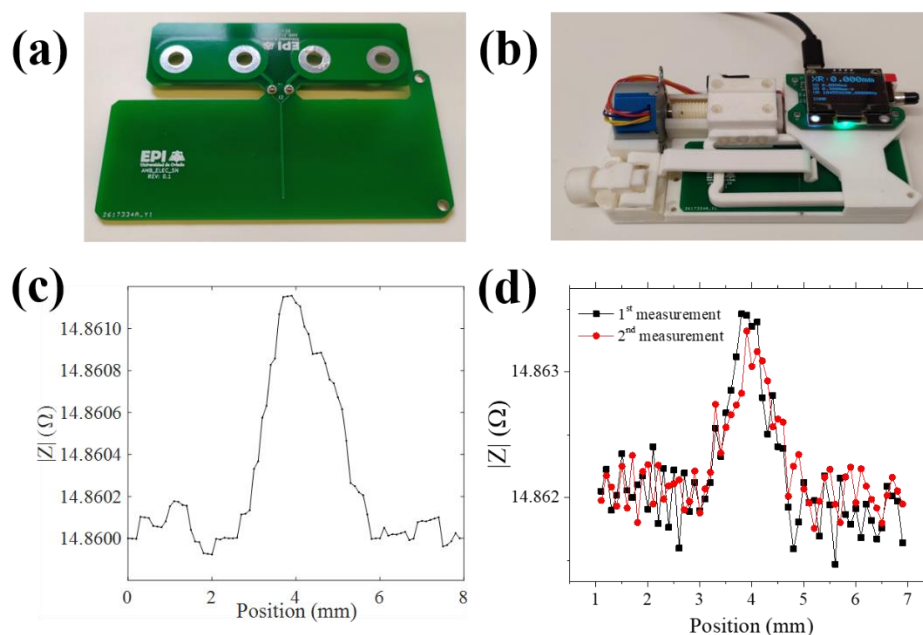
46. Oliveira-Rodríguez, M.; López-Cobo, S.; Reyburn, H.T.; Costa-García, A.; López-Martín, S.; Yáñez-Mó, M.; Cernuda-Morollón, E.; Paschen, A.; Valés-Gómez, M.; Blanco-López, M.C. Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids. *J. Extracell. Vesicles*. **2016**, 5, 31803.
47. Oliveira-Rodríguez, M.; Serrano-Pertierra, E.; García, A.C.; Martín, S.L.; Mo, M.Y.; Cernuda-Morollón, E.; Blanco-López, M.C. Point-of-care detection of extracellular vesicles: Sensitivity optimization and multiple-target detection. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 87, 38–45.
48. Wang, H.; Sun, Y.B.; Chen, Q.W.; Yu, Y.F.; Cheng, K. Synthesis of carbon-encapsulated superparamagnetic colloidal nanoparticles with magnetic-responsive photonic crystal property. *Dalton Trans.* **2010**, 39, 9565–9569.
49. Nakagiri, N.; Manghnani, M.H.; Ming, L.C.; Kimura, S. Crystal structure of magnetite under pressure. *Phys. Chem. Miner.* **1986**, 13, 238–244.
50. Zsigmondy, R.; Scherrer, P. Bestimmung der inneren Struktur und der Größe von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. *Kolloidchemie Ein Lehrbuch*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, **1912**; Volume 277, pp. 387–409.
51. Wang, L.; Bao, J.; Wang, L.; Zhang, F.; Li, Y. One-pot synthesis and bioapplication of amine-functionalized magnetite nanoparticles and hollow nanospheres. *Chem.-A Eur. J.* **2006**, 12, 6341–6347.
52. Lakshmpriya, T.; Gopinath, S.C.B.; Tang, T.H. Biotin-streptavidin competition mediates sensitive detection of biomolecules in enzyme linked immunosorbent assay. *PLoS ONE*. **2016**, 11, 16–20.
53. Lin, Z.; Wang, X.; Li, Z.J.; Ren, S.Q.; Chen, G.N.; Ying, X.T.; Lin, J.M. Development of a sensitive, rapid, biotin-streptavidin based chemiluminescent enzyme immunoassay for human thyroid stimulating hormone. *Talanta*. **2008**, 75, 965–972.
54. Sai, N.; Chen, Y.; Liu, N.; Yu, G.; Su, P.; Feng, Y.; Zhou, Z.; Liu, X.; Zhou, H.; Gao, Z.; et al. A sensitive immunoassay based on direct hapten coated format and biotin-streptavidin system for the detection of chloramphenicol. *Talanta*. **2010**, 82, 1113–1121.
55. Liu, N.; Nie, D.; Zhao, Z.; Meng, X.; Wu, A. Ultrasensitive Immunoassays Based on Biotin-Streptavidin Amplified System for Quantitative Determination of Family Zearalenones; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands. **2015**; Volume 57; ISBN 8621549220.
56. Liu, R.; Liu, J.; Xie, L.; Wang, M.; Luo, J.; Cai, X. A fast and sensitive enzyme immunoassay for brain natriuretic peptide based on micro-magnetic probes strategy. *Talanta*. **2010**, 81, 1016–1021.
57. Kim, D.S.; Kim, Y.T.; Hong, S.B.; Kim, J.; Huh, N.S.; Lee, M.K.; Lee, S.J.; Kim, B. II; Kim, I.S.; Huh, Y.S.; et al. Development of lateral flow assay based on size-controlled gold nanoparticles for detection of hepatitis B surface antigen. *Sensors*. **2016**, 16, 2154.
58. Thobhani, S.; Attree, S.; Boyd, R.; Kumarswami, N.; Noble, J.; Szymanski, M.; Porter, R.A. Bioconjugation and characterization of gold colloid-labelled proteins. *J. Immunol. Methods*. **2010**, 356, 60–69.





© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Supplementary Materials



**Figure S1.** (a) Photograph of the sensing planar coil. (b) Image of the device integrating the planar coil and the micropositioner. (c) 40 MHz Impedance variation measured in a scan of a sample of nanoparticles containing 32  $\mu\text{g}$  of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . (d) Impedance recording observed for the scan of an LFIA with 1 mg/mL of neutravidin in two consecutive scans in the sensor.

An inductive sensor specifically developed to measure lateral flow strips was used to evaluate the magnetic LFIA. The transducer of the sensor consists of a planar coil with the shape of a double copper line that is printed on an insulating substrate. The coil is fed with a low amplitude radio frequency current flow while its impedance is continuously monitored by a precision four-point autobalancing impedance analyzer (Agilent 4294A) using 16048G test leads, 500 mV and 20–110 MHz excitation voltage (Supplementary Figure S1a).

For quantification purposes, we slide the LFIA in smooth contact over the planar coil. To do this, we use a micropositioner that was specifically designed for this application (Supplementary Figure S1b). Most components (all except the stepper motor) were 3D-printed using a PLA filament to avoid moving metallic parts that may induce spurious signals. The duration of one LFIA measurement is about 5 minutes.

The planar coil detects the varying magnetic flux produced by the presence of the magnetic particles close to it. It produces a change in the electric impedance which is directly proportional to the frequency of the driving current, the initial magnetic

permeability of the particles and the total volume of their magnetic cores. A working frequency of 40 MHz has been selected, which optimizes the signal to noise ratio.

The sensitivity and resolution of the detection not only depend on the features of the sensor (geometry, size, and electronics), but on the properties of the particles. To achieve a significant magnetic permeability at radio frequencies, superparamagnetism is essential. Supplementary Figure S1c shows the variation of the impedance produced by a sample of unmodified particles. To account for all the particles disregarding their distribution in the sample, the cumulative integral of the peak is calculated to yield a response value in  $\Omega \cdot \text{mm}$ .

For a fixed frequency and type of particles, there is a linear correlation between the measured change of impedance and the volume or mass of the particles (see Figure 2 in ref [1]). For the particles of this work the sensitivity, given as the percentage change of the impedance per unit mass, is 0.23% per mg of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Supplementary Figure S1d shows the variation of the impedance for one of the LFIA's of this work (1 mg/mL of neutravidin).

### **References**

1. Lago-Cachón, D.; Oliveira-Rodríguez, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C.; MartínezGarcía, J.C.; Moyano, A.; Salvador, M.; García, J.A. Scanning Magneto-Inductive Sensor for Quantitative Assay of Prostate-Specific Antigen. *IEEE Magn. Lett.* 2017, 8.

## CAPÍTULO B.2: Cuantificación de vesículas extracelulares mediante inmunoensayos magnéticos de flujo lateral. Aplicación a la determinación de biomarcadores de cáncer colorrectal

---

### B.2.1 Introducción y motivación

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior muestran que las nanopartículas superparamagnéticas propuestas son idóneas como marca de detección de función dual en ISM y detección visual u óptica. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que este tipo de nanopartículas no son las más adecuadas para su cuantificación magnética dado que su imanación y permeabilidad resultan insuficientes, probablemente debido a su pequeño tamaño magnético.

Con el objetivo de mejorar la señal magnética, se ensayaron unas nuevas partículas que, estando también aglomeradas tienen mayor tamaño magnético. En este caso, las partículas son fruto de una colaboración con el grupo de la *Romanian Academy (Timisoara Branch)* dirigido por el Prof. Vlad Socoliuc. Por este motivo, en este segundo capítulo se emplean otro tipo de nanopartículas superparamagnéticas de 7 nm recubiertas de una doble capa de ácido oleico ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ ) y aglomeradas en clusters de unos 70 nm. El ácido oleico proporciona grupos carboxílicos en su superficie para su funcionalización.

En este capítulo se presenta el desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de vesículas extracelulares, siguiendo un formato tipo sándwich con el empleo de dos anticuerpos. En primer lugar, se analizó la viabilidad de estas nanopartículas como marca de detección con dos anticuerpos específicos contra proteínas de membrana generales de vesículas extracelulares (es decir, son proteínas de membrana comunes a todos los exosomas). Una vez demostrado el potencial de estas nanopartículas en los LFIA para la cuantificación de EVs, se desarrolló otro

ensayo para la determinación de un biomarcador de cáncer de colorrectal presente en la membrana de estas vesículas, la proteína CD147. Para ello, se sustituyó el anticuerpo de detección contra un marcador general por un anticuerpo específico contra CD147.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento y procedimiento para mejorar los inmunoensayos magnéticos de flujo lateral, este capítulo incluye también un estudio de la estabilidad de la señal magnética y óptica generada por las nanopartículas en la tira con el transcurso del tiempo. Además, se engloba otro estudio de la estabilidad del conjugado nanopartículas-anticuerpo a diferentes temperaturas (ambiente y 4 °C).

Los resultados de esta investigación fueron muy satisfactorios, lográndose la detección de EVs en muestras de pacientes. Estas valiosas muestras se obtuvieron del Hospital Universitario San Agustín de Avilés gracias a la colaboración de los Dres. J.M. Duque, L.J. García Flórez y L. Sánchez y V. Ramos. La detección de proteínas marcadoras generales fue exitosa no sólo en muestras purificadas si no también en muestras de plasma, lo que resulta muy prometedor para análisis rápidos en los que pueda evitarse la manipulación de la muestra extraída para su purificación. También tuvieron éxito los experimentos relativos a la proteína CD147 específica de cáncer colorrectal. Dado que varios estudios apuntan a la utilidad de dicha proteína como biomarcador útil de esta enfermedad, los MLFIAs podrían utilizarse como técnica clínica de cribado. Los resultados fueron validados por NTA.

A continuación, se presentan los detalles de esta investigación en un artículo en formato de borrador.

## **B.2.2 Artículo científico (formato borrador)**

### **Magnetic lateral flow immunoassay for extracellular vesicles quantification. Application to colorectal cancer biomarker detection**

#### **1. Introduction**

Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer death and the fourth most incident cancer in the world according to GLOBOCAN 2018 data [1]. In Europe, 470,000 new cases of CRC were diagnosed in 2012 (13.6% of all cancers) being the second leading cause of cancer death more frequent [2]. In Spain, more than 41.000 new cases of CRC are diagnosed each year and more than 15.000 deaths per year from this disease [3]. According to Sociedad Española de Oncología Médica, CRC represents the most frequent tumor diagnosed in Spain in 2019 in both sexes (44.937 new cases), being the second in men after the prostate and the second in women after the breast. Globally CRC is expected to increase by 60% to more than 2.2 million new cases and 1.1 million deaths by 2030 [4].

Surgery with curative intent is the base of treatment for CRC and has improved significantly in the last decades. However, the recurrence rate in advanced stages is still high. The diagnosis is another important point to take in consideration in order to control cancer. The most sensitive test for detection of colorectal cancer is colonoscopy which requires an invasive procedure and hospital attendance. The complexity and cost of its procedure do not allow colonoscopy as option for population mass screening. Currently, the fecal occult blood test is the tool that has been used widely as a screening test for CRC. However, it displays low specificity, estimated at 90% of false positive. The lack of rapid and simple methods for mass screening hamper the CRC control as well as its early diagnosis and therapy monitoring.

Some research group has already started working on developing a suitable device for the early diagnosis of CRC. A biosensor for decentralised early diagnosis, to be used as point of care testing (POCT) in this framework would be highly advantageous. More research is needed, and articles in this field are still scarce at the literature [5-8].

The availability of one or more effective blood biomarkers in blood for the CRC screening would mean a substantial advance. Since their analysis could be performed easily reducing the overuse of colonoscopy. Recent studies have shown that extracellular vesicles (EVs) are secreted by all cells to extracellular space, playing an

important role in intercellular communication. They can be classified by size into small (sEVs < 200 nm) and medium (mEVs > 200 nm) EVs according to the International Society for Extracellular Vesicles [9]. Due to their contents in specific proteins, lipids, and nucleic acids, their interest has increased notably as novel source of biomarkers for early detection [10] and prognosis of either primary tumors or metastatic lesions [11, 12]. These secreted vesicles can be isolated from a variety of bodily fluids including blood, urine, and saliva. Thus, their detection would not require invasive techniques, and could be considered as a liquid biopsy. This offers several advantages over other cancer biomarkers. Moreover, exosomes contain a cargo of such proteins, miRNAs and mRNAs which have different roles in cancer. Some of these proteins are specific to the cell-of-origin, while others are common for all EVs. Tetraspanins such as CD9, CD63 and CD81 are membrane proteins which are present in exosomes originated from most cell types, in different proportion [13]. Therefore, due to its circulating levels and its miRNA, EVs are a potential biomarker for the non-invasive diagnosis of CRC [14, 15].

The main drawback to use the EVs as useful biomarkers for CRC is related to the techniques for its analysis [16]. A variety of isolation methods have been reported based on density (ultracentrifugation and precipitation reagents), size (filtration) and affinity (immunoaffinity capture with antibodies specific to cells). It is worth noting that after the isolation process, the characterization of EVs is essential to know their physical and chemical properties. Up to date, several methods have been reported to analyse their size (electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, dynamic light scattering and asymmetrical-flow field fractionation), surface markers (enzyme-linked immunosorbent assay, western blotting, Bradford assay or flow cytometry) and molecular information (fluorescence imaging or molecular profiling). All of them require a long time being a disadvantage to EVs are used as biomarker.

Recently, several studies have been reported in which analyse exosomes in the blood of patients with lung [17] or pancreas [15,18] cancer, obtaining a specificity in the detection of cancer of 75% and 93%, respectively. These studies are the base to consider EVs as cancer biomarkers. Despite these good results, the tests developed are still very complex and also do not provide a quantification of EVs number which is very importance in the diagnosis. There are other techniques such as NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) y TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) which allow characterize and quantify EVs. However, the EVs analysis using these equipments has the drawbacks of being expensive and requiring qualified personnel and time long. To develop an analytical device that overcomes these disadvantages, but it could be able to provides good quantitative analysis, is the priority for research community in this field.

Our research group has developed the first Lateral flow immunoassays (LFIA) for EVs [19,20]. The platform was applied to detection of EVs at plasma from chronic fatigue patients [21], and also to the detection of melanoma biomarkers [22]. Lateral flow immunoassays (LFIA) are a powerful point-of-care in-vitro test due to their simplicity and rapidity to obtain results, and low-cost [23,24]. The test consists of several paper-based components (sample pad, nitrocellulose membrane and absorbent pad) assembled on a robust plastic card. The nitrocellulose membrane includes recognition elements immobilized which provide specificity for immune detection combined with chromatography, since all compounds in solution flow by capillarity, and affinity interactions separate those that react at the test line. Generally, these assays display a negative/positive response which in most cases is not enough to make a diagnosis. Consequently, the development of LFIA with quantitative capacity is a challenge in the search for simple and rapid detection. The replacement of usual reporters such as gold or latex nanoparticles by magnetic nanoparticles could improve the detection [25]. This is possible due to physical and chemical characteristics of magnetic nanoparticles which can be detected by means of coupled transducers. Magnetic LFIA have been reported to detect different important analytes in numerous fields [26]. Moreover, magnetic labels not only allow a quantification, they can also be employed for immunomagnetic separation enabling isolation and enrichment of analyte [27]. Limit of detections (LOD) and sensitivity can be enhanced thanks to immunomagnetic separation steps by means of the magnetic tags [28]. Therefore, magnetic nanoparticles could be a suitable label to both improve detection and achieve quantitative LFIA. Recently, we have developed a quantitative magnetic LFIA for EVs detection [29]. For this approach magnetic LFIA have been coupled to a sensor developed by authors to get the quantification for different concentration of isolated EVs from human plasma [29-33].

The specific antigen CD147 or EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer). CD147 is a glycoprotein released by tumour cells and it could be transferred to surrounding microenvironment and circulation in soluble form or embedded in circulating extracellular vesicles [34]. Recently, it has been reported that the amount of CD147 expressed in circulating EVs is significant higher for colorectal cancer cell lines than for normal colon fibroblast cell lines [35]. Moreover, CD147-containing EVs have been used as a biomarker to monitor response to therapy in patients with colorectal cancer [36]. Therefore, this antigen could be used as non-invasive biomarker for the detection and monitoring of colorectal cancer [37].

Here, we propose the development of a magnetic lateral flow immunoassay test coupled to inductive sensor for the non-invasive detection of colorectal cancer by CD147



embedded in EVs. This magnetic LFIA could be used as a point of care device for screening and monitoring CRC. The device has been applied to human plasma samples from CRC patients.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Chemicals and apparatus*

Anti-tetraspanin antibodies were purchased at Immunostep (Spain): anti-CD9 (clone VJ1/20), anti-CD63 (clone Tea 3/18), and anti-CD147. Anti-mouse IgG, bovine serum albumin (BSA), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]- carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) were provided by Sigma-Aldrich (Spain). HEPES was purchased from Fisher Scientific.

Some materials for strips were provided by Millipore (Germany): glass fibre membrane (GFCP001000) used as sample pad, nitrocellulose membrane (HF07504XSS) and backing cards (HF000MC100). Absorbent pad was purchased from Whatman (USA). The sample buffer used was 10 mM HEPES pH 7.4 with 0.05% Tween-20 and 1% BSA.

To prepare the detection and control lines, an IsoFlow reagent dispensing system was used. A guillotine Fellowes Gamma (Spain) was used to cut the strips. In order to quantify the intensity of the test line using reflectance measurements, a portable strip reader ESE Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., Germany) was used.

### *2.2. Sample preparation for EVs separation and analysis*

Blood samples were collected after obtaining written informed consent to the study, which was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario San Agustín and conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Peripheral venous blood was collected in Vacutainer (Becton Dickinson) tubes with EDTA as anticoagulant and processed within 30 min of collection. Blood was first centrifuged for 30 min at 1550 g to remove cells. Aliquots of plasma were maintained at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use or further centrifuged to isolate extracellular vesicles.

In order to purify the EV, the ExoQuick<sup>TM</sup> precipitation solution (System Biosciences, Palo Alto, CA) was used following the manufacturer's instructions. HEPES 10 mM (pH 7.4) was used to resuspend the EV. Then, the isolated EV were characterized (concentration and size distribution) using a NanoSight LM10 instrument (Malvern, Worcestershire, UK) and NTA 3.1 software at Nanovex Biotechnologies S.L (Asturias, Spain). To perform the experiments, samples were diluted in 10 mM HEPES 7.4.

### *2.3. Preparation of MNPs-Ab conjugates*

Superparamagnetic magnetite nanoparticles were synthesized following a coprecipitation route [38]. They were coated with a double layer of oleic acid, and then they were bioconjugated to anti-CD63 or anti-CD147 antibodies. Carbodiimide chemistry was used to activate the carboxyl groups of the nanoparticles: 100  $\mu\text{L}$  of EDC (5 mg/mL in MES 50 mM, pH 6.00) and 100  $\mu\text{L}$  of NHS (5 mg/mL in MES 50 mM, pH 6.00) were mixed with 10  $\mu\text{L}$  of nanoparticles. Following 10 min shaking, 50  $\mu\text{L}$  of detection antibody (anti-CD63 or anti-CD147) with a concentration of 1 mg/mL was added, and the mixture was left reacting at room temperature. After 4 hours, 100  $\mu\text{L}$  of the blocking solution (1% BSA in PB 10 mM, pH 7.4) was added in order to block the residual carboxyl groups on the surfaces. Then, the mixture was separated by a magnet for 10 min. Finally, 300  $\mu\text{L}$  of supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 300  $\mu\text{L}$  PB 10 mM, pH 7.4.

### *2.4. Characterization of conjugates by dynamic light scattering*

Size distribution and  $\zeta$  potential analysis were carried out in order to monitor the conjugation process. The values before and after conjugation process were compared. The equipment used was: Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) with a solid-state He–Ne laser (633 nm). Measurements were carried out at 25 °C. A reading composed of 30 measurements of the backscattered (173°) intensity was performed. For data processing and analysis, Zetasizer software version 7.03 was used.

### *2.5. Fabrication of strips*

Firstly, the nitrocellulose membrane (25 mm wide) was incorporated into a backing plastic card which provides robustness. Then, the detection and control lines of antibodies were dispensed on the membrane by an IsoFlow dispenser at a rate of 0.100  $\mu\text{L}/\text{mm}$ . The test line provides information of the analysis following a sandwich format and the control line validates the test indicating that the liquid sample has flowed adequately along the strip. The concentration and antibodies dispensed in each case were: a 1 mg/mL of anti-CD9 (clone VJ1/20) and a 1 mg/mL of anti-IgG for the test and the control lines, respectively. Then, the nitrocellulose membrane was dried for 20 min at 37 °C to ensure the immobilization of the antibodies. The sample pad and the absorbent pad were assembled onto a backing card overlapping the components by 2 mm. Finally, the complete card was cut into individual 5-mm-wide dipstick strips.

### *2.6. Optical quantification*

Reflectance measurements were performed to quantify the colour intensity of the test line. For this, a portable strip reader ESE-Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., Germany) was used. This equipment contains two channels (LED excitation and photodiode detection) in order to scan the strip by illuminating it with a light beam. Then, a confocal detector measures the attenuation from the surface of the strip registering the signal and converts it into an electrical signal, which is related to the amount of analyte at the test lines. The unit provided by this device is mm mV, resulting from integrating the electrical signal (mV) across the width of the test line (mm).

### **2.8 Magnetic quantification**

A quantitative magnetic quantification of the test lines was carried out using home-made inductive sensor which was specially adapted for scanning LFIA strips [39]. To perform the magnetic quantification, the test lines on the strips were scanned laterally over the sensing head using a micro-positioner. During the scanning, a peak of the impedance signal over the base line was produced when the test or control lines are close to sensing head. The impedance peak is integrated to account for all the particles in the line no matter how they are distributed.

The sensing head is a double copper line printed on a rigid insulating substrate across which alternating current flows. To monitor continuously the magnitude and phase of the sensing head impedance, a precision impedance analyser (Agilent 4294A) is employed using 16048G test leads and 500- mV/20-MHz excitation voltage. The change of magnetic permeability produced by the particles in the surrounding of the conductor increases significantly its impedance. This sensor has advantages over other because it does not need an external magnetic field to generate the signal reducing the system complexity.

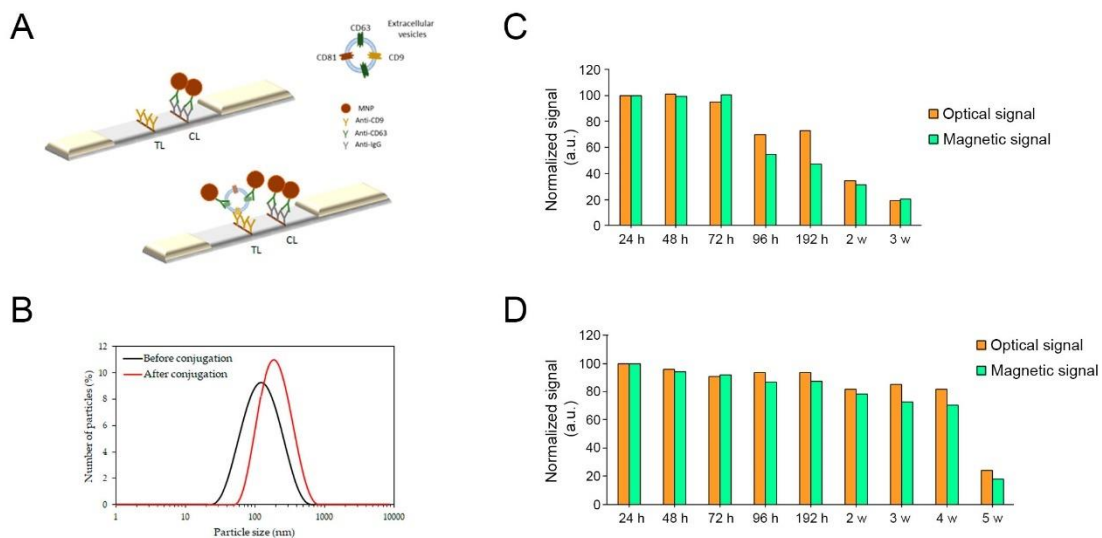
The units provided by this sensor is  $\Omega \cdot \text{mm}$  coming from the cumulative integral of the impedance ( $\Omega$ ) across the width of the test line (mm). It has been demonstrated that this changes in the impedance is directly proportional to the number of superparamagnetic nanoparticles at the test line which enable to determine indirectly the analyte concentration at the test line [29,32,33].

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Lateral flow procedure**

The immunoassay developed to detect extracellular vesicles is based on a sandwich format with two anti-tetraspanins antibodies (CD9 and CD63). They were chosen considering previous results obtained in our research group [19,20], and

optimized for the samples in this work. The anti-CD9 antibody and anti-CD63 antibody were used as capture and detection, respectively. EVs samples were diluted in running buffer to achieve a particle concentration ranging from  $8-63 \times 10^7$  EVs/ $\mu\text{L}$  EVs/ $\mu\text{L}$ . For LFIA, different aliquots of MNPs-CD63 conjugates, and EVs were added in a microtube. The sample pad of the dipstick was immersed in the tube, so the sample flowed by capillarity and MNPs-Ab-EVs complexes are retained at the test line by molecular recognition at anti-CD9 antibody immobilized at the test line (Fig. 1A). MNPs-CD63-Evs complexes were added in excess to ensure that there are enough MNPs-Ab conjugates to be retained at the control line, by the anti-mouse immunoglobulin antibodies, which validate the test. For the blank, the liquid sample does not contain EVs, and therefore MNP-CD63 were retained only at the control line (MNP-CD63-EVs complexes were not formed due to the lack of analyte). Fig. 1A represents schematically the immunoassay on the strip.



**Fig. 1. (A)** Simplified schematic illustration of the Lateral Flow Immunoassay. Specific antibodies against tetraspanins (test, TL) and anti-mouse immunoglobulin antibodies (control, CL) are immobilized on the membrane. (A) Blank test: when there are not extracellular vesicles in the sample, the test line does not appear. (B) Sample test: when there are extracellular vesicles in the sample, they are detected by the detection of the complex MNPs-CD63 displaying the test line. (B) Hydrodynamic size distribution profiles of superparamagnetic iron oxide nanoparticles before (solid black line) and after conjugation with anti CD63 antibody concentrations of 1 mg/mL (red). (C) MNPs-CD63 conjugates stability measurements at room temperature for 24, 48, 72, 96, 192 hours (h), 2 and 3 weeks (w). (D) MNPs-CD63 conjugates stability measurements at 4 °C for for 24, 48, 72, 96, 192 hours, 2, 3, 4 and 5 weeks.

### 3.2. Characterization of MNPs-CD63 conjugates

DLS measurements were used to follow the conjugations process by comparing the hydrodynamic diameter of bare nanoparticles and MNPs-Ab conjugates. Fig. 1B shows the increase of the average diameter after bioconjugation: from 105.5 nm (PDI 0.2) to 188.4 nm (PDI 0.2), respectively. This result (an increment of 83 nm approximately) confirms the success of this step. It also indicates that the carbodiimide chemistry protocol employed was suitable to activate the surface groups and the amount of detection antibody used during the conjugation process was effectively optimized.

Z potential was used to assess the stability of bare nanoparticles and MNPs-Ab. The values of  $\zeta$  potential obtained were -53.7 and -37.5 mV for bare nanoparticles and MNPs-Ab, respectively. These results indicate that the nanoparticles were very stable in solution due to the electrostatic repulsions between carboxyl groups provided by oleic acid coating on their surface. The  $\zeta$  potential value of MNPs-Ab was still high enough to indicate that the conjugates are stable in solution.

### **3.3. Stability of MNPs-CD63 conjugates**

The signal stability over time of MNP-CD63 was studied at room temperature and 4° C. For this purpose, the signal was evaluated following the same protocol explained before. The strips have been tested at different times (24, 48, 72, 96, 192 hours, 2, 3, 4 and 5 weeks after bioconjugation).

#### **3.3.1. Stability of MNPs-CD63 conjugates at room temperature**

Fig. 1C shows the optical and magnetic signals for the different times. The optical signal was stable for 72 hours maintaining 100% of signal. After 72 hours, 30% of signal was loosed. After 2 weeks the optical signal decreased 66%, and after 3 weeks, by 81%. These results indicate that the test should be carried out within 72 hours when MNPs-CD63 conjugates are stored at room temperature, in order to get the highest efficiency. This decrease could be related to the antibody stability at room temperature which would affect the conjugates used as labels in the tests. The tendency for the magnetic graph is similar than that observed with the optical readings. The signal was stable for 72 hours, and then decreased with time.

#### **3.3.2. Stability of MNPs-CD63 conjugates at 4° C**

The stability of conjugates has been studied at 4° C to investigate whether the conjugated antibody was more stable at this temperature. As Fig. 1D shows, the optical and magnetic signals were stable within 192 hours, and after 2 weeks a loss of 20% was observed. After 5 weeks, only the 20% of both signals was detected, registering a loss of 80%. It is worth noticing that the MNPs-CD63 conjugates are more stable at 4 °C than

at room temperature enabling to improve their highest stability more than one week. The results indicate that the conjugates have to be kept in the fridge in order to improve significantly their stability. This agrees with the recommendations for anti-CD63 storage, which should be kept at 4 °C according the manufacturer’s instructions.

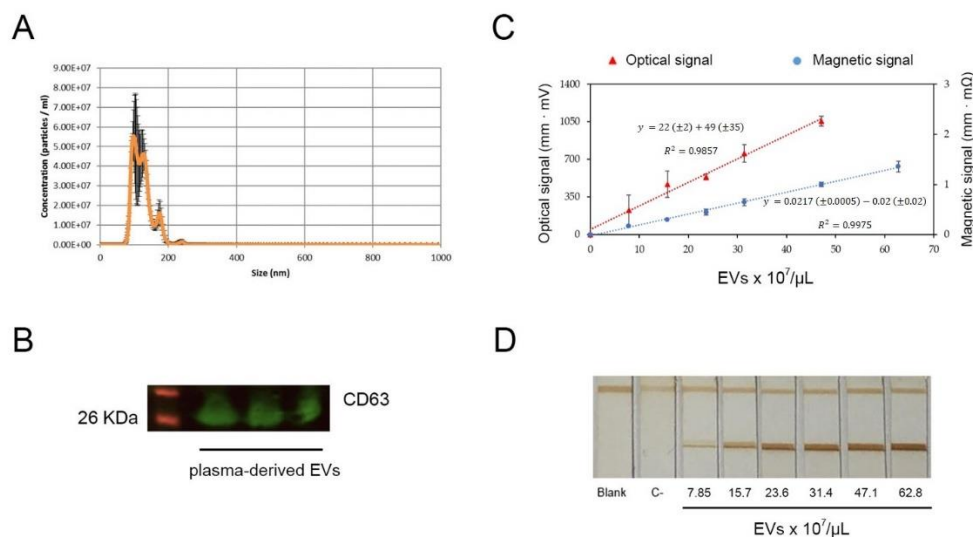
Taking into account the MNPs-CD63 conjugates stability at both temperatures, the tests should be better carried out within 72 hours if the conjugates are kept at room temperature or within two weeks if they are kept at 4 °C.

### 3.4. Extracellular vesicles characterization

ExoQuick™ precipitation solution has been used to purify EVs from plasma. It has been demonstrated that this kit is suitable for EVs isolation for their later use in LFIA [5], even better than other ones [40].

The NanoSight LM10 was used to determine the size distribution and concentration of the EVs purified from plasma. For the samples tested for the calibration, the number of EVs ranged from  $3.12 \times 10^{13}$  to  $4.38 \times 10^{13}$  particles/mL. The average size of the EVs from nanoparticle tracking analysis (NTA) was 129 nm. Fig. 2A). According to the International Society for Extracellular Vesicles, these biological vesicles could be considered “small EVs,” since their size is < 200 nm.

Fig. 2B shows the results obtained by western blot which confirm the expression of CD63 tetraspanin on the membrane of EVs isolated from human plasma of colorectal cancer patients using ExoQuick™ precipitation solution.



**Fig. 2.** (A) Representative Nanosight of EVs isolated from human plasma of colorectal cancer patients using ExoQuick™ precipitation solution. (B) Western Blot analysis of CD63 expression on EVs isolated from plasma. (C) Calibration curve obtained by optical reader (red line) and

magnetic sensor (blue line) for the detection of different concentrations of plasma extracellular vesicles by LFIA using anti-CD9 antibody (Test line) as capture antibodies and MNP-CD63 as detection conjugate. The data points were obtained in triplicate and error bars represent the standard deviations of triplicate run. (D) Representative example of results obtained in the strips.

### 3.5. Calibration

In order to calibrate the system, different concentrations of EVs purified from human plasma in the range of  $8-63 \times 10^7$  EVs/ $\mu\text{L}$  were used. The protocol to perform the tests was explained in section 3.1. Subsequently, the optical and magnetic signals were analysed in order to study the relationship between analytical signals and concentration. The results are showed in Fig. 2C.

Fig. 2D represents the calibration of real strips performed with different concentration of EVs isolated from human plasma sample of colorectal cancer patients. As a sandwich format immunoassay, the signal increases with the concentration. This can be confirmed by observing the intensity of the test lines by naked eye. Fig. 2C shows the calibrations curves for optical (red line) and magnetic (blue line) detections.

Table 1 shows a comparison of several parameters obtained (lineal ranges, slopes LODs and regression coefficients) by optical reader and inductive sensor. The optical reader is based on reflectance measurements and only nanoparticles located on the top layer of nitrocellulose surface can be quantified. Due to this feature the saturation concentration should be reached before than with other methods based on detection of nanoparticles within full thickness of the membrane. This is the case of the inductive sensor employed also in this work to quantify the test line. For magnetic measurements, the lineal range was wider as Table 1 shows. The LOD was calculated following the  $3sb/m$  criterium, where  $m$  was the slope and  $sb$  the standard deviation of the intercept. The value achieved with the inductive sensor is similar than that obtained by optical reader. The optical and the magnetic methods showed a reproducibility (RSD) of 8% ( $n = 3$ ) for both cases.

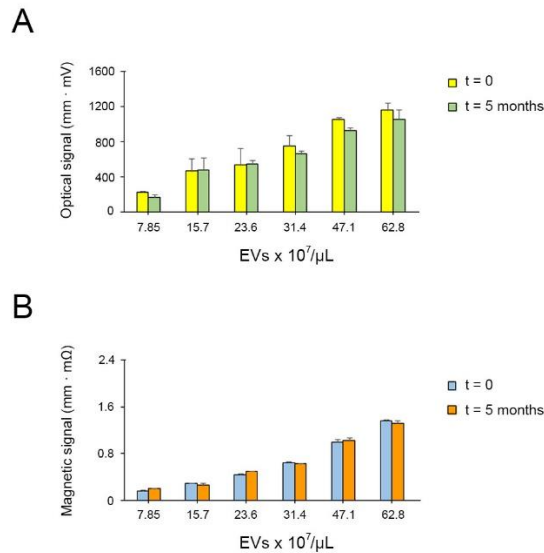
**Table 1.** Analytical Figures of merit for quantification of EVs by optical and magnetic signals of magnetic nanoparticles.

Quantification	Lineal range	Slope (Signal units/(EVs/ $\mu\text{L}$ ))	Intercept (Signal units)	LOD (EVs/ $\mu\text{L}$ )	Regression coefficient $R^2$
----------------	--------------	--	--------------------------------	------------------------------	------------------------------------

<b>Optical</b>	0-47	22 ± 2	49 ± 35	5x10 <sup>7</sup>	0.9857
	EVs x 10 <sup>7</sup> /μL				
<b>Magnetic</b>	0-63	0.0217 ± 0.0005	-0.02 ± 0.02	3x10 <sup>7</sup>	0.9975
	EVs x 10 <sup>7</sup> /μL				

### 3.6. Stability of optical and magnetic signals over time

In order to evaluate the signal stability and aging, optical and magnetic signals of strips (used for calibrations) have been measured five months after the test was run. The signals were compared with those measured immediately. Fig. 3A and 3B. show that the stability was maintained over time for both cases, with no significant differences between them. As a result, it was confirmed that strips could be checked for the optical and magnetic reading at least five months after running the test.



**Fig. 3. (A)** Optical signal stability measurements over time. **(B)** Magnetic signal stability measurements over time.

### 3.7. Applications to CD147

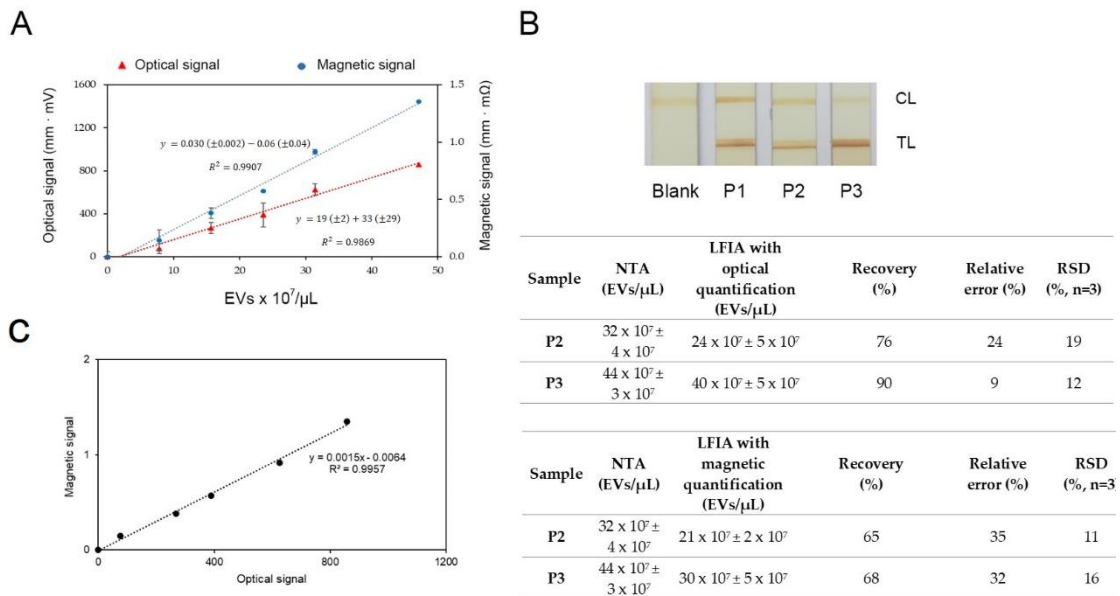
A LFIA was developed for the detection of the specific biomarker CD147 at EVs. For this purpose, the anti-CD63 previously used as detection antibody was replaced by anti-CD-147. Blood samples from 3 patients with colorectal cancer were collected following the procedure described in section 2.3. EVs were isolated and characterized by NTA. One of these samples was used to calibrate the system. With this aim, EVs in the concentration range of 8-63x10<sup>7</sup> EVs/μL were tested following the same protocol previously indicated. The optical reader and inductive sensor were used to get a quantitative measurements of test lines. Fig. 4A shows the calibration curves for the



optical ( $y = 19 (\pm 2)x - 33 (\pm 29)$ , red line) and magnetic ( $y = 0.030x (\pm 0.002) - 0.06 (\pm 0.04)$ , blue line) quantifications. The LODs reached were very similar:  $4.5 \times 10^7$  and  $4 \times 10^7$  EVs/ $\mu\text{L}$  for optical and magnetic quantification, respectively.

Once the LFIA was calibrated for this application, it was used for EV quantification through the CD147 biomarker, and the concentration results were compared with those of the NTA analysis. Despite the differences in measuring principles (NTA and LFIA), the results are in agreement and in the same order of magnitude ( $10^7$  EVs/ $\mu\text{L}$ ). Fig. 4B shows the strips and the comparative results.

A Student's t test was carried out to determine the significance of the results obtained by LFIA comparing with NTA method [41]. The t values calculated for the magnetic (2.64 and 3.63 for P2 and P3, respectively) and optical (1.62 and 0.96 for P2 and P3, respectively) quantification for both samples were less than the t value tabulated for two degrees of freedom and a 0.05 significance level (4.30). These values mean that not significant differences between the results obtained with LFIA and NTA were found.



**Fig. 4.** (A) Calibration curve obtained by optical reader (red line) and magnetic sensor (blue line) for the detection of different concentrations of plasma extracellular vesicles by LFIA using anti-CD9 antibody (Test line) as capture antibodies and MNP-CD147 as detection conjugate. The data points were obtained in triplicate and error bars represent the standard deviations of triplicate run. (B) Results obtained in the strips for several patients (P2 and P3) with their corresponding values of concentration (obtained by different method NTA and LFIA with optical and magnetic quantification), recovery, relative error and RSD. (C) Correlation analysis between

the measured optical and magnetic signals of LFIA strips for CD147 detection from 0 to  $62.8 \times 10^7$  EVs/ $\mu$ L.

Therefore, the immunochromatographic strips prepared in this work enable the quantification of EVs through CRC biomarker by a simple procedure and low-cost materials. The tests can be used with optical or magnetic transducers, and in both cases provide results that agree with NTA results. Moreover, Fig. 4C shows that both measuring principles are correlated, since a good linear correlation was found between them ( $R^2 = 0.9957$ ). This validates the experimental in-house magnetic sensor and demonstrates the dual-signal LFIA. Figure 4B shows that the magnetic method has better reproducibility. However, its lower sensitivity for this determination yields to lower Recovery values and consequently, higher relative errors.

Nevertheless, this LFIA can be used as POC test to carry out screening of CRC patients, either with optical or magnetic detection, providing therefore a POC platform that does not need expensive instrument, laborious protocols and skilled personnel. The total time from isolation of EVs and results was 2 hours.

#### 4. Conclusions

This work shows that it is possible to carry out the quantification of EVs by means of magnetic lateral flow immunoassays. For total EV content, the detection antibody used was antiCD63 and for detection of CRC biomarker, antiCD147. In both cases, magnetic nanoparticles with a double layer of oleic acid were used as reporter label.

The LODs achieved, when anti-CD63 was used as detection antibody, were  $5 \times 10^7$  and  $3 \times 10^7$  EVs/ $\mu$ L for optical and magnetic quantification, respectively. For CD-147 antibody, the LODs obtained were  $4.5 \times 10^7$  and  $4 \times 10^7$  EVs/ $\mu$ L for optical reader and inductive sensor, respectively. The antibody-MNPs conjugates were stable at least for 72 hours and two weeks after conjugation process when the conjugates were kept at room temperature and  $4^\circ\text{C}$ , respectively. The optical and magnetic signals displayed by MNPs at the test lines were stable over time at least five months. With these immunochromatographic tests, it was possible to analyse specific EVs biomarkers in 2 hours, by a simple and user-friendly device. The results agreed with those achieved by the NTA. The experimental magnetic sensor was validated by the correlation with the commercial optical reader based on reflectance measurements. The methods developed in this work are useful for Point-of-Care screening and monitoring of CRC patients.

#### References

- [1] P. Rawla, T. Sunkara, A. Barsouk, Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors, *Prz. Gastroenterol.* 14 (2019) 89–103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>.
- [2] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J.W.W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012, *Eur. J. Cancer.* 49 (2013) 1374–1403. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>.
- [3] R.W. Group, Cancer Incidence in Spain, 2015, *Clin Transl Oncol.* 19 (2017) 799–825.
- [4] M. Arnold, M.S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality, *Gut.* 66 (2017) 683–691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.
- [5] M.A. Raji, G. Amoabediny, P. Tajik, M. Hosseini, E. Ghafar-Zadeh, An apta-biosensor for colon cancer diagnostics, *Sensors (Switzerland).* 15 (2015) 22291–22303. <https://doi.org/10.3390/s150922291>.
- [6] J. Quinchia, D. Echeverri, A.F. Cruz-Pacheco, M.E. Maldonado, J.A. Orozco, Electrochemical biosensors for determination of colorectal tumor biomarkers, *Micromachines.* 11 (2020) 1–46. <https://doi.org/10.3390/M11040411>.
- [7] T. Narayan, S. Kumar, S. Kumar, S. Augustine, B.K. Yadav, B.D. Malhotra, Protein functionalised self assembled monolayer based biosensor for colon cancer detection, *Talanta.* 201 (2019) 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.039>.
- [8] M. Soler, M.C. Estevez, R. Villar-Vazquez, J.I. Casal, L.M. Lechuga, Label-free nanoplasmonic sensing of tumor-associate autoantibodies for early diagnosis of colorectal cancer, *Anal. Chim. Acta.* 930 (2016) 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.059>.
- [9] C. Théry, K.W. Witwer, E. Aikawa, M.J. Alcaraz, J.D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G.K. Atkin-smith, D.C. Ayre, M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, N.N. Bauer, A.A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A.B. Zavec, A. Benmoussa, A.C. Berardi, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F.E. Borràs, S. Bosch, C.M. Boulanger, X. Breakefield, A.M. Breglio, Á. Meadhbh, D.R. Brigstock, A. Brisson, M.L.D. Broekman, F. Bromberg, P. Bryl-górecka, S. Buch, A.H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E.I. Buzás, B. Byrd, G. Camussi, D.R.F. Carter, S. Caruso, W. Lawrence, Y. Chang, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, R. Chin, A. Clayton, S.P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, J. Coffey, A. Cordeiro-da-silva, Y. Couch, F.A.W. Coumans, F.D.S. Junior, O. De Wever, H.A. Portillo, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L.C. Dieterich, V. Dolo, A. Paula, D. Rubio, M.R. Dourado, T.A.P. Driedonks, F. V Duarte, M. Duncan, R.M. Eichenberger, K. Ekström, S.E.L. Andaloussi, C. Elie-caille, U. Erdbrügger, J.M. Falcón-pérez, F. Fatima, J.E. Fish, M. Flores-bellver, A. Försönits, A. Frelet-barrand, C. Gilbert, M. Gimona, I. Giusti, D.C.I. Goberdhan, H. Hochberg, K.F. Hoffmann, B. Holder, H. Holthofer, A.G. Ibrahim, T. Ikezu, J.M.

Inal, M. Isin, G. Jenster, L. Jiang, S.M. Johnson, G.D. Kusuma, S. Kuypers, S. Laitinen, S.M. Langevin, E. Lázaro-ibáñez, S. Le Lay, M. Lee, Y. Xin, F. Lee, S.F. Libregts, E. Ligeti, R. Lim, S.K. Lim, A. Linē, J. Lorenowicz, Á.M. Lőrincz, J. Lötvall, J. Lovett, M.C. Lowry, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 ( MISEV2018 ): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, 3078 (2018). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.

[10] S.H. Jalalian, M. Ramezani, S.A. Jalalian, K. Abnous, S.M. Taghdisi, Exosomes, new biomarkers in early cancer detection, *Anal. Biochem.* 571 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.013>.

[11] D.W. Greening, S.K. Gopal, R. Xu, R.J. Simpson, W. Chen, Exosomes and their roles in immune regulation and cancer, *Semin. Cell Dev. Biol.* 40 (2015) 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.009>.

[12] J. Rak, Extracellular vesicles - biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer, *Front. Pharmacol.* 4 MAR (2013) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00021>.

[13] Z. Andreu, M. Yáñez-Mó, Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function, *Front. Immunol.* 5 (2014) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>.

[14] L. Zhao, J. Yu, J. Wang, H. Li, J. Che, B. Cao, Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients, *J. Cancer.* 8 (2017) 1145–1152. <https://doi.org/10.7150/jca.18026>.

[15] B. Madhavan, S. Yue, U. Galli, S. Rana, W. Gross, M. Müller, N.A. Giese, H. Kalthoff, T. Becker, M.W. Büchler, M. Zöller, Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity, *Int. J. Cancer.* 136 (2015) 2616–2627. <https://doi.org/10.1002/ijc.29324>.

[16] V. Sunkara, H.K. Woo, Y.K. Cho, Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics, *Analyst.* 141 (2016) 371–381. <https://doi.org/10.1039/c5an01775k>.

[17] G. Rabinowits, C. Gerçel-Taylor, J.M. Day, D.D. Taylor, G.H. Kloecker, Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer, *Clin. Lung Cancer.* 10 (2009) 42–46. <https://doi.org/10.3816/CLC.2009.n.006>.

[18] S.A. Melo, L.B. Luecke, C. Kahlert, A.F. Fernandez, S.T. Gammon, J. Kaye, V.S. LeBleu, E.A. Mittendorf, J. Weitz, N. Rahbari, C. Reissfelder, C. Pilarsky, M.F. Fraga, D. Piwnica-Worms, R. Kalluri, Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer, *Nature.* 523 (2015) 177–182. <https://doi.org/10.1038/nature14581>.

[19] M. Oliveira-Rodríguez, S. López-Cobo, H.T. Reyburn, A. Costa-García, S. López-Martín, M. Yáñez-Mó, E. Cernuda-Morollón, A. Paschen, M. Valés-Gómez, M.C. Blanco-López, Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously

enriched from cell culture medium and body fluids, *J. Extracell. Vesicles*. 5 (2016). <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31803>.

[20] M. Oliveira-Rodríguez, E. Serrano-Pertierra, A.C. García, S.L. Martín, M.Y. Mo, E. Cernuda-Morollón, M.C. Blanco-López, Point-of-care detection of extracellular vesicles: Sensitivity optimization and multiple-target detection, *Biosens. Bioelectron.* 87 (2017) 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.001>.

[21] J. Castro-Marrero, E. Serrano-Pertierra, M. Oliveira-Rodríguez, M.C. Zaragoza, A. Martínez-Martínez, M. del C. Blanco-López, J. Alegre, Circulating extracellular vesicles as potential biomarkers in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: an exploratory pilot study, *J. Extracell. Vesicles*. 7 (2018). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1453730>.

[22] S. López-Cobo, C. Campos-Silva, A. Moyano, M. Oliveira-Rodríguez, A. Paschen, M. Yáñez-Mó, M.C. Blanco-López, M. Valés-Gómez, Immunoassays for scarce tumour-antigens in exosomes: Detection of the human NKG2D-Ligand, MICA, in tetraspanin-containing nanovesicles from melanoma, *J. Nanobiotechnology*. 16 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0372-z>.

[23] M. Sajid, A.N. Kawde, M. Daud, Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review, *J. Saudi Chem. Soc.* 19 (2015) 689–705. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.09.001>.

[24] E.B. Bahadır, M.K. Sezgintürk, Lateral flow assays: Principles, designs and labels, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 286–306. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.006>.

[25] A.E. Urusov, A. V. Zherdev, B.B. Dzantiev, Towards lateral flow quantitative assays: Detection approaches, *Biosensors*. 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/bios9030089>.

[26] A. Moyano, E. Serrano-pertierra, M. Salvador, J.C. Martínez-garcía, Magnetic Lateral Flow Immunoassays, (2020) 1–23. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050288>.

[27] L. Guo, Y. Shao, H. Duan, W. Ma, Y. Leng, X. Huang, Y. Xiong, Magnetic Quantum Dot Nanobead-Based Fluorescent Immunochromatographic Assay for the Highly Sensitive Detection of Aflatoxin B 1 in Dark Soy Sauce, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4727–4734. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00223>.

[28] S.C. Razo, V.G. Panferov, I. V. Safenkova, Y.A. Varitsev, A. V. Zherdev, B.B. Dzantiev, Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles, *Anal. Chim. Acta.* 1007 (2018) 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.12.023>.

[29] A. Moyano, E. Serrano-pertierra, C. Mart, Y. Piñeiro, S. Yáñez-vilar, G. Manuel, J. Rivas, M.C. Blanco-l, Carbon-Coated Superparamagnetic Nanoflowers for Biosensors Based on Lateral Flow Immunoassays, (n.d.).

- [30] M. Rivas, D. Lago-Cachón, J.C. Martínez-García, J.A. García, A.J. Calleja, Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits, *Sensors Actuators, A Phys.* 216 (2014) 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2014.05.023>.
- [31] D. Lago-Cachón, M. Rivas, J.C. Martínez-García, J.A. García, Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles, *Nanotechnology.* 24 (2013). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/24/245501>.
- [32] A. Moyano, M. Salvador, J.C. Martínez-García, V. Socoliuc, L. Vékás, D. Peddis, M.A. Alvarez, M. Fernández, M. Rivas, M.C. Blanco-López, Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 6615–6624. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02031-6>.
- [33] D. Lago-Cachón, M. Oliveira-Rodríguez, M. Rivas, M.C. Blanco-López, J.C. Martínez-García, A. Moyano, M. Salvador, J.A. García, Scanning Magneto-Inductive Sensor for Quantitative Assay of Prostate-Specific Antigen, *IEEE Magn. Lett.* 8 (2017). <https://doi.org/10.1109/LMAG.2017.2702108>.
- [34] G.D. Grass, B.P. Toole, How, with whom and when: An overview of CD147-mediated regulatory networks influencing matrix metalloproteinase activity, *Biosci. Rep.* 36 (2016) 1–16. <https://doi.org/10.1042/BSR20150256>.
- [35] Y. Yoshioka, N. Kosaka, Y. Konishi, H. Ohta, H. Okamoto, H. Sonoda, R. Nonaka, H. Yamamoto, H. Ishii, M. Mori, K. Furuta, T. Nakajima, H. Hayashi, H. Sugisaki, H. Higashimoto, T. Kato, F. Takeshita, T. Ochiya, Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms4591>.
- [36] A. Landras, C.R. de Moura, F. Jouenne, C. Lebbe, S. Menashi, S. Mourah, CD147 is a promising target of tumor progression and a prognostic biomarker, *Cancers (Basel).* 11 (2019) 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers11111803>.
- [37] Y. Tian, L. Ma, M. Gong, G. Su, S. Zhu, W. Zhang, S. Wang, Z. Li, C. Chen, L. Li, L. Wu, X. Yan, Protein Profiling and Sizing of Extracellular Vesicles from Colorectal Cancer Patients via Flow Cytometry, *ACS Nano.* 12 (2018) 671–680. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07782>.
- [38] D. Bica, L. Vékás, M. V. Avdeev, O. Marinică, V. Socoliuc, M. Bălăsoiu, V.M. Garamus, Sterically stabilized water based magnetic fluids: Synthesis, structure and properties, *J. Magn. Mater.* 311 (2007) 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.11.158>.
- [39] M. Salvador, Á. Gallo-cordova, A. Moyano, J.C. Martínez-garcía, M.C. Blanco-lópez, M.P. Morales, optimized nanotags for point-of-use inductive, (2020). <https://doi.org/10.1039/d0an00849d>.
- [40] E. Serrano-Pertierra, M. Oliveira-Rodríguez, M. Rivas, P. Oliva, J. Villafani, A. Navarro, M.C. Blanco-López, E. Cernuda-Morollón, Characterization of plasma-derived extracellular vesicles isolated by different methods: A comparison study, *Bioengineering.* 6 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6010008>.

[41] J. Miller, J., Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, sixth ed, Prentice Hall, Harlow, U.K, 2010.

## **CAPÍTULO B.3: Desarrollo de ensayos inmuncromatográficos para la determinación de histamina en vino**

---

### **B.3.1 Introducción y motivación**

Como se ha mencionado en la introducción, la histamina es una amina biógena que puede causar intolerancias en personas con alta sensibilidad o ser tóxica a partir de ciertos niveles de ingesta. Por este motivo, se hace necesaria su cuantificación en los distintos alimentos donde se puede encontrar. La cromatografía es la herramienta más utilizada para el análisis de este tipo de compuestos, pero es lenta, requiere equipos de análisis costosos y personal especializado en la técnica. Es por ello que, en este capítulo, se propone el desarrollo de una técnica POCT basada en MLFIAs para la determinación de histamina en vino tinto. Esta puede ser una herramienta de mucho interés para las pequeñas bodegas que se ven limitadas a la implementación de un laboratorio central para llevar a cabo el control y calidad de sus vinos. También los consumidores de vino intolerantes a la histamina e incluso los restauradores constituyen un mercado objetivo para este tipo de dispositivo.

Los excelentes resultados encontrados con los MLFIAs desarrollados para detección de EVs incentivaron el desarrollo de la técnica para esta aplicación alimentaria. Dadas las características de la histamina (su pequeño peso molecular) el ensayo desarrollado en este caso es de formato competitivo. En primer lugar, el desarrollo del ensayo se hizo utilizando oro coloidal como marca de detección. Una vez optimizado en el inmunoensayo se reemplazaron las nanopartículas de oro por MNPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ . Las nanopartículas fueron recubiertas con proteína A/G, que también es utilizada como entrecruzador para obtener una aglomeración controlada de las MNPs con el objetivo de amplificar la señal.

Se calibraron tiras de LFIAs, tanto con partículas de oro como magnéticas, con diluciones estándar de histamina, obteniéndose límites de detección similares para los métodos óptico e inductivo de cuantificación (mejores con el detector inductivo). Las ventajas de las MNPs frente a las marcas de oro se hicieron patentes al medir muestras reales de vino tinto (se analizaron vinos en diferentes puntos de procesado: al final de



### ***Resultados y discusión. Capítulo B.3***

---

la fermentación alcohólica, de la fermentación maloláctica, vino joven recién embotellado y reserva). La lectura magnética no se ve afectada por el color. Estos resultados se validaron por medidas de HPLC. Las muestras de vino tinto fueron aportadas por D. Juan Manuel Redondo Losada, enólogo de la bodega Vinos Cangas S.L. (Asturias). En el trabajo han colaborado los doctores María Fernández y Miguel A. Álvarez del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA, CSIC).

Esta investigación dio lugar a un artículo publicado en la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, que se incluye a continuación.

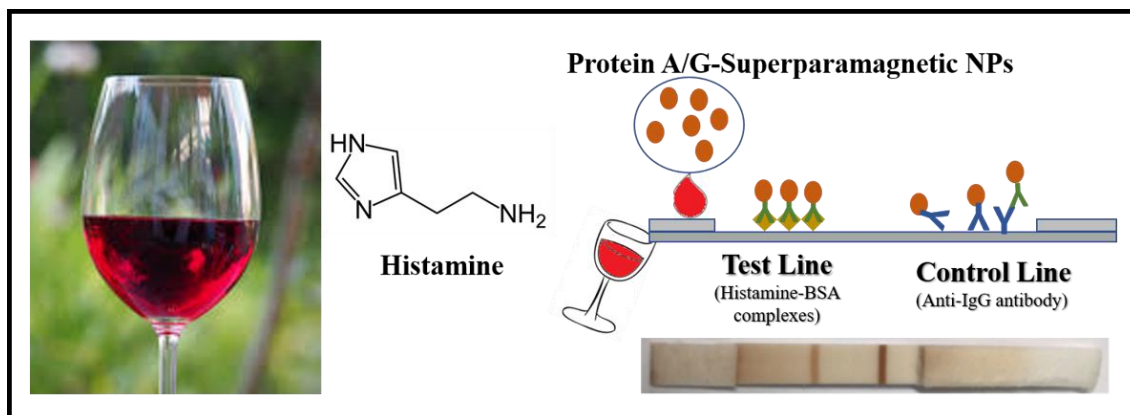
## B.3.2 Artículo científico

This work has been published as:

*Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2019**, 411, 6615-6624



### GRAPHICAL ABSTRACT







## Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine

Amanda Moyano<sup>1,2</sup>, María Salvador<sup>2,3</sup>, José C. Martínez-García<sup>2</sup>, Vlad Socoliuc<sup>4</sup>, Ladislau Vékás<sup>4</sup>, Davide Peddis<sup>3</sup>, Miguel A. Alvarez<sup>5</sup>, María Fernández<sup>5</sup>, Montserrat Rivas<sup>\*2</sup>, M. Carmen Blanco-López<sup>\*1</sup>

*1 Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, c/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain*

*2 Department of Physics, University of Oviedo, 33204 Gijón, Spain*

*3 Institute of Structure of Matter (CNR), 00015 Monterotondo Scalo, RM, Italy*

*4 Laboratory of Magnetic Fluids, Center for Fundamental and Advanced Technical Research, Romanian Academy – Timisoara Branch, 300223 Timisoara, Romania*

*5 Dairy Research Institute of Asturias, IPLA (CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain*

### ABSTRACT

Histamine, a biogenic amine, is abundant in fermented foods and beverages, notably wine. A high intake of this monoamine may produce adverse reactions in humans, which may be severe in individuals with a reduced capacity to catabolise extrinsic histamine. Thus, control of histamine concentration during wine production and before distribution is advisable. Simple, rapid, point-of-use bioanalytical platforms are needed because traditional methods for the detection and quantification of histamine are expensive and time-consuming. This work applies the lateral flow immunoassay technique to histamine detection. Superparamagnetic particle labels, and an inductive sensor designed to read the test line in the immunoassay, enable magnetic quantification of the molecule. The system is calibrated with histamine standards in the interval of interest for wine production. A commercial optical strip reader is used for comparison measurements. The lateral flow system has a limit of detection of 1.2 and 1.5 mg/L for the inductive and optical readers, respectively. The capability of the inductive system for histamine

quantification is demonstrated for wine samples at different processing points (at the end of alcoholic fermentation, at the end of malolactic fermentation, in freshly bottled wine, and in reserve wine). The results are validated by ultra-high-performance liquid chromatography.

---

**KEYWORDS:** Biogenic amines, Histamine, Lateral flow immunoassay, Superparamagnetic nanoparticles, Histamine biosensor

## **Introduction**

---

Biogenic amines (BAs) are basic nitrogenous compounds with low molecular weight and biological activity. The most frequent among them are histamine, tyramine, tryptamine, putrescine and cadaverine, and are present in several foodstuffs in a variable range of concentrations depending on the food [1]. BAs are produced by certain bacteria and yeasts during the fermentation of wines, and other beverages and foods as beer, chocolate or cheese. They can also be produced by the normal metabolic activity of animal and vegetal cells. However, in fermented products, where BAs can reach the highest concentrations, they are normally generated by the microbial decarboxylation of the corresponding amino acids. In some cases, these microorganisms, Gram-positive and Gram-negative bacteria, are part of the starter and/or the secondary microbiota, necessary to produce the desired fermentation of the product. In other cases, they are present as food contaminants [2].

Histamine is one of the most abundant and toxic BAs in fermented foods. Even in small amounts it can produce symptoms in susceptible individuals, and in high levels it can cause serious toxicological problems [3]. In alcoholic beverages, the toxic effects can be stronger due to the inhibition effect of alcohol on the intestinal epithelium detoxification system [4], which is one of the main reasons why it is so important to analyse wines.

Despite the risk of histamine, there is no consensus in the legislation to regulate its concentration in food. Only in fishery products the maximum histamine levels have been set at 50 mg/kg by the US Food and Drug Administration [5] and at 100 mg/kg by the European Community [6]. In the case of wine, there are no legal restrictions, but some European countries recommend upper limits that range from 2 to 10 mg/L depending on the country [7,8,9]. These considerations need to be taken into account to facilitate commercial transactions.

But, besides the health risks of BAs, they can also affect the organoleptic quality of the wine. It has been reported that histamine can be generated during different stages of the winemaking process: alcoholic fermentation by yeasts [10,11], malolactic fermentation by bacteria [12,13] and ageing [14]. Other factors such as time, storage conditions (temperature and pH), raw material quality and possibility of contamination during ageing can contribute to increase histamine content. All kind of wines may contain BAs, but typically red wines have more than other varieties (white, rose, rice, and Porto) due to their vinification processes [15], and even high-rated wines may have them.

These considerations have prompted attentive wine producers and consumers to get interested in bioanalytical methods that are fast and unsophisticated to detect and quantify BAs for sensitive individuals and wine producers both during the winery process and in the final product.

Up to now, different methods have been reported to detect BAs. Currently, the most used analytical technique is liquid chromatography (LC) coupled to ultraviolet, fluorescence or mass spectrophotometry detectors [16]. Gas chromatography (GC) is a faster alternative for which pre-derivatisation is required to increase the volatility and decrease polarities of the BAs [17]. Capillary electrophoresis (CE) is the second most common technique for BA determination because it is very adequate for screenings [18]. The chromatographic techniques described above (LC, GC and CE) give a precise and sensitive analysis of numerous BAs simultaneously. However, they are time-consuming and require expensive instruments and qualified personnel. Non-chromatographic analyses are alternatives that include biosensors [19,20,21], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [22] and flow injection analysis [23]. These methods are faster but require sample pre-treatment to clean up matrix interferences. Moreover, they still require specialised personnel and are difficult to implement in a cellar, where a rapid respond with the minimum complexity is needed.

Lateral flow immunoassay (LFIA) is a powerful point-of-use system for simple, rapid, portable and low-cost analysis in different fields (clinical diagnosis, food safety and environment). The LFIA technique is based on an immunochromatographic separation at nitrocellulose dipsticks, as sample flows by capillary action. The test involves different cellulosic materials (sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane and adsorption pad) assembled on a plastic backing to get robustness. The recognition of the analyte relies on the use of specific molecules immobilised on the membrane in two lines (test and control lines). LFIA combines the technology of ELISA and chromatography, overcoming some drawbacks of both methods, such as time-consumption and complexity. There are different formats depending on the analyte. The most common are sandwich format, in which two antibodies are used to recognise the analyte, and competitive format for low molecular weight compounds, such as histamine, in which a single antibody is available for the recognition of the molecule of interest. Several systems have been used as reporter labels in LFIAs: gold, iron oxide, carbon, selenium or silver nanoparticles (NPs), coloured latex beads, quantum dots, enzymes or liposomes. Frequently, LFIA operates on a purely qualitative basis, displaying a positive/negative answer. Motivated by the concern on fishery products, lateral flow devices for a rapid visual detection of histamine have been developed [24], some of

which can be applied also to wine. These tests are aimed at detecting unsafe levels of histamine according to legal regulation on fish, so they provide a positive/negative response with a threshold of 50 ppm or 200 ppm.

This article focuses on adding quantitative capacities to LFIAs for histamine in red wine, while reducing the LOD to levels to match the European recommendations for this product (2–10 ppm). Associating the LFIA to a reading equipment which does not compromise the rapidity and simplicity of the test is a major challenge [25]. Recently, magnetic nanoparticles have been proposed as LFIA labels to enable, besides the visual detection, magnetic quantification [26,27,28,29]. The authors have reported on a novel inductive sensor to quantify superparamagnetic particles without the application of exciting fields, which largely reduces the complexity and cost of the device [30,31]. The system, adapted for LFIA strips, has been successfully used to determine prostate-specific antigen concentrations in the clinical range of interest by using a sandwich format [32]. This measuring device does not require bulky components. This means that it can be easily miniaturised to a point-of-use portable device.

In this article, we use this novel approach to detect and quantify histamine, in the concentration range of interest for wines. Although the thresholds already adopted as recommendation in some EU countries are 2–10 mg/L, studies on 100 selected high-quality red wines made from seven different cultivars found that 34% were above this limit and as high as 27 mg/L [9]. The range of interest widens then to 1–100 mg/L.

We report for the first time on a histamine quantification technique for red wine based on a magnetic competitive LFIA. Red wine is especially challenging to its intensely coloured matrix that implies high background and poor reliability for the traditional optical readers. The purple colour of red wine aggravates the problem as the classical labels are gold NPs that yield a similar red-purple colour. Therefore, this work was aimed at developing a LFIA based on superparamagnetic labels. The immunoassay is combined to an inductive sensor capable to quantify the magnetic moment of such labels. The system has been tested with red wine samples and validated against ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) analyses. The system proved to be successful as a histamine point-of-use analytical technique in the range of regulatory concern.



## **Materials and methods**

---

### **Reagents and instruments for the immunoassay**

Mouse histamine monoclonal antibody (MBS2025715) and histamine-BSA conjugate antigen (MBS358205) were purchased from Mybiosource. Anti-mouse IgG, bovine serum albumin (BSA), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and histamine dihydrochloride were provided by Sigma-Aldrich (Spain). Recombinant protein A/G was purchased at Thermo Scientific (MA, USA). Gold nanoparticles of size 40 nm were purchased from BB International (UK). Disposable 0.45 µm PVDF filters were purchased from GE Healthcare Life Sciences.

Glass fibre membrane (GFCP001000) used as sample pad and backing cards (HF000MC100) were purchased from Millipore (Germany). Other materials used were nitrocellulose membranes (UniSart CN95, Sartorius, Spain) and absorbent pads (Whatman, USA). Based on previous results, the sample buffer consisted of 10 mM phosphate buffer (PB) pH 7.4 with 0.5% Tween-20 and 1% BSA.

An IsoFlow reagent dispensing system (Imagene Technology, USA) was used to dispense the detection lines (dispense rate 0.100 µL/mm) and the strips were cut with a guillotine Fellowes Gamma (Spain). A portable strip reader ESE Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., Germany) was used to quantify the intensity of the test line by reflectance measurements.

### **Functionalisation of labels with protein A/G**

Protein A/G was conjugated to gold nanoparticles for its functionalisation. A gold colloidal titration was carried out to find the optimal concentration of protein A/G to stabilise the gold nanoparticles. The titration experiments show that 1.5 mg/mL of protein is the optimal concentration for its functionalisation. For the conjugation, 100 µL of 1.5 mg/mL protein A/G was added to 1.5 mL of gold nanoparticles in suspension. After shaking for 1 h, 100 µL of blocking solution (1 mg/mL BSA in PB 10 mM, pH 7.4) was added to block the residual surfaces of the gold conjugate. After 20 min of blocking reaction, the mixture was centrifuged at 6800g for 20 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 2 mM of PB buffer, pH 7.4, with 10% sucrose and 1% BSA. The conjugate protein A/G-gold nanoparticles were stored at 4 °C until used.

Superparamagnetic magnetite nanoparticles prepared by a coprecipitation route and coated with a double layer of oleic acid [33] were functionalised using recombinant protein A/G to develop the immunoassay. Firstly, the carboxyl groups of the nanoparticles were activated using the carbodiimide chemistry. For this, 100  $\mu\text{L}$  of EDC (5 mg/mL in MES 50 mM, pH 6.00), 100  $\mu\text{L}$  of NHS (5 mg/mL in MES 50 mM, pH 6.00) and 100  $\mu\text{L}$  of recombinant protein A/G (different concentrations were used to optimise the assay) were mixed with 10  $\mu\text{L}$  of nanoparticles. After shaking for 4 h, the residual carboxyl groups on the surfaces were blocked by adding 100  $\mu\text{L}$  of the blocking solution (1% BSA in PB 10 mM, pH 7.4). Then, the mixture was centrifuged at 21,448g for 20 min. Finally, 300  $\mu\text{L}$  of supernatant was discarded and the pellet was resuspended in PB 10 mM, pH 7.4.

### **Characterisation of nanoparticle conjugates by dynamic light scattering**

Size distribution and  $\zeta$  potential assays were carried out with a Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a solid-state He–Ne laser (633 nm). This instrument was used to monitor the conjugation process. A total of three readings were carried out at 25 °C. Each reading was composed of 15 measurements of the backscattered (173°) intensity. Zetasizer software version 7.03 was used for data processing and analysis.

### **Preparation of the immunostrips**

The competitive LFIA to detect histamine was carried out in a dipstick format. The nitrocellulose membrane (25 mm wide) was incorporated into a backing plastic card to make it robust enough. Two lines of antibodies were immobilised across the nitrocellulose strip: (i) the test line to provide the result of the analysis and (ii) the control line to get the guarantee that the liquid sample has flowed adequately along the strip. Both lines were applied by the IsoFlow dispenser at a rate of 0.100  $\mu\text{L}/\text{mm}$ . A 1 mg/mL concentration of histamine-BSA conjugate was used for the test line and a 1 mg/mL concentration of anti-IgG for the control line. The nitrocellulose membrane was dried for 20 min at 37 °C after the immobilisation of the control and test lines. Then, the sample pad and the absorbent pad were settled onto a backing card with an overlap between them of 2 mm. The complete strip was cut into individual 5-mm-wide dipsticks.

## **Magnetic quantification**

To provide a quantitative signal of the test line, an inductive sensor specially developed for strip immunoassays was used [32]. Its sensing head consists of a double copper line printed on a rigid insulating substrate across which alternating current flows. The magnitude and phase of the sensing head impedance are continuously monitored by a precision impedance analyser (Agilent 4294A) using 16048G test leads and 500-mV/20-MHz excitation voltage. The change of magnetic permeability produced by the particles in the surrounding of the conductor increases significantly its impedance. The test lines on the strips were scanned laterally over the sensing head by a micro-positioner, producing a peak of the impedance signal over the base line that is integrated to account for all the particles in the line no matter how they are distributed. The signal provided by the sensor is then measured in  $\Omega \cdot \text{mm}$  coming from the cumulative integral of the impedance ( $\Omega$ ) across the width of the test line (mm). This alteration in the impedance is directly proportional to the number of superparamagnetic nanoparticles at the test line. As the magnetic NPs were used in the strips as labels, this approach was used to calibrate the quantification of histamine. After the calibration with histamine standards, a similar procedure was used to quantify the concentration of histamine in real red wine samples.

## **Optical measurements**

A portable strip reader ESE-Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., Germany) was used to quantify the colour intensity of the test line by reflectance measurements. The optical reader analyses the reflectance at the control and test line by using two channels (LED excitation and photodiode detection). The reader scans the strip by illuminating it with a light beam and then measures the attenuation from the surface of the strip through a confocal detector. The detector registers the signal and converts it into an electrical signal that is related to the amount of analyte at the control and test lines. The device provides values in units of  $\text{mm} \cdot \text{mV}$ , resulting from integrating the electrical signal (mV) across the width of the test line (mm).

## **Validation by ultra-high-performance liquid chromatography measurements**

The wine samples were prepared and analysed by UHPLC following a method reported elsewhere [34]. The samples analysed correspond to red wine from different elaboration stages, at the end of the alcoholic fermentation (sample A), freshly bottled

(sample B), reserve wine (sample C) and at the end of the malolactic fermentation (samples D and E), all from the Vino de Cangas Protected Origin Region (from Asturias in Spain).

## **Results and discussion**

---

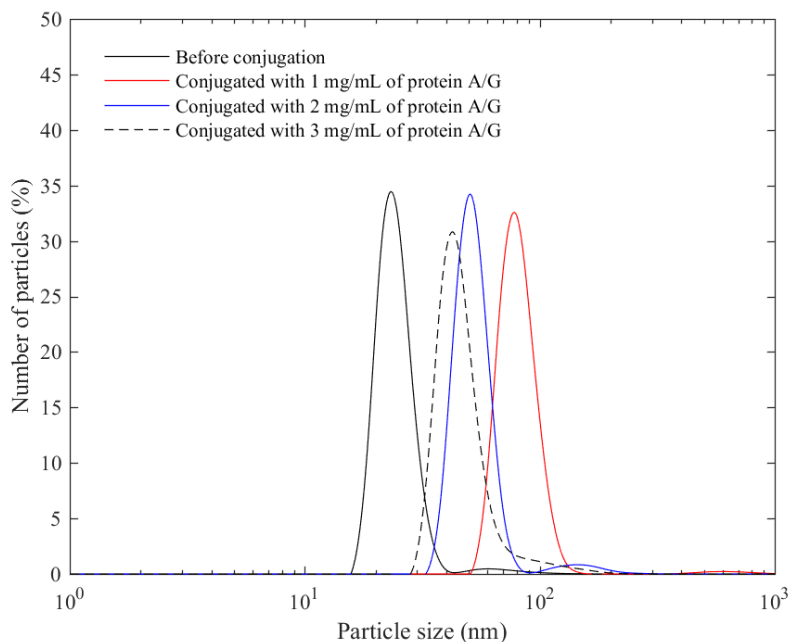
---

### **Optimisation of the immunoassay**

The first step to develop the immunoassay was to optimise the amount of protein used to coat the nanoparticles and the concentration of antibody.

#### ***Protein A/G concentration for nanoparticle conjugation***

Different concentrations of recombinant protein A/G were tested (1, 2, and 3 mg/mL). Dynamic light scattering (DLS) measurements were carried out to confirm the conjugation reaction. This technique allows comparison between nanoparticle hydrodynamic sizes before and after the conjugation reaction. The hydrodynamic diameter of nanoparticles before conjugation was 86.6 nm (PDI 0.2). The  $\zeta$  average of the hydrodynamic sizes was 479.8 nm (PDI 0.4), 193.0 nm (PDI 0.4) and 120.8 nm (PDI 0.3) after conjugation with 1 mg/mL, 2 mg/mL and 3 mg/mL of protein, respectively (Fig.1). The results showed that, for all concentrations of protein A/G, the nanoparticle size increased after the addition of the protein. This demonstrates that the conjugation process through the carbodiimide chemistry was successful. Furthermore, the diameter of the conjugates was larger when concentration of the protein was lower. This could be explained because a protein molecule could bind to several nanoparticles when there were not enough molecules to cover every single nanoparticle; thus, aggregates were formed.



**Fig. 1** Hydrodynamic size distribution profiles of superparamagnetic iron oxide nanoparticles before (solid black line) and after conjugation with concentrations of 1 mg/mL (red), 2 mg/mL (blue) and 3 mg/mL (dashed) of protein A/G

With the aim to select the most suitable protein concentration, the immunoassay without histamine (blank sample) was carried out in the range 1–3 mg/mL and the line tests were analysed by reflectance measurements using reader ESE-Quant LR3 lateral flow system. In all cases, the aggregates were able to flow through the nitrocellulose membrane by capillarity. The results of the measurements of the test line yielded values of 909.99, 845.73 and 639.40 mm·mV for 1 mg/mL, 2 mg/mL and 3 mg/mL of protein, respectively. The reflectance signal increases when the diameter of protein A/G-NP conjugates is larger because in this case, there are more NPs attached to each antibody unit. These agglomerates have a signal amplification effect, proportional to the size of the conjugate. In view of these results, we concluded that 1 mg/mL of recombinant protein A/G produced the largest signal. Therefore, this was the concentration chosen for the next experiments.

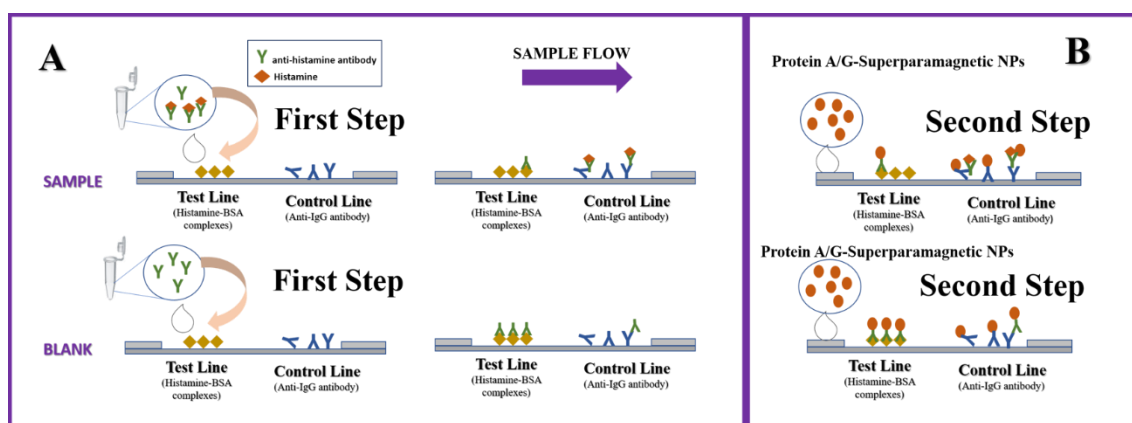
### ***Anti-histamine antibody concentration***

Different concentrations of antibody were assayed in order to optimise the signal. This step was made with gold conjugates and used to estimate the antibody concentration for the competitive assay. The antibody was added during the first step of the immunoassay and therefore, direct binding to the histamine-BSA complex immobilised on the membrane occurs. For the immunoassays, 13, 10, 9 and 5 mg/L of

antibody were used. The reflectance measurements yielded 996.97, 984.62, 862.05 and 431.48 mm•mV, respectively. Finally, 10 mg/L was chosen because, even when the signal increases with the concentration, there were no significant differences between 10 and 13 mg/L.

### Competitive lateral flow immunoassay procedure

The test to quantify histamine is based on a competitive immunoassay; thus, the relationship between the concentration and signals, either magnetic or optical, tends asymptotically to zero. The procedure consists of two steps, as illustrated in Fig. 2. The first step is the competition of the anti-histamine antibodies in solution for the histamine in the sample and the one immobilised at the test line. The second step is the colour developing, based on the retention of the conjugate protein A/G-NP at the test line thanks to the ability of protein A/G to bind to antibodies of any kind. The surplus of protein A/G-NP (not retained at the test line) proceed along the strip and are trapped at the control line by the Fc region of the anti-IgG and anti-histamine antibodies (see Fig. 2).



**Fig. 2** Schematic illustration of the competitive LFIA. a First step: immobilisation of the anti-histamine antibodies. b Second step: colour development

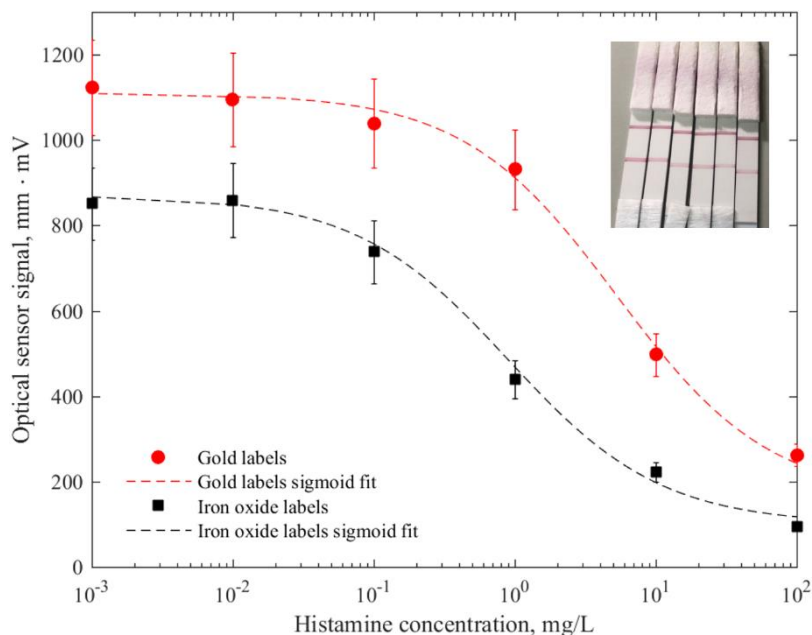
In order to calibrate the strips, several histamine standard solutions were prepared in 10 mM PB and pH 7.4. The competitive LFIA was carried out in dipstick format. For the first step, 10  $\mu$ L of histamine of different concentrations and 2  $\mu$ L of anti-histamine antibody (0.5 mg/mL) were transferred into a microtube from a stock solution to get a final concentration of the anti-histamine antibody of 10 mg/L. Then buffer was added, always keeping a final volume of 100  $\mu$ L (98  $\mu$ L of buffer for the blank and 88  $\mu$ L of buffer for the samples). The optimised running buffer had 1% BSA. The sample pad was introduced into the mixture and the solution flowed along the strip by capillary action. After 30 min, 10  $\mu$ L of NPs coated with protein A/G and 90  $\mu$ L of running buffer were added to the microtube for the developing step.

## **Histamine standards calibration**

To calibrate the strips, several histamine standard solutions were prepared by dilution and assayed following the procedure previously described. In a first run, the experiments were conducted in a wide range of histamine concentrations. The protein concentration in the functionalisation protocol was 1.5 and 2 mg/mL for gold and magnetic nanoparticles respectively. Figure 3 shows the calibration curves in the immunoassays using gold (red) and iron oxide (black) NPs as labels. Six standard samples with histamine concentrations in the range from  $10^{-3}$  to  $10^2$  mg/L, besides a negative reference sample, were run by triplicate and measured with the optical reader. The results yield sigmoid-shape profiles, characteristic of competitive immunoassays. For very low concentrations, the curve has an asymptotic behaviour as a result of the total occupancy of the immobilised histamine-BSA complexes by anti-histamine antibodies. The measured points have been fitted in Fig. 3 (dotted lines) using the four-parameter logistic equation:

$$S = \frac{\alpha - \delta}{1 + (C/\gamma)^\beta} + \delta \quad (1)$$

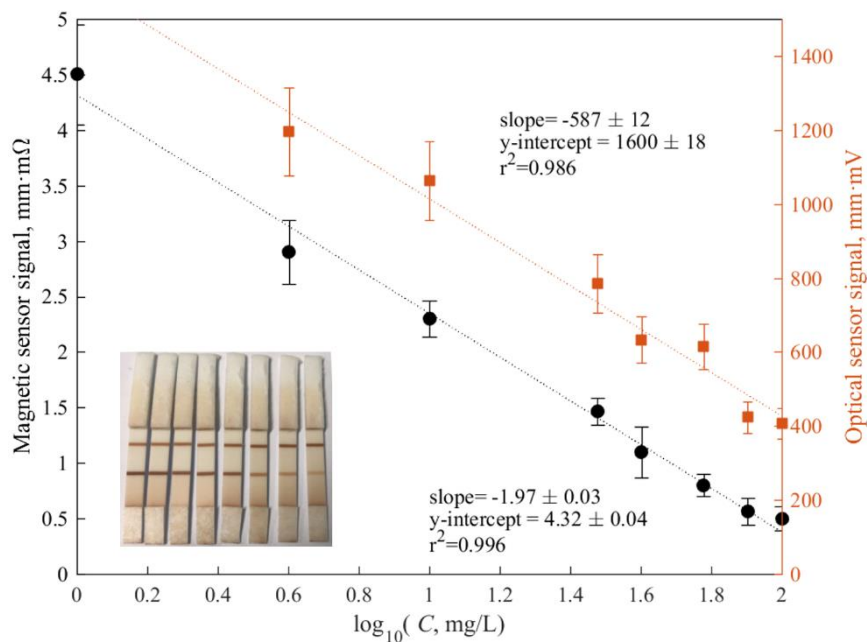
Where S and C are the sensor measurement and the histamine concentration,  $\alpha$  and  $\delta$  are the S-values of the upper and lower asymptote, respectively,  $\beta$  is the slope at the inflexion point, and  $\gamma$  is the value of C corresponding to 50% of the maximum asymptote [35]. The parameter values used for the fits of Fig. 3 were respectively  $\alpha = 1110$  mm•mV,  $\beta = 0.8$ ,  $\gamma = 5.3$  mg/L, and  $\delta = 160$  mm•mV (red line) and  $\alpha = 1130$  mm•mV,  $\beta = 0.8$ ,  $\gamma = 4.5$  mg/L, and  $\delta = 190$  mm•mV (black line). This first analysis leads to the conclusion that quantification is feasible in the range of 1–100 mg/L for the gold nanoparticles and 0.1–100 mg/L for the iron oxide superparamagnetic particles. Besides their wider working range, iron oxide NPs have the advantage of enabling the magnetic pre-concentration of the analyte. Although this procedure has not been yet tested in histamine immunoassays, it has been commonly used for pre-concentration of analytes associated to different bioanalytical techniques [36]. This allows bringing the samples with lower concentrations into the working range by a simple magnetic pre-treatment.



**Fig. 3** Quantification of LFIs by the optical reader using gold (red) and iron oxide (black) NPs. The lines plotted to guide the eye are four parameter sigmoid curves. Inset: One of the series of standard samples used to obtain the red curve, with the control line on top and the test line below.

Figure 4 shows a detailed calibration with magnetic NPs in the range 1–100 mg/L. For this, the A/G protein concentration for functionalisation was optimised according to the DLS results. Optical and inductive readers have been used, the latter yielding better correlation factor. Dotted lines represent the least-squares linear fit of the data; slopes, y-intercepts and correlation factors are also shown on the graph. The limits of detection (LOD) have been calculated following ref. [37] from the blank-subtracted results and give values of 1.2 mg/L and 1.5 mg/L for the inductive and optical methods, respectively.





**Fig. 4** Inductive (left axis) and optical (right axis) signals of the magnetic LFIA as a function of the concentration of histamine. Least-squares linear regression curves are plotted as dotted lines. Inset: One of the series of standard samples used to obtain the plotted lines. The control line is on top and the test line below.

### Application to wine samples

The analytical method was tested against five samples of red wine taken at different stages of the fabrication. The only pre-treatment was a simple filtering through a 0.45- $\mu\text{m}$  PVDF filter. All the assays were performed in triplicate. The strips were measured with the inductive reader once dried, to get a quantitative reproducible reading.

Initial tests were done with both types of particles, iron oxide and the traditional colloidal gold. For comparison, Fig. 5 shows an image of both types of strips after running a sample of red wine. Even a naked eye inspection allows concluding that red wine stains the white paper. This is especially remarkable in the case of gold labels which seem not to flow as well as magnetite. In such case, a quantitative determination by optical measurements becomes impossible or is very poor. For this reason, together with the better results yielded by the calibration, the combination of iron oxide NPs and inductive sensor was chosen to perform the histamine quantification. The results are summarised in Table 1.



**Fig. 5** LFIAs run with red wine samples using (A) superparamagnetic nanoparticles and (B) colloidal gold as reporters

**Table 1** Results obtained by magnetic LFIA coupled to the inductive sensor and UHPLC for the red wine samples analysed in this work

Wine	Stage of fabrication	LFIA & inductive sensor mg/L mM		LFIA & optical sensor mg/L mM		UHPLC mg/L mM	
<b>A</b>	End of the alcoholic fermentation	46 ± 2	0.41 ± 0.02	25 ± 3	0.22 ± 0.03	44 ± 3	0.39 ± 0.03
<b>B</b>	Freshly bottled	82 ± 4	0.74 ± 0.04	56 ± 14	0.50 ± 0.13	83 ± 3	0.74 ± 0.03
<b>C</b>	Reserve wine	25 ± 3	0.22 ± 0.03	10 ± 1	0.09 ± 0.01	20 ± 3	0.18 ± 0.03
<b>D</b>	End of the malolactic fermentation	63 ± 4	0.57 ± 0.04	37 ± 7	0.33 ± 0.06	46 ± 3	0.42 ± 0.03
<b>E</b>	End of the malolactic fermentation	65 ± 5	0.58 ± 0.05	101 ± 18	0.90 ± 0.16	55 ± 3	0.49 ± 0.03

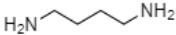

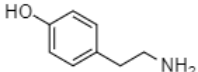
To validate the results, wines were also analysed by UHPLC and the results of histamine content are compared in Table 1. The error in the UHPLC measurements comes from the injection volume, which has been considered the only significant source of error. In the case of the LFIA, several error sources were identified that influence the inductive signal value: the printing of the antibody across the membrane (which may have small inhomogeneities in the line width), the guillotine cut of the strip from the

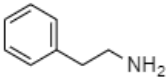
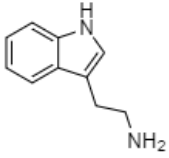
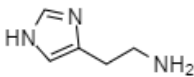
membrane original card (this produces variability in the width of the strips), and the sensor resolution. Considering that the errors produced are probabilistically independent, we can use the rule of error propagation to add up the relative errors. For this calculation, three strips have been run with each wine and each of them has been measured four times. The resulting uncertainty of the sensor signals for the different wines is in the range 2–18% for the optical measurement and 2–5% for the inductive sensor. The uncertainties of the concentrations shown in Table 1 have been obtained by the propagation rule applied to the calibration curve considering the errors of the slope and y-intercept given in Fig. 4.

The LFIA values of the histamine content measured with the commercial optical reader are deficient. Moreover, the relative uncertainties are unacceptable due mainly to a considerable variability in the three strips of each wine. The problem is associated to the variability in colour intensity of the three strips of each wine more than a lack of sensitivity of the reader itself. For this method to be useful for quantification, the removal of the interfering matrix would be necessary. In contrast, the LFIA histamine levels given by the inductive reader are remarkably similar to the reference, taking into account the margins of error. Only wines D and E fall out of these ranges, the average LFIA value being overestimated in about a 30%.

To investigate the possible origin of this deviation, several BAs have been quantified by UHPLC in the wines under study, namely, histamine, putrescine, cadaverine, tyramine, phenylethylamine, and tryptamine (see Table 2).

**Table 2** Concentrations of biogenic amines by UHPLC. All the samples are red wine at different steps of the fabrication

Biogenic amines	Structure	Wine A (mM)	Wine B (mM)	Wine C (mM)	Wine D (mM)	Wine E (mM)
Putrescine		1.717	1.842	0.754	1.417	1.769
Cadaverine		0.025	0.050	0.049	0.063	0.060
Tyramine		0.108	0.375	0	0.406	0.623

Phenylethylamine		0.072	0.418	0.452	0.112	0.350
Tryptamine		0	0	0	0	0
Histamine		0.39	0.742	0.175	0.416	0.494

Of all the amines analysed, tyramine has a similar structure to histamine and reaches higher values in wines D and E, so it is likely to be producing a cross-reaction effect. In order to test this hypothesis, we have run the test with standard solutions of histamine (H) and tyramine (T). In one case, we have used 2.5 µg of histamine while in the other we have also added 6.5 µg of tyramine. This leads to tests with 0.22 and 0.69 mM concentration of BAs. These tests were performed with iron oxide NPs as labels and evaluated with the inductive sensor. The results are shown in Table 3 together with the “apparent histamine amount,” that is obtained applying the calibration parameters given in Fig. 4. It can be concluded that the presence of tyramine interferes at the test, which displays lower magnetic signals and give rise to a value of histamine 27% larger than the nominal one. Another parameter that can be affecting these results is the different flowing velocity of the samples due to the matrix composition and viscosity. Although further research is needed to improve the reliability of the test, the results of LFIA are a proof of the capability of the system not only to detect, but also to quantify histamine in red wine in the range of interest for wineries and sensitive consumers.

**Table 3** Cross-reactivity study. The letters H and T stand for histamine and tyramine, respectively

BAs	Concentration of BAs (mM)	Signal by inductive measurements (mm·mV)	Apparent concentration of histamine (mg/ L) / (mM)
H	0.22	1.5	26 / 0.23
H +T	0.69	1.3	33 / 0.28

## **Conclusions**

---

A biosensor for histamine quantification in red wines has been developed based on the combination of magnetic competitive lateral flow immunoassay strips and an inductive sensor to perform the reading out. The labels are superparamagnetic iron oxide nanoparticles 10 nm in size with a double lipidic layer as coating that enables their functionalisation. The magnetic perturbation of the NPs is detected by the inductive sensor as an increase of its impedance proportional to the number of NPs in the test line, which is in turn proportional to the number of anti-histamine antibodies. The system has been calibrated with histamine standard solutions. To validate the new method, the competitive immunoassay has been done also with traditional gold NPs and evaluated, both with gold and magnetite, with a commercial reflectance reader. The combination of magnetic particles and inductive reader gave the best calibration correlation factor and LOD, besides the well-known magnetic pre-concentration potential.

Finally, the system was tested for reliability and validity with five real red wine samples corresponding to different stages during vinification and the final consumption state. In this case, the magnetic particles proved a new advantage compared with colloidal gold, which has a better flow of the wine sample along the paper resulting in a cleaner strip. In addition, the magnetic inductive signal does not depend on the dyeing of the paper, which is a complication for gold labels whose reading relies on an optical signal.

The measurements were cross-checked by UHPLC, leading to the finding that in two of the wine samples they can be overestimated in about 30%, probably due to cross-reactivity with tyramine. Despite this, the conclusion is that the analytical method based on magnetic LFIA is very promising for point-of-use determination of histamine. Keeping the advantages of simplicity, rapidity and low cost of traditional LFIA, the magnetic character of the labels and their detection principle provide additional advantages like the avoidance of sample pre-treatment for matrix removal, possibility of magnetic pre-concentration for low-concentration samples, and improved calibration and LOD.

## **Acknowledgements**

---

Wine samples were kindly provided by Juan M. Redondo from DOP Vino de Cangas. The authors acknowledge the technical assistance of Begoña Redruello (IPLA) in the chromatographic analysis in wine samples.

## **Funding information**

---

This work was financially supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under projects MAT2017-84959-C2-1-R, MAT2016-81955-REDT, and AGL2016-78708-R; the Council of Gijón-IUTA under grant SV-18-GIJON-1-27; and the Principality of Asturias under project IDI/2018/000185.

## **Conflict of interest**

---

The authors declare that they have no conflict of interest.

## **References**

---

1. Ordóñez JL, Troncoso AM, García-Parrilla MDC, Callejón RM. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – a review. *Anal Chim Acta*. 2016;939:10–25.
2. Daniel ML, MaCruz M, Victor L, Miguel AA, María F. Biogenic amines in dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 51(7):691–703.
3. Ladero V, Calles-Enriquez M, Fernandez M, Alvarez MA. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr Nutr Food Sci*. 2010;6(2):145–56.
4. Bodmer S, Imark C, Kneubühl M. Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflamm Res*. 1999;48(6):296–300.
5. FDA. Fish and fishery products hazards and controls guidance, Fourth Edition, Chapter 7. April 2011;113.
6. EU Directive, Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007. *Official Journal of European Union* 2007.
7. Bauza T, Blaise A, Daumas F, Cabanis JC. Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *J Chromatogr A*. 1995;707(2):373–9.
8. Landete JM, Ferrer S, Polo L, Pardo I. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J Agric Food Chem*. 2005;53(4):1119–24.
9. Konakovsky V, Focke M, Hoffmann-Sommergruber K, Schmid R, Scheiner O, Moser P, et al. Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines. *Food Addit Contam A*. 2011;28(4):408–16.
10. Caruso M, Fiore C, Contursi M, Salzano G, Paparella A, Romano P. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World J Microbiol Biotechnol*. 2002;18(2):159–63.

11. Goñi DT, Azpilicueta CA. Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines: relationship with the utilization of amino acids during fermentation. *Am J Enol Viticult.* 2001;52(3):185–90.
12. Lonvaud-Funel A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;199(1):9–13.
13. Landete JM, Ferrer S, Pardo I. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *J Appl Microbiol.* 2005;99(3):580–6.
14. Hernández-Orte P, Lapeña AC, Peña-Gallego A, Astrain J, Baron C, Pardo I, et al. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: factors affecting formation. *Food Res Int.* 2008;41(7):697–706.
15. Peña-Gallego A, Hernández-Orte P, Cacho J, Ferreira V. Highperformance liquid chromatography analysis of amines in must and wine: a review. *Food Rev Int.* 2012;28(1):71–96.
16. García-Villar N, Hernández-Cassou S, Saurina J. Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and highperformance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2009;1216(36):6387–93.
17. Cunha SC, Faria MA, Fernandes JO. Gas chromatography–mass spectrometry assessment of amines in port wine and grape juice after fast chloroformate extraction/derivatization. *J Agric Food Chem.* 2011;59(16):8742–53.
18. Daniel D, Santos V, Tadeu Rajh Vidal D, do Lago C. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2015;1416.
19. Kivirand K, Rincken T. Biosensors for biogenic amines: the present state of art mini-review. *Anal Lett.* 2011;44(17):2821–33.
20. Basozabal I, Guerreiro A, Gomez-Caballero A, Aranzazu Goicolea M, Barrio RJ. Direct potentiometric quantification of histamine using solid-phase imprinted nanoparticles as recognition elements. *Biosens Bioelectron.* 2014;58:138–44.
21. Henao-Escobar W, del Torno-de Román L, Domínguez-Renedo O, Alonso-Lomillo MA, Arcos-Martínez MJ. Dual enzymatic biosensor for simultaneous amperometric determination of histamine and putrescine. *Food Chem.* 2016;190:818–23.
22. Marcobal A, Polo MC, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV. Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Res Int.* 2005;38(4):387–94.
23. Hernández-Cassou S, Saurina J. Determination of histamine in wine samples by flow-injection analysis and multivariate calibration. *Anal Lett.* 2013;46(11):1758–68.
24. Surya T, Sivaraman B, Alamelu V, Priyatharshini A, Arisekar U, Sundhar S. Rapid methods for histamine detection in fishery products. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2019;8.

25. Mak WC, Beni V, Turner APF. Lateral-flow technology: from visual to instrumental. *TrAC-Trends Anal Chem.* 2016;79:297–305.
26. Wang D-B, Tian B, Zhang Z-P, Deng J-Y, Cui Z-Q, Yang R-F, et al. Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using a super paramagnetic lateral-flow immunological detection system. *Biosens Bioelectron.* 2013;42:661–7.
27. Wang D-B, Tian B, Zhang Z-P, Wang X-Y, Fleming J, Bi L-J, et al. Detection of *Bacillus anthracis* spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on “road closure”. *Biosens Bioelectron.* 2015;67:608–14.
28. Wang Y, Xu H, Wei M, Gu H, Xu Q, Zhu W. Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2009;29(3):714–8.
29. Zheng C, Wang X, Lu Y, Liu Y. Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control.* 2012;26(2):446–52.
30. Lago-Cachón D, Rivas M, Martínez-García JC, García JA. Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles. *Nanotechnology.* 2013;24(24):245501.
31. Rivas M, Lago-Cachón D, Martínez-García JC, García JA, Calleja AJ. Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits. *Sensors Actuators A Phys.* 2014;216:123–7.
32. Lago-Cachón D, Oliveira-Rodríguez M, Rivas M, Blanco-López MC, Martínez-García JC, Moyano A, et al. Scanning magneto inductive sensor for quantitative assay of prostate-specific antigen. *IEEE Magn Lett.* 2017;8:1–5.
33. Bica D, Vékás L, Avdeev MV, Marinică O, Socoliuc V, Bălăsoiu M, et al. Sterically stabilized water based magnetic fluids: synthesis, structure and properties. *J Magn Magn Mater.* 2007;311(1):17–21.
34. Redruello B, Ladero V, del Rio B, Fernández M, Martín M, Alvarez M. A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. *Food Chem.* 2016;217:117–24.
35. Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin Chem.* 1974;20(10):1255.
36. Aguilar-Arteaga K, Rodriguez JA, Barrado E. Magnetic solids in analytical chemistry: a review. *Anal Chim Acta.* 2010;674(2):157–65.
37. Hayashi Y, Matsuda R, Maitani T, Imai K, Nishimura W, Ito K, et al. Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA. *Anal Chem.* 2004;76(5):1295–301.





## CAPÍTULO B.4: OTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN INICIADAS

---

### **B.4.1 Introducción y motivación**

En este capítulo se presentan otras líneas de investigación iniciadas que pretenden solventar limitaciones encontradas durante el desarrollo de la tesis. Este capítulo se divide en tres partes:

En la primera parte se presentan resultados preliminares del desarrollo de una plataforma electroquímica para la caracterización y cuantificación de nanovesículas. Uno de los cuellos de botella a los que se tiene que enfrentar la comunidad científica cuando trabaja con vesículas extracelulares es la falta de técnicas estandarizadas para su caracterización. Además, las técnicas existentes, entre las que destacan NTA, TRPS y AF4, requieren equipos sofisticados. Por lo tanto, como alternativa a estas, proponemos el desarrollo de un dispositivo POCT para este fin basado en una plataforma electroquímica. Esta parte será descrita como un borrador tipo artículo científico.

La segunda parte describe una estrategia basada en MNPs para mejorar la sensibilidad óptica de los LFIA. Se trata del efecto peroxidasa que muestran este tipo de partículas.

La tercera parte incluye la encapsulación en liposomas de MNPs para lograr una mejora de la sensibilidad de la señal magnética.

Las dos últimas partes tratan de buscar solución a uno de los problemas que plantea el uso LFIA, la falta de sensibilidad. Como han demostrado los resultados obtenidos a lo largo de esta memoria, el uso de MNPs como marca en LFIA puede dotar al sistema de una capacidad cuantitativa, solventando la otra limitación de esta plataforma de detección. Por lo tanto, con estos resultados preliminares se quiere demostrar la posibilidad de mejorar tanto la señal óptica como magnética de los MLFIA. Tanto en la segunda parte como la tercera se muestran resultados preliminares de las dos estrategias de amplificación desarrolladas.



## **B.4.2: Desarrollo de una plataforma electroquímica para la caracterización y cuantificación de EVs**

### **Unpublished results**

---

#### **Development of an electrochemical platform for extracellular vesicles characterization/quantification**

##### **1. Introduction**

Extracellular (EVs) vesicles are a class of membranous particles, ranging in size from 30 nm to 1  $\mu\text{m}$ , which play a key role in intercellular communication. They have the capacity to transfer mRNA, miRNA and protein from their cell of origin [1]. Moreover, they are involved in a wide variety of cellular functions such as cellular migration, and invasion and immunity [2]. They can be isolated from many biological fluids including urine, blood, and saliva, thereby providing potential non-invasive sources for the presence of a variety of diseases. In recent years, scientific interest in EVs has greatly increased due to their diagnostic and therapeutic potential due to their protein and genetic content [3].

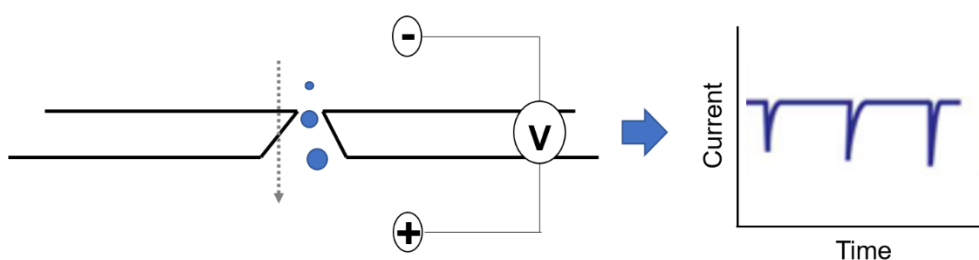
EVs isolation and characterization processes are crucial steps for their subsequent use in therapy and diagnostics [4]. The bottleneck at EVs research that is limiting the industrial and clinical translation is the current isolation and quantification techniques. Characterization is particularly challenging due to the heterogeneous nature and large size range of EVs populations. For quantification, only bench top instruments have been commercialized so far. The most methods commonly used in the literature for this purpose include Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS), Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AF4) and different types of immunoassays [5].

All these previous methods require expensive equipment, central facilities, and trained personnel. Actual trends in clinical analysis demand the development of portable, low cost and user-friendly devices. With this aim, our group has developed a lateral flow immunoassay (LFIA) for EVs that could be used at cell cultures, and complex body fluids such as plasma. We have demonstrated too that it can be used to monitor a particular disease (e.g. melanoma), by replacing one of the tetraspanin antibodies with the specific ligand, and it can be adapted to multiple marker detection. Quantification was carried out through optical density measurements on a bench top

strip reader. This test has also enabled a pilot study in individuals with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis (CFS/ME). We found that the amount of EVs-enriched fraction was significantly higher in CFS/ME subjects than in healthy controls ( $p= 0.007$ ) and that EVs were significantly smaller in CFS/ME patients ( $p= 0.014$ ), indicating that that blood-derived EVs may distinguish CFS/ME patients from HCs.

Miniaturized microfluidic chips for EVs have been reported, but followed by other types of detection, with fluorophore labels or metal nanoparticles, and electroanalytical probes (enzymes or metal NPs) at batch mode [6,7]. This complicates the instrument design and the number of steps.

In the search for point-of-care devices for EVs quantification, we have started the development of an electrochemical sensor based on a principle inspired on the Tuneable Resistive Pulse Sensing (tRPS). This has been established as technique for reliable quantification and size profiling of EVs [8]. The device is based on a non-conductive submicron-sized pore membrane which separate two fluid chambers. One of chambers contains the sample to be analysed and another one an electrolyte solution. A current of charged ions though the nanopore is caused when a voltage is applied between two chambers (Figure 1). The nanoparticles pass through the membrane pores causing a blockade which leads a disruption in the base line of electrical current. The magnitude of this current blockade is proportional to the volume of the particles moving through the pore, and the blockade rate is directly related to the particle concentration. Moreover, the blockade duration can be used to assess the zeta-potential. The movement of particles through the nanopore is determined by several independent forces, being electrokinetic (electrophoretic and electro-osmotic) and fluidic forces.



**Figure 1.** Scheme of tRPS principle.

The detection size range can be tunable by changing the pore size [9]. Theoretically, the maximum measurable particle size would be equal to the pore size. Particles larger than pore size would cause pore clogging, which may alter the dimensions of the pore [10]. For this reason, the pore size needs to be adapted to each sample. The qNano instrument is the only commercial tRPS platform [11]. Membranes with different pore size are available for qNano instrument (NP100, NP200 and NP400) [10].

One of the advantages of this platform is the small volume required (40  $\mu\text{L}$ ). Other advantages over other technologies are its limited dependence on instrument setting and their capacity to determine simultaneously the concentration, size, and zeta-potential of particles, including extracellular vesicles [9]. However, tRPS is not able to discriminate between different types of nanoparticles, and it is still a bench top instrument.

As is well known, Electrochemical biosensors have a great interest due to their low-cost, easy miniaturisation and portability, their rapid respond, and simplicity. Moreover, they can offer good analytical features such as low detection limits, a wide linear response range, and good stability and reproducibility. Furthermore, they can be combined with membranes for biomedical applications, being nitrocellulose and polycarbonate usual materials [12]. Electrochemical techniques for mass transport through porous membrane are well established [13], and membrane have been long used to restrict sensing surface access by particles. Taking into account these advantages, we have used as starting for the EVs electrochemical sensor design a porous membrane coupled to the working electrode.

Our hypothesis is that the principle of tRPS could be adapted to other electrochemical sensing techniques. Since the particle's concentration is determined by blockade of membrane pores, this would cause a decrease in the voltammetric signal of an electrochemical probe. And the magnitude of this signal blockade would be proportional to particle. As for tRPS, membrane pore size for this approach could be tunable, being necessary to adapt it to the samples. However, this platform could have certain advantages over tRPS: small, simple, easy to use and low cost.

For the development of this electrochemical platform, synthetic liposomes have been used as model system [14]. Liposomes are synthetic lipid vesicles which can be designed to have similar properties of extracellular vesicles such as density, size and composition [15]. Thus, they have been used to simulate extracellular vesicles size in order to develop the electrochemical tool. Moreover, once the system is developed, liposomes could be used as standards for calibration. These are "soft" nanoparticles, with a membrane made of double layer of phospholipids. Their chemical composition and reactivity are similar to that of biological vesicles. They could be even modified at the surface with artificial tetraspanin loops, as synthetic exosomes [16]. Moreover, it is relatively easy to synthesize then from low cost reagents, with good control of these size and homogeneity through botton up routes [17].

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Chemicals and instruments**

The platinum wire counter electrode and Ag/AgCl reference electrode were purchased from CH Instruments, Inc. Ferrocenemethanol and phosphate buffered saline tablets were obtained from Sigma-Aldrich. Hydrophilic polycarbonate membranes with different pore sizes were provided by Millipore.

To synthesize the liposomes and niosomes, the following chemical were used: Phosphatidylcholine (PC) (predominant species C<sub>42</sub>H<sub>80</sub>NO<sub>8</sub>P, MW = 775.04 g/mol) from soybean (Phospholipon 90G) was a kind gift from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Sorbitan monostearate (Span 60, S60) (C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>, MW = 430.62 g/mol) and cholesterol (Cho) (C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O, MW = 386.65 g/mol) were purchased from Sigma-Aldrich. All membrane components were dissolved in absolute ethanol (Sigma-Aldrich).

### 2.2 Working electrode manufacture and assembly

In order to manufacture the working electrodes, firstly, polymethylmethacrylate (PMMA) material were ablated, using a Zing laser (Epilog Láser), into rectangular shape with 3 cm x 1.5 cm dimensions. Then, the gold electrode was deposited on this PMMA material by sputtering. The gold layer has a dimensions of 2.5 cm x 2 mm. To define this shape, a removable mask was used. The time employed for the sputtering was 90 seconds to guarantee the conductivity on the working electrode. Then, an intermediate layer of pressure sensitive adhesive (PSA) with a square hole of 4 mm x 4mm was stuck on the PMMA layer. The porous membrane with also 4 mm x 4 mm dimensions was placed into the hole. There is a direct contact between the membrane and the gold electrode. Finally, other PSA layer was stuck also with a square hole in order to delimit the working area to 2 mm x 2 mm. The PSA layers were cut using Graphtec cutting plotter CE6000-40. Figure 2 shows a schematic representation of working electrode design.

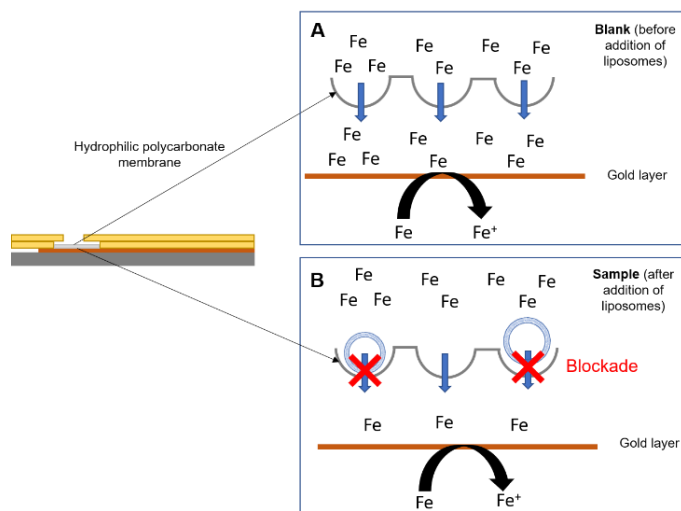


**Figure 2.** Schematic representation of different layers employed to manufacture the working electrode.

### 2.3 Voltammetric measurements and analytical signal

The working electrode preparation described before was used in a voltammetric sensor for liposomes. The electrochemical cell consisted of three electrodes: reference, counter and working electrodes. The working electrode contain a porous membrane, available in different pore size. This porous membrane allows ferrocenemethanol (redox

probe) to diffuse through the pores being reversibly oxidized on the gold surface (Figure 3A). The corresponding reduction current, directly proportional to ferrocenemethanol, could be used as analytical signal. When liposomes are deposited on the membrane, the pores are blocked preventing ferrocenemethanol through membrane causing a current reduction (Figure 3B). This blockade should be proportional to the concentration of liposomes.



**Figure 3.** (A) Principle of measurement when there are not nanovesicles on the membrane. (B) Blockade principle caused by nanovesicles on the membrane.

## 2.4 Artificial nanovesicles synthesis

Nanovesicles (liposomes and niosomes) were synthesized by ethanol injection to be used as model system. The difference between both types of nanoparticles is their membrane composition: phospholipids for liposomes and surfactants for niosomes. Their size can be tuned controlling several parameters, such as their formulation or sonication step, during their synthesis. The bottom up method for their synthesis with size tuning control developed in our research group has been described in [17].

Briefly, for liposome preparation, 40 mg of PC were dissolved in 5 ml of absolute ethanol. Then, the organic solution was injected, with a syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA) at a flow rate of 120 mL/h, into 50 ml of Milli-Q water that was kept at 60 °C and stirred at 500 rpm. After nanovesicles formation, ethanol phase was removed at 40 °C under reduced pressure (90 kPa) in a rotary evaporator. Finally, liposomes were sonicated for 15 min (CY-500 sonicator, Opticlymen System, Biotech SL, Barcelona, Spain), using an amplitude of 30%, a power of 500 W, and a frequency of 20 kHz. The sonication probe was placed in a 100 mL glass beaker at a constant depth, 1.5 cm above the container bottom.



The same protocol was applied to niosomes synthesis with slight modifications, since in those cases Span 60 and cholesterol were used instead of PC. For one size of niosomes, 43.42 mg of S60 and 21.71 mg of Cho were dissolved in 12.5 ml of absolute ethanol. The following steps were similar to liposomes synthesis, but for this case the niosomes were sonicated with an amplitude of 42.5 %. For the other size of niosomes, 26.64 mg of S60 and 13.32 mg of Cho were dissolved in 20 ml of absolute ethanol. For this synthesis, the amplitude used was of 30%.

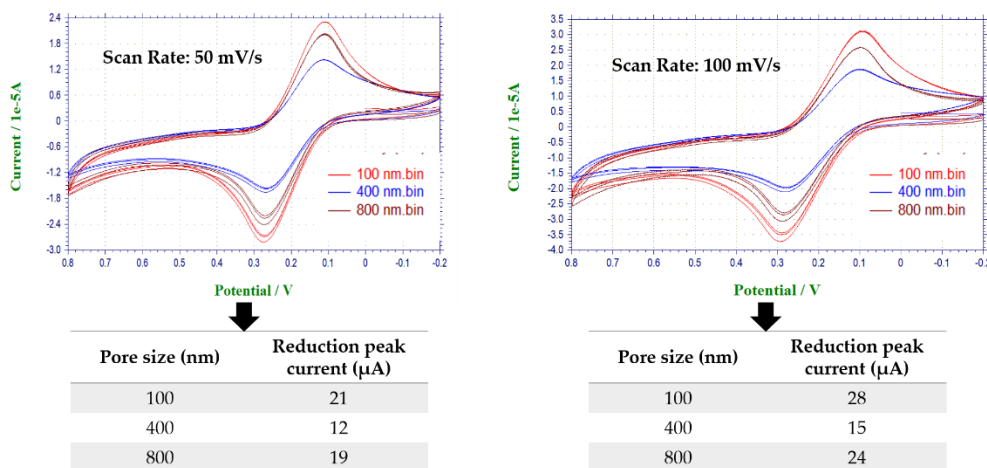
Finally, the hydrodynamic size characterization was carried out by dynamic light scattering (DLS). Size distribution was assayed with a Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a solid-state He–Ne laser ( $\lambda=633$ ). A total of three readings were carried out at 25 °C. Each reading was composed of 15 measurements of the backscattered ( $173^\circ$ ) intensity. Zetasizer software version 7.03 was used for data processing and analysis. The hydrodynamic size was measured in order to follow and control the preparation process of nanovesicles making a measurement after each step (injection, evaporation and sonication).

### **3. Results and discussion**

#### **3.1 Characterization of working electrode by cyclic voltammetry**

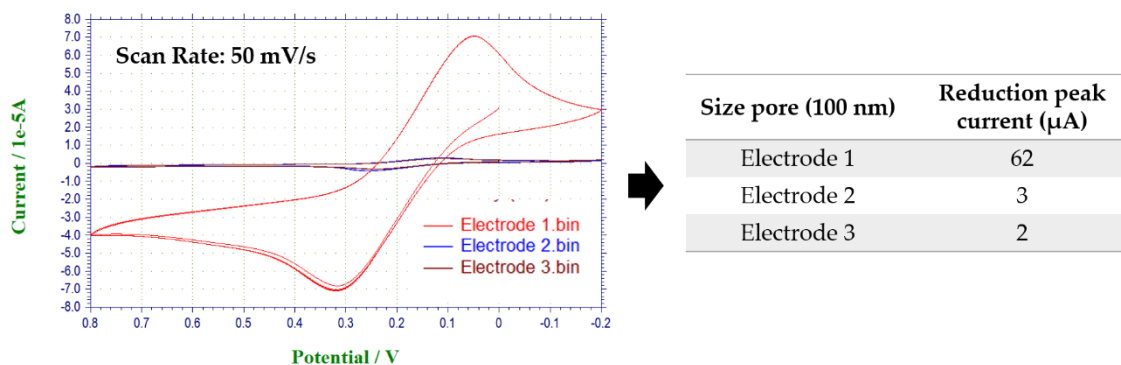
As was explained previously, the pore size of the membrane placed on the gold electrode can be tuneable depending on the sample size range. Membrane of polycarbonate with different size (100, 400 and 800 nm) have been used to prepare the working electrode following the protocol explained in section 2.2.

In order to demonstrate that the working electrode can be used to measure the oxidation and reduction of ferrocenemethanol electrochemically by cyclic voltammetry (CV), three electrodes with different pore size have been manufactured. Then, the cyclic voltammetry has been measured for the different electrodes at different scan rate (50 and 100 mV/s). A potential sweep between 0 and 0.8 V was applied, being -0,2 V the lowest potential. The concentration of ferrocenemethanol used was 1 mM. Figure 4 shows the cyclic voltammograms for three working electrodes which contain membranes with different pore size (100, 400 and 800nm). The results indicate that there are not significant differences in the cathodic peak currents when the pore size varies.



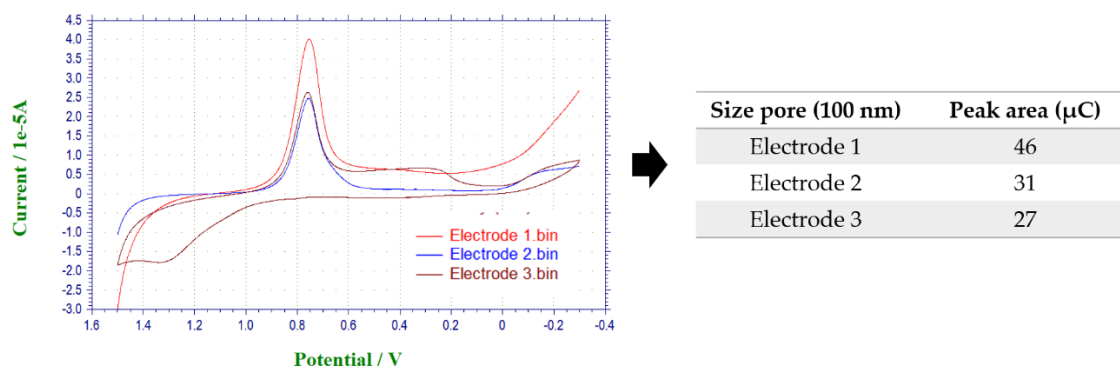
**Figure 4.** Cyclic voltammograms of an aqueous solution containing ferrocenemethanol (1 mM) on different gold working electrodes with different pore membrane size at different scan rate (50 and 100 mV/s).

To evaluate the reproducibility and apply the system to the nanovesicle samples, the 100 nm membrane were selected. Three electrodes were manufactured to compare their reduction peak currents. The selected scan rate was 50 mV/s for all cases. Figure 5 shows the cyclic voltammograms with their corresponding reduction peak current exhibiting significant differences between them. This could be due to differences in the electrode areas, due to the hand-made preparation. Moreover, the membranes were cut manually using a conventional cutter to obtain the desired dimension. This cut could cause damages at different parts of the membranes.



**Figure 5.** Cyclic voltammograms of an aqueous solution containing ferrocenemethanol (1 mM) on three gold working electrodes with 100 nm pore membrane size at 50 mV/s scan rate.

In view of these results, the area for each working electrode were measured by cyclic voltammetry with sulfuric acid. The potential sweep applied was from 0 to 1.5 V, being  $-0.2$  the lowest potential. The concentration of sulfuric acid used was 10 mM. Figure 6 shows cyclic voltammograms exhibiting significant differences which are in correspondence with the reduction peak current analysed previously.



**Figure 6.** Cyclic voltammograms of an aqueous solution containing sulfuric acid (10 mM) on three gold working electrodes with 100 nm pore membrane size at 50 mV/s scan rate. Peak areas were calculated by Randles–Sevcik equation.

### 3.2 Characterization of nanovesicles by dynamic light scattering

Nanovesicles with different sizes were prepared by ethanol injection in order to analyse their size effect to block the membrane pore on the working electrode. During the synthesis, their hydrodynamic sizes were measured at different points (after injection, evaporation, and sonication), since it has been reported that their sizes change slightly after these points during their preparation.

**Table 1.** Hydrodynamic sizes obtained from characterization of nanovesicles by DLS.

Type of nanovesicles	Hydrodynamic size after injection	Hydrodynamic size after evaporation	Hydrodynamic size after sonication
Liposomes	141 $\pm$ 4	89 $\pm$ 1	77 $\pm$ 1
Niosomes 1	288 $\pm$ 5	170 $\pm$ 1	146 $\pm$ 5
Niosomes 2	368 $\pm$ 18	260 $\pm$ 3	250 $\pm$ 3

Table 1 shows that it is possible to control the nanovesicle sizes varying some parameters such as ratio of reagents and phases (organic and aqueous), and sonication amplitude.

### 3.3 Correlation between signal reduction and nanovesicles sizes

To study the effect of blockade depending on nanovesicles size, the same amount of nanovesicles with different sizes (77, 146 and 250 nm) have been deposited on the 100 nm membrane and incubated at 37 °C for one hour. Then, the membrane was washed with ultrapure water and measured by CV. Also, CV was measured before deposition to compare both reduction peak current. Figure 7 shows the result obtained using the different size of nanovesicles. The potential sweep applied was from 0 to 0.8 V, being  $-0.2$  the lowest potential. The concentrations of ferrocenemethanol used were 1 mM (blue bar in Figure 7) and 2 mM (orange bar in Figure 7). The analytical signal used

was the difference of peak currents before and after the blockade. The best blockade was obtained when 146 nm niosomes was used and 2 mM of concentration of ferrocenemethanol. For these reasons, these conditions were chosen to carry out the next experiments.

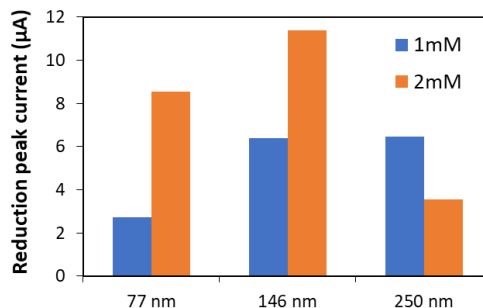


Figure 7. Reduction of peak current after blockade using different nanovesicles sizes (77, 146 and 250 nm) by CV.

### 3.4 Correlation between signal reduction and nanovesicles concentration

In order to study the possible correlation between the niosomes concentration and reduction of peak current, several concentrations of niosomes have been incubated as previously explained. The 146 nm niosomes have been selected because they provide the highest blockade for 100 nm pore membrane. The CV have been recorded using the same conditions indicated before. Figure 8 shows that as the concentration of niosomes increased, the analytical signal decreased. This can be considered proof of concept for further studies.

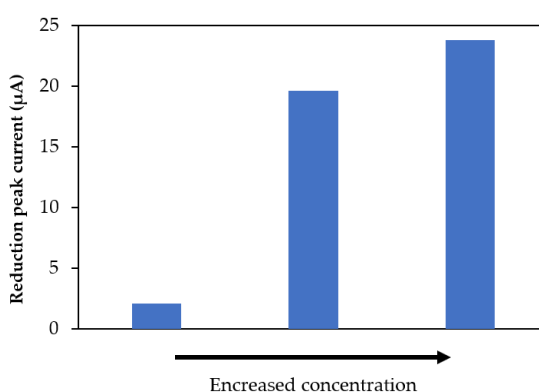


Figure 8. Reduction of peak current after blockade using different 146 nm nanovesicles concentrations by CV.

## 4. Conclusions

As a proof of concept, we have designed a voltammetric sensor for extracellular vesicles quantification. The electrochemical cell could be considered as microarray system based on polycarbonate membranes on gold working electrodes. It has been found a correlation between current reduction of a redox probe and the increase of nanoparticles concentration. However, an optimization of reproducibility of membrane and working electrode as well as cell design is needed in order to improve the sensor.

### **References**

- [1] G. Raposo, W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends, *J. Cell Biol.* 200 (2013) 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.
- [2] S.L.N. Maas, X.O. Breakefield, A.M. Weaver, S. Stremersch, S.C. De Smedt, K. Raemdonck, Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles, *J. Control. Release.* 244 (2017) 167–183. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.054>.
- [3] S. Stremersch, S.C. De Smedt, K. Raemdonck, Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles, *J. Control. Release.* 244 (2016) 167–183. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.054>.
- [4] V. Sunkara, H.K. Woo, Y.K. Cho, Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics, *Analyst.* 141 (2016) 371–381. <https://doi.org/10.1039/c5an01775k>.
- [5] E. Serrano-Pertierra, M. Oliveira-Rodríguez, M. Matos, G. Gutiérrez, A. Moyano, M. Salvador, M. Rivas, M.C. Blanco-López, Extracellular vesicles: Current analytical techniques for detection and quantification, *Biomolecules.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/biom10060824>.
- [6] J. Rho, J. Chung, H. Im, M. Liong, H. Shao, C.M. Castro, R. Weissleder, H. Lee, Magnetic nanosensor for detection and profiling of erythrocyte-derived microvesicles, *ACS Nano.* 7 (2013) 11227–11233. <https://doi.org/10.1021/nn405016y>.
- [7] R. Vaidyanathan, M. Naghibosadat, S. Rauf, D. Korbie, L.G. Carrascosa, M.J.A. Shiddiky, M. Trau, Detecting exosomes specifically: A multiplexed device based on alternating current electrohydrodynamic induced nanoshearing, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11125–11132. <https://doi.org/10.1021/ac502082b>.
- [8] Y. Pei, R. Vogel, C. Minelli, Tunable resistive pulse sensing (TRPS), *Charact. Nanoparticles Meas. Process. Nanoparticles.* (2019) 117–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00009-2>.
- [9] R. Vogel, F.A.W. Coumans, R.G. Maltesen, A.N. Böing, K.E. Bonnington, M.L. Broekman, M.F. Broom, E.I. Buzás, G. Christiansen, N. Hajji, S.R. Kristensen, M.J. Kuehn, S.M. Lund, S.L.N. Maas, R. Nieuwland, X. Osteikoetxea, R. Schnoor, B.J. Scicluna, M. Shambrook, J. de Vrij, S.I. Mann, A.F. Hill, S. Pedersen, A standardized method to determine the concentration

of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing, *J. Extracell. Vesicles*. 5 (2016). <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31242>.

[10] F.A.W. Coumans, E. van der Pol, A.N. Böing, N. Hajji, G. Sturk, T.G. van Leeuwen, R. Nieuwland, Reproducible extracellular vesicle size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing, *J. Extracell. Vesicles*. 3 (2014). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.25922>.

[11] S.L.N. Maas, J. De Vrij, M.L.D. Broekman, Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing, *J. Vis. Exp.* (2014) 1–7. <https://doi.org/10.3791/51623>.

[12] R. van den Hurk, S. Evoy, A review of membrane-based biosensors for pathogen detection, *Sensors (Switzerland)*. 15 (2015) 14045–14078. <https://doi.org/10.3390/s150614045>.

[13] I.C. Lopes, A. Zebda, P. Vadgama, New directions in membrane designs for biosensors, *Curr. Opin. Electrochem.* 12 (2018) 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.07.009>.

[14] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, Liposome: Classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 1. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.

[15] R.E. Lane, D. Korbie, W. Anderson, R. Vaidyanathan, M. Trau, Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep07639>.

[16] P. García-Manrique, E. Serrano-Pertierra, E. Lozano-Andrés, S. López-Martín, M. Matos, G. Gutiérrez, M. Yáñez-Mó, M.C. Blanco-López, Selected tetraspanins functionalized niosomes as potential standards for exosome immunoassays, *Nanomaterials*. 10 (2020) 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano10050971>.

[17] P. García-Manrique, M. Matos, G. Gutiérrez, O.R. Estupiñán, M.C. Blanco-López, C. Pazos, Using Factorial Experimental Design to Prepare Size-Tuned Nanovesicles, *Ind. Eng. Chem. Res.* 55 (2016) 9164–9175. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b01552>.



### B.4.3: Efecto peroxidasa de las nanopartículas superparamagnéticas

Las enzimas son moléculas orgánicas que actúan como catalizadores de reacciones químicas, es decir, aceleran la velocidad de reacción. Las enzimas naturales, la mayoría proteínas, exhiben una actividad catalítica altamente eficiente, una alta especificidad de sustrato y una alta selectividad en las reacciones biológicas. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, tienen inconvenientes intrínsecos para aplicaciones comerciales, pueden verse afectadas por condiciones ambientales (por ejemplo, pH y temperatura), son susceptibles a la digestión por proteasas y son difíciles de preparar y purificar. En la actualidad se han identificado nanomateriales sintéticos que exhiben actividad enzimática, caracterizándose por su estabilidad, bajo coste y fácil preparación. Por lo tanto, se puede decir que este tipo de nanomateriales son un candidato perfecto para sustituir a las enzimas naturales en diversas aplicaciones.

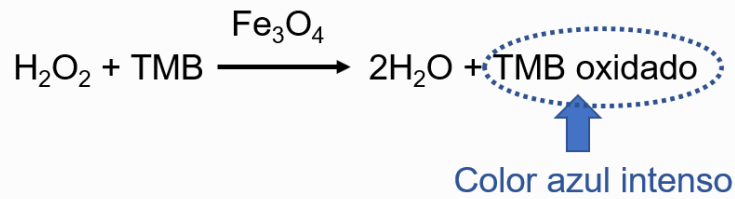
Gao *et al.* [376] fueron los primeros en descubrir que las MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  poseen una actividad intrínseca similar a la peroxidasa. De forma similar a la enzima HRP, estas nanopartículas catalizan la oxidación de tres sustratos de peroxidasa: TMB, di-azobenceno (DAB) y o-fenilendiamina (OPD). Esta actividad puede explicarse desde un punto de vista química: los iones  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  en solución (reactivo de Feton) son conocidos por catalizar la descomposición del peróxido de hidrogeno. De una forma similar, existen una serie de enzimas peroxidases (como la HRP) que contienen estos iones en sus centros de reacción, por lo tanto, estos iones presentes en la estructura cristalina de las MNPs actúan de forma similar a los mismos encontrados en los centros activos de las enzimas naturales.

Se ha demostrado que las MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  son muy eficaces como catalizadores mostrando una mayor afinidad de unión por el sustrato TMB que la HRP y un nivel de actividad veces mayor a la concentración molar equivalente de catalizador. Además, las MNPs, como ventaja añadida, pueden ser utilizadas como agente de captura si son funcionalizadas. Estos resultados reflejan el potencial de estas nanopartículas como peroxidasa bio-mimética para ser utilizada como herramienta de captura y detección en inmunoensayos.

Tomando como base estos antecedentes, se ha empleado la actividad peroxidasa de las MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como estrategia de amplificación de la señal óptica proporcionada por estas mismas partículas utilizadas como marca de detección en LFIA. Las MNPs

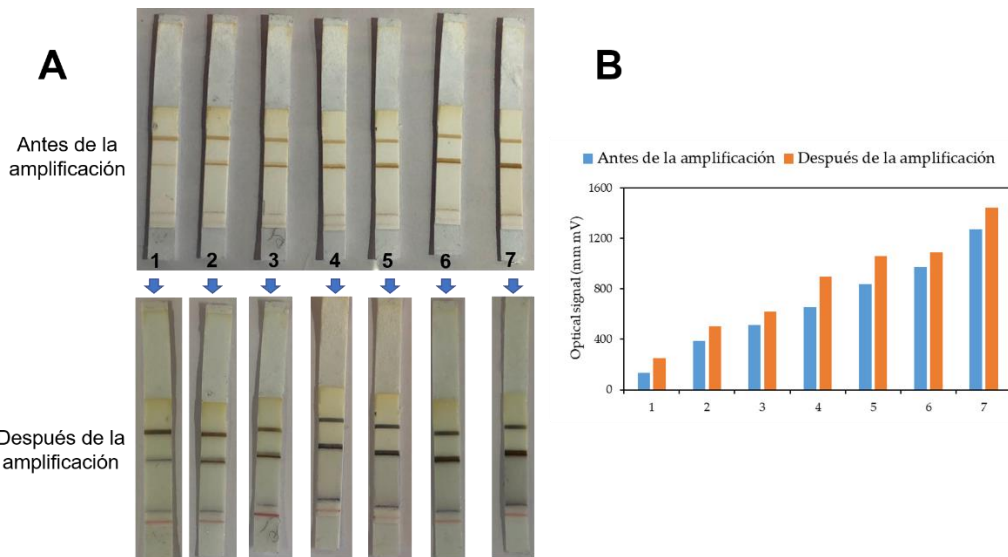


de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  catalizan la oxidación del sustrato TMB según la reacción mostrada en la Figura 27:



**Figura 27.** Reacción enzimática de las MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y TMB.

Una vez realizado el LFIA con MNPs como marca de detección se sumerge la tira en una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y TMB en una proporción 1:2. Se deja la tira sumergida 10 min en la mezcla, y a continuación se lava con agua. Se mide la señal óptica antes y después de la reacción con un lector de reflectancia para analizar la amplificación de la señal. La Figura 28 muestra la comparativa de las tiras antes y después de la reacción para tiras que contienen diferentes concentraciones de MNPs en la línea de test. Esta figura también muestra un diagrama de barras donde se compara la señal de reflectancia antes y después de la amplificación para cada una de las tiras.



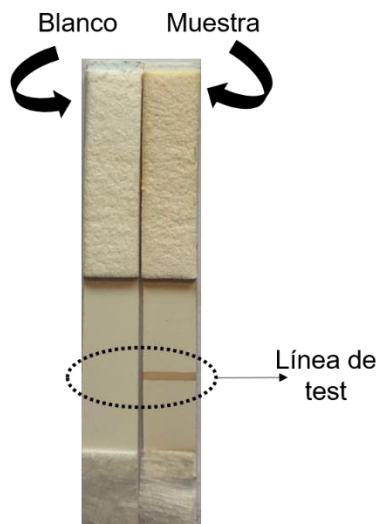
**Figura 28.** Amplificación de la señal óptica a través de la actividad peroxidasa de las MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Como prueba de concepto obtenida de los experimentos preliminares expuesto, se puede concluir que gracias al efecto peroxidasa de las MNPs usadas como marca de detección se puede mejorar la señal óptica de la línea de test de los LFIA.

## **B.4.4: Encapsulación de nanopartículas magnéticas con el uso de liposomas**

Nuestro grupo de investigación tiene previa experiencia en la síntesis de nanovesículas (liposomas y niosomas) de tamaño controlado por inyección en etanol y en la síntesis de nanopartículas superparamagnéticas por el método de microemulsiones. Por lo tanto, combinando ambas rutas, se han encapsulado las MNPs, previamente preparadas, en liposomas para la obtención de liposomas magnéticos. Para llevar a cabo la síntesis se exploran dos rutas que consisten en la adición de las nanopartículas en ambas fases (orgánica y acuosa) utilizadas para la inyección en etanol. Resultados preliminares muestran una encapsulación de las MNPs en ambos casos. En el caso de la adición en la fase orgánica, las MNPs son encapsuladas en la doble capa lipídica de los liposomas. En el otro caso, son encapsulados en la parte interior del liposoma.

Con el objetivo de funcionalizar los liposomas magnéticos con proteínas se ha añadido parte del colesterol, utilizado para la formación de la membrana de los liposomas, modificado con grupos -COOH. A continuación, se ha estudiado la funcionalidad con el sistema modelo biotina-neutravidina. Para ello, se ha unido covalentemente la neutravidina a los grupos carboxilo a través de la química de acoplamiento EDC/NHS. Una vez funcionalizados los liposomas magnéticos se ha estudiado la interacción biotina-neutravidina con un LFIA. La tira contiene una línea de test en la que se ha inmovilizado biotina, de forma que, al fluir los liposomas magnéticos funcionalizados con neutravidina se quedan retenidos en la línea, mientras que los no funcionalizados fluyen hasta el final de la tira sin quedarse retenidos. En la Figura 29 se muestran dos tiras de flujo lateral correspondientes a un blanco (liposomas magnéticos sin funcionalizar) y una muestra (liposomas magnéticos funcionalizados con neutravidina). En el blanco no observa la línea de test, por lo tanto, se puede concluir que no existen interacciones inespecíficas entre los liposomas magnéticos y la línea de test. En la muestra se puede apreciar la línea de test que es resultado de la interacción entre la biotina inmovilizada en la membrana y la neutravidina bio-conjugada a los liposomas magnéticos.



**Figura 29.** Ejemplo de LFAs (blanco y muestra) para el sistema de afinidad biotina-neutravidina usando como marca de detección liposomas magnéticos.

Con los resultados preliminares realizadas se puede afirmar la capacidad de los liposomas sintetizados por inyección en etanol para encapsular MNPs, así como la biofuncionalidad del sistema. Futuros experimentos requieren la optimización del protocolo para usar el sistema como sistema de amplificación de la señal magnética en los LFAs.

**PARTE C: CONCLUSIONES Y  
PERSPECTIVAS DE FUTURO**

---



## **C.1 Conclusiones**

En esta tesis doctoral se ha estudiado el potencial de las MNPs para su uso como marca de ISM y detección en LFIA. Se han fabricado, calibrado y validado MLFIAs en los dos formatos más habituales, sándwich y competitivo, y con moléculas de interés en los campos biomédico y alimentario. Concretamente, se han desarrollado con éxito MLFIAs para determinación de los niveles de biomarcadores de cáncer colorrectal (CD147 en EVs) en plasma humano e histamina en vino.

Las conclusiones derivadas de la presente tesis doctoral se han expuesto a lo largo de la memoria en cada uno de los capítulos de la parte B y se sintetizan a continuación.

1. Se han utilizado nanopartículas multicore superparamagnéticas con recubrimiento de carbono como marca de detección en inmunoensayos magnéticos de flujo latera.
  - i. El recubrimiento de carbono mejora la señal óptica con respecto a otras MNPs, y además poseen gran potencial para ser usadas en ISM.
  - ii. Se ha desarrollado un MLFIA para la detección cuantitativa de EVs a través del uso de marcadores generales. Se ha llegado a la conclusión de que estas nanopartículas no son las más adecuadas para la cuantificación con el sensor inductivo en los rangos de interés requeridos, debido a la gran contribución de la capa de carbono por *nanoflower* que disminuye notablemente la imanación a saturación por gramo de MNP.
2. Se han utilizado MNPs recubiertas de doble capa de ácido oleico en el desarrollo de un MLFIA para la determinación de un biomarcador de cáncer colorrectal embebido en EVs. Sus grupos funcionales dispuestos en la superficie han permitido su biofuncionalización con anticuerpos. El ensayo se realizó en formato sándwich.
  - i. Para la optimización del inmunoensayo y la realización de estudios de estabilidad, se han empleado biomarcadores generales de vesículas extracelulares, llegando a la conclusión de que estas nanopartículas son adecuadas para ser cuantificadas con el sensor inductivo. Además, su señal, tanto óptica como magnética, en la tira es estable al menos durante cinco meses. El conjugado nanopartícula-anticuerpo muestra una mayor estabilidad a 4 °C que

a temperatura ambiente. Por lo tanto, dicho conjugado debe ser almacenado y conservado en nevera.

- ii. La curva de calibración obtenida para la determinación de EVs a través del biomarcador CD147 permite la cuantificación de muestras de pacientes de cáncer de colon. Se ha obtenido, de este modo, valores acordes con la cuantificación realizada a través de NTA.
3. Se ha desarrollado un MLFIA en formato competitivo para la determinación de histamina. Se ha demostrado su aplicabilidad en muestra reales de vino tinto. Los resultados obtenidos de la cuantificación con este inmunoensayo están en concordancia con los de cromatografía líquida de alta resolución. La determinación de histamina en vinos y mostos en los diferentes puntos de su elaboración demuestra el gran potencial de esta herramienta para ser utilizada en pequeñas bodegas que no cuentan con un laboratorio centralizado para el control y calidad de sus vinos. Además, también cabe destacar, su uso para consumidores de vino, especialmente para aquellos que tienen gran sensibilidad a esta amina biógena.
    - i. La optimización de la concentración de proteína A/G empleada para el recubrimiento de las nanopartículas ha permitido llevar a cabo una aglomeración controlada de las partículas, proporcionando de este modo una amplificado de la señal aumentando el cociente nanopartículas/anticuerpos.
    - ii. Las marcas de detección superparamagnéticas en esta aplicación muestran ventajas con respecto al oro coloidal. Por lo tanto, la combinación del uso de las nanopartículas superparamagnéticas como marca de detección y su cuantificación a través del sensor inductivo son ventajosas para solventar los problemas de matriz originados por muestras complejas.

De una forma general, se puede concluir que se ha demostrado la aplicabilidad de los inmunoensayos de flujo lateral magnético con capacidad cuantitativa, tanto en formato competitivo como sándwich, en diferentes campos de interés, el biosanitario y el alimentario. En todos los casos se han alcanzado límites de detección en los rangos de interés y excelentes resultados con muestras sin tratamiento (plasma humano para medida de EVs y vino tinto para detección de histamina).

Del último capítulo, en el que se incluyen líneas de investigación iniciadas a explorar, y de las que se han expuesto los resultados preliminares, se puede concluir:

- A. Los resultados preliminares demuestran la posibilidad de desarrollar una plataforma electroquímica para la determinación de la concentración de EVs utilizando liposomas y niosomas sintéticos como modelo biomimético.
- B. Se ha demostrado la posibilidad de amplificar la señal óptica de las nanopartículas superparamagnéticas, utilizadas como marca de detección en inmunoensayos de flujo lateral, a través de su actividad peroxidasa. Esta actividad permite oxidar el TMB generando color azul intenso en la línea de control y test, mejorando, de este modo, la señal óptica.
- C. También se ha demostrado la posibilidad de encapsular nanopartículas superparamagnéticas en liposomas con el objetivo de amplificar la señal magnética, y usar esta marca de detección, de forma simultánea para IMS.





## **C.2 Conclusions**

In this thesis, the potential of MNPs to be used in immunoseparation and as labels in LFIA has been studied. MLFIAs have been designed, manufactured, calibrated, and validated in the two most common formats, sandwich and competitive, and with molecules of interest in the biomedical and food fields. Specifically, MLFIAs have been successfully developed to determine the levels of colorectal cancer biomarkers (CD147 in EVs) in human plasma and histamine in wine.

The conclusions of this thesis have been presented in the chapters of part B and are summarized below:

1. Carbon-coated superparamagnetic multicore nanoparticles have been used as label in magnetic lateral flow immunoassays.
  - i. The carbon coating improves the optical signal comparing with other MNPs, and also, they have a great potential to be used in ISM.
  - ii. An MLFIA has been developed for the quantitative detection of EVs using general markers. It has been concluded that these nanoparticles are not the most suitable for quantification with the inductive sensor in the required ranges of interest, due to the large contribution of the carbon layer per nanoflower that significantly reduces the saturation magnetization per gram of MNPs.
2. MNPs coated with an oleic acid double-layer have been used in the development of a MLFIA for the determination of a colorectal cancer biomarker embedded in EVs. Its functional groups on the surface have allowed its biofunctionalization with antibodies. The test followed a sandwich format.
  - i. For the optimization of the immunoassay and the performance of stability studies, general biomarkers of extracellular vesicles have been used. It has been concluded that these nanoparticles are suitable to be quantified with the inductive sensor. Also, its signals, both optical and magnetic, on the strip are stable at least five months. The nanoparticle-antibody conjugate shows greater stability at 4 ° C than at room temperature. Therefore, the conjugate has to be stored at 4 ° C.
  - ii. The calibration curve obtained for the determination of EVs using CD-147 biomarker allows the quantification of samples from colorectal cancer patients. The concentration values agree with those obtained by the commonly used NTA method.

3. A competitive format MLFIA has been developed for the determination of histamine. Its feasibility has been demonstrated in red wine samples. The results obtained from the quantification are in accordance with those obtained by high-performance liquid chromatography. The determination of histamine in wines and musts at the different points of their elaboration shows the great potential of this tool to be used in small cellars that do not have a centralized laboratory for the control and quality of their wines. In addition, it is also worth noting its use for personal use of wine consumers, especially for those who have a high sensitivity to this biogenic amine.
  - i. The optimization of the concentration of protein A / G used to coat nanoparticles allowed to carry out a controlled agglomeration of the particles, thus providing a signal amplification due to the increase of the ratio nanoparticles / antibodies.
  - ii. Superparamagnetic labels in this application show advantages over colloidal gold. Therefore, the combination of superparamagnetic nanoparticles used as label and their quantification by the inductive sensor could be advantageous with complex real samples.

In general, the conclusions show the applicability of quantitative lateral magnetic flow immunoassays, both in competitive and sandwich formats, in different fields of interest, biomedical and food. In all cases, limits of detection have been reached in the ranges of interest and excellent results with untreated samples (human plasma to measure EVs and red wine to detect histamine).

From the last chapter, which includes other research lines to be explored, it can be concluded:

- i. Preliminary results demonstrate the possibility of developing an electrochemical platform for the determination of EVs concentration using synthetic liposomes and niosomes as a biomimetic model.
- ii. The possibility of amplifying the optical signal of superparamagnetic nanoparticles, used as label in lateral flow immunoassays, by their peroxidase activity has been demonstrated. This activity allows the oxidation of TMB, providing an intense blue colour at the control and test lines, thus improving the optical signal.
- iii. It has also been demonstrated the possibility of encapsulating superparamagnetic nanoparticles in liposomes to amplify the magnetic signal. They can be used as multilabel system.

### **C.3 Perspectivas de futuro**

Los trabajos futuros derivados de esta tesis doctoral pueden enfocarse en diferentes aspectos con el objetivo conjunto de mejorar los MLFIAs:

- a) Los excelentes resultados obtenidos con la combinación de MLFIAs y un prototipo del sensor inductivo incentivan la idea de hacer portátil el sensor.
- b) Los resultados obtenidos con los diferentes tipos de MNPs promueven la idea de combinar las ventajas de cada una de ellas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ ) para la optimización de las nanopartículas.
- c) La búsqueda de estrategias de amplificación con el fin de mejorar las señales, tanto magnética como óptica. Entre estas técnicas se pueden encontrar la aglomeración controlada de MNPs, a través de liposomas, o la actividad peroxidasa que muestran estas partículas. Estas estrategias son mencionadas en el capítulo B.4.
- d) El desarrollo de ensayos multiplex para la determinación simultánea de varios analitos con el fin de aportar un diagnóstico o resultado más completo al problema planteado. Un claro ejemplo derivado de esta tesis sería la detección simultánea de dos o más biomarcadores de cáncer colorectal.
- e) Combinación de la capacidad dual que tienen las MNPs: ISM y marca de detección a través del uso de un solo tipo de partículas. Esta aplicación tendría un gran potencial para la inmunoseparación y detección de EVs. En la actualidad, no existe una técnica estándar para llevar a cabo esta función. Este método permitiría la purificación y detección de EVs de una forma rápida y sencilla. Se han realizado pruebas preliminares para este fin con las MNPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ . Los resultados confirman la inmunoseparación, pero sería necesario analizar el rendimiento y efectividad de la separación.
- f) El desarrollo de este tipo de ensayos para la cuantificación de otros analitos de interés, pues la versatilidad de esta técnica permite su aplicación a otros campos de interés.
- g) Los resultados obtenidos de la prueba de concepto para el desarrollo de una plataforma electroquímica para la cuantificación de EVs abre la posibilidad de añadir esta técnica a la cuantificación de vesículas.



## **C.4 Future prospects**

Future works derived from this thesis can be focuses on different issues. All of them try to improve MLFIAs.

a) The excellent results obtained with the combination of MLFIAs and a prototype of the inductive sensor encourage the idea of making a portable sensor.

b) The results obtained with the different types of MNPs promote the idea of combining the advantages of each one of them ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ ) for the optimization of the nanoparticles.

c) The study of amplification strategies in order to improve the signals, both magnetic and optical. Among these techniques can be found the controlled agglomeration of MNPs, by liposomes, or the peroxidase activity provided by these particles. These strategies are mentioned in chapter B.4.

d) The development of multiplex assays for the simultaneous determination of several analytes in order to provide a more complete diagnosis or result to the problem proposed. A clear example derived from this thesis would be the simultaneous detection of two or more biomarkers of colorectal cancer.

e) Combination of the dual capacity that MNPs have: ISM and label by using a single type of particles. This application would have great potential for immunoseparation and detection of EVs. Currently, there are no standard techniques to carry out this function. This method would allow the purification and detection of EVs in a quick and easy way. Preliminary experiments have been carried out for this purpose with the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$  MNPs. The results confirm the immunoseparation, but it would be necessary to analyze the yield and effectiveness of the separation.

f) The development of MLFIAs for the quantification of other analytes, since the versatility of this technique allows its application to other fields of interest.

g) The results obtained from the proof of concept for the development of an electrochemical platform for the quantification of EVs opens the possibility of adding this technique to the quantification of vesicles.



## **ANEXOS**

---





## Anexo I: Técnicas de caracterización de nanopartículas para marcas de detección de inmunoensayos

Las técnicas de caracterización son una herramienta imprescindible en el seguimiento de la síntesis de las nanopartículas y en los procesos de conjugación de las mismas con biomoléculas. La combinación de diversas técnicas permite conocer parámetros, como pueden ser tamaño, morfología, composición, que son necesarios para determinar otras propiedades de las nanopartículas y, estas a su vez, son las que delimitan las aplicaciones para las que se pueden emplear. La caracterización de nanomateriales implica actualmente un desafío importante debido al conocimiento interdisciplinar que requiere el uso de las numerosas técnicas de caracterización que existen. Otras limitaciones a las que se tiene que enfrentar la comunidad científica son: la ausencia de materiales de calibración universales, las dificultades relacionadas con la preparación de las muestras y la interpretación de los resultados. En la Tabla AI- 1 se indican las técnicas de caracterización utilizadas para el desarrollo de esta tesis doctoral, así como la información que proporciona cada una de ellas.

**Tabla AI- 1.** Técnicas de caracterización empleadas para el estudio de las nanopartículas e información proporcionada en cada caso.

<b>Técnica</b>	<b>Información proporcionada</b>
Técnicas microscópicas (Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM))	Morfología, tamaño de nanopartícula, distribución de tamaños (dispersión de tamaños) y cristalinidad
Dispersión de luz dinámica (DLS)	Tamaño hidrodinámico y detección de aglomerados
Potencial zeta	Carga superficial y estabilidad coloidal
Difracción de rayos X (XRD)	Estructura cristalina, composición y tamaño del grano cristalino
Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	Naturaleza/composición del recubrimiento superficial
Análisis termogravimétrico (TGA)	Masa, composición/naturaleza del recubrimiento superficial y estabilidad térmica
Dispositivos superconductores de interferencia cuántica (SQUID)	Imanación a saturación, imanación remanente, campo coercitivo intrínseco y temperatura de bloqueo
Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)	

A continuación, se van a explicar los conceptos básicos de las diferentes técnicas de caracterización expuestas en la Tabla AI- 1.

### ***Técnicas de microscopía***

#### *Microscopía electrónica de transmisión*

La **TEM** es una técnica que estudia la interacción entre un haz de electrones acelerados (las energías oscilan en el rango de 60-150 keV) y una muestra lo bastante delgada como para transmitir el haz. Cuando el haz de electrones colisiona con los átomos parte de los electrones son transmitidos mientras que el resto son dispersados (elásticamente o inelásticamente). La imagen se construye con la información adquirida por los electrones transmitidos y muestra distintas intensidades de gris según el grado de dispersión de los electrones incidentes.

Se trata de la técnica más común para analizar el tamaño y la forma de las nanopartículas. El análisis de una cantidad suficiente de imágenes proporciona la estadística sobre la distribución de tamaños y morfología. Sin embargo, algunas de las limitaciones que presenta esta técnica es el tiempo que requiere, la preparación previa de la muestra, su observación al microscopio, y el posterior análisis de las imágenes adquiridas. Para obtener resultados fiables, es necesario seguir un protocolo adecuado para preparar la muestra, que evite su alteración o la creación de artefactos, como por ejemplo la agregación durante el secado de la suspensión coloidal [377].

Para el uso de las partículas en LFIA es muy importante conocer el tamaño hidrodinámico, que incluye la capa de soltación del medio de suspensión entorno a las partículas. Para ello, la técnica estándar es DLS, que además permite valorar el grado de aglomeración de las partículas después de su funcionalización. DLS es una técnica más asequible, rápida y fácil de usar que TEM, si bien ambas proveen resultados complementarios.

En el caso de las partículas de oro, puede emplearse la espectroscopia visible-ultravioleta para estimar el tamaño de forma sencilla [378].

La **microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)** es un modo de imagen de la TEM que utiliza imágenes de contraste de fase, donde los electrones transmitidos y dispersos se combinan para producir la imagen final [379]. La HRTEM requiere una mayor apertura del objetivo para recoger los electrones dispersados. La imagen de contraste de fase es una técnica con una resolución muy alta, que incluso permite detectar la estructura cristalina de la muestra analizada. La TEM convencional no tiene suficiente resolución para obtener imágenes de la estructura cristalina de las nanopartículas, sin embargo, la HRTEM se ha convertido en una de las técnicas de caracterización más comunes y utilizada para caracterizar su estructura interna.

La **SEM** es una técnica que proporciona imágenes de análisis topográfico, estructural y composicional [380]. En este tipo de microscopia se emplea un haz de

electrones de alta energía (electrones primarios) que se focaliza, con ayuda de un sistema de lentes, para hacerlo incidir sobre la muestra. La muestra, como respuesta al impacto electrónico, genera electrones (denominados electrones secundarios y retrodispersados) los cuales son detectados mediante unos dispositivos que son capaces de registrar la cantidad de electrones detectados y convertirlos en una señal digital que se traduce como intensidad de color, para, finalmente, de esta forma construir la imagen final. Las zonas donde se detectan un mayor número de electrones se representan con un color más blanco. La imagen final tiene un aspecto similar a una fotografía en escala de grises. En este caso se utilizan los electrones secundarios y retrodispersados para generar la imagen final. Por lo tanto, la SEM es otra técnica de caracterización muy utilizada para caracterizar nanomateriales, pues permite obtener información relativa a su estructura, porosidad, morfología superficial, y hasta la composición química (imágenes de contraste de electrones retrodispersados proporcionan información relativa de número atómico).

La **espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS)** es un método de análisis químico que puede combinarse con el TEM y SEM, para determinar la composición elemental con resolución espacial. El principio del análisis consiste en excitar un área muy pequeña del material que se quiere analizar con un haz de electrones, para posteriormente detectar la radiación X que emite este material excitado. Los electrones empleados para excitar el material presentan una magnitud de energía (del orden de decenas de keV) que son capaces de provocar transiciones en los niveles atómicos más internos, produciendo, de esta forma, fotones en el espectro de los rayos X que son característicos de cada tipo de átomo. Con este análisis es posible identificar los elementos presentes en una pequeña región del material [381].

### ***Dispersión de luz dinámica***

La DLS es una técnica muy utilizada para determinar el tamaño hidrodinámico y la distribución de tamaños de nanopartículas en suspensión en el rango de los nanómetros a los micrómetros [382]. Las nanopartículas dispersas en una disolución coloidal están en continuo movimiento browniano. La técnica DLS mide la dispersión de la luz en función del tiempo pues el movimiento browniano hace que la luz laser se disperse en diferentes intensidades. A través del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano, y aplicando la relación de Stokes-Einstein se determina el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas:

$$D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (\text{AI-1})$$

(donde  $D_T$  es el coeficiente de difusión traslacional,  $K_B$  la constante de Boltzman ( $1.380 \times 10^{-23} \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  la temperatura en Kelvin,  $\eta$  la viscosidad del medio y  $r_H$  el radio hidrodinámico).

El diámetro hidrodinámico se refiere al diámetro de la nanopartícula y las moléculas de disolvente que difunde a la misma velocidad que el coloide, es decir, indica el tamaño de la partícula dinámica hidratada y solvatada. Por lo tanto, este tamaño tiene en cuenta el efecto de arrastre entre la nanopartícula y el líquido en el que está dispersa. Las partículas más grandes tendrán velocidades de difusión más lentas que las partículas más pequeñas.

Esta técnica proporciona cuatro parámetros: diámetro promedio (Z-average), diámetro ponderado por intensidad (distribución de intensidad,  $\alpha r^6$ ), diámetro ponderado por volumen (distribución de volumen,  $\alpha r^3$ ) y diámetro ponderado por número (distribución de número,  $\alpha r^1$ ) [383]. El diámetro ponderado por intensidad son los datos "crudos" obtenidos de la intensidad de dispersión de cada fracción de partícula, mientras que el diámetro ponderado por volumen y el diámetro ponderado por número se deducen a partir de la intensidad. El diámetro promedio es la "media acumulada" que es considerado como el parámetro principal y más estable generado por esta técnica. Por otro lado, cabe destacar, que la distribución de la intensidad, en ocasiones, puede ser no representativa de distribución real porque una pequeña cantidad de agregación/aglomeración o presencia de partículas más grandes representa un mayor peso en la distribución, ya que mide las partículas en función de los radios a la sexta potencia. Por lo tanto, este parámetro es muy sensible a los aglomerados de partículas. Es importante analizar los diferentes ajustes de los datos para obtener una información representativa de la muestra analizada. Otro parámetro que proporciona esta técnica es el índice de polidispersidad que informa sobre la distribución de tamaños de la muestra. Generalmente, valores superiores a 0.7 indican que la muestra posee una distribución muy amplia, y probablemente, la técnica DLS no sea en ese caso la adecuada para medir la distribución de tamaños de la muestra.

La concentración de nanopartículas requerida para esta técnica debe ser relativamente baja para evitar un efecto de dispersión múltiple. La medida de este tamaño proporciona información muy útil para describir la estabilidad coloidal de las partículas en diferentes medios, las interacciones partícula-partícula y el estado de agregación de las partículas. En esta tesis se ha usado también para monitorizar la conjugación de las nanopartículas a los reactivos de detección.

### **Potencial Zeta**

Las medidas de potencial Zeta, en la mayoría de los casos, se realizan en el mismo equipo que se utilizaba para medir la DLS. Los resultados obtenidos con esta técnica determinan la estabilidad de las partículas en disolución a partir de la repulsión electrostática entre partículas. El potencial Zeta es un parámetro que no se puede medir directamente, y se tiene que determinar a través del movimiento generado por un potencial de carga (movilidad electroforética) [384]. Para realizar las medidas se utiliza una cubeta en forma de U que contiene dos electrodos ubicados en los extremos superiores. Se aplica un voltaje alterno a la suspensión de las partículas, lo que da lugar a la movilidad electroforética de las partículas cargadas. A través de esta movilidad electroforética se conoce el potencial Zeta de la muestra que describe la carga superficial de las partículas en un medio determinado. Para conseguir una medida fiable, es imprescindible asegurar que durante la medida las partículas permanezcan completamente en suspensión y no precipiten al fondo de la cubeta. Para conseguir esto, es necesario llevar a cabo un control del pH y de la concentración de iones en el medio de suspensión, así como también asegurar que los efectos de dilución no alteran la carga superficial de las partículas.

Las partículas con una alta carga positiva o negativa en su superficie tienden a repelerse entre sí, dando lugar a soluciones coloidales estables que muestran ninguna o poca tendencia a la aglomeración. Se puede decir que hay una relación entre la carga superficial de una partícula y el valor de pH de la disolución. Cuando las partículas están altamente cargadas, los valores de pH son muy diferentes al "punto isoeléctrico" de una disolución. El punto isoeléctrico de una disolución se corresponde con un valor 0 de potencial Z. Por lo contrario, valores de potencial Zeta bajos se corresponden con valores más cercanos al punto isoeléctrico del sistema, y son indicativos de la floculación de los coloides. En general, valores de potencial Zeta en el rango  $\pm 20-30$  mV o más altos se consideran estables. Esta propiedad puede ajustarse mediante la modificación química de la superficie de las partículas, por lo tanto, la estabilización de la suspensión coloidal se obtiene mediante la repulsión electrostática. Como ya se mencionó previamente, las medidas obtenidas mediante DLS pueden proporcionar información sobre la agregación de las partículas en suspensión. Por lo tanto, si se combinan estas medidas con las de potencial Zeta se puede obtener una caracterización más completa.

### ***Difracción de rayos X***

La XRD es otra de las técnicas más utilizadas para la caracterización de nanopartículas, la cual proporciona información sobre la estructura cristalina, la naturaleza de la fase, parámetros de red cristalina y tamaño de los cristales [385]. Esta técnica consiste en hacer penetrar un haz de rayos X en la muestra, el cual luego es

difractado por los planos cristalinos contenidos en la muestra. El ángulo y la intensidad de la difracción son característicos de una estructura cristalina, de modo que se puede determinar la composición de las nanopartículas comparando la posición y la intensidad de los picos con patrones de referencia denominados difractogramas. Además, en muestras policristalinas se pueden identificar las diferentes fases cristalinas puesto que todos los sólidos cristalinos poseen su difractograma característicos. El tamaño de los cristales se puede determinar aplicando la ecuación de Scherrer que relaciona inversamente la anchura de los picos de difracción con el tamaño aparente de la partícula [386]:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (\text{AI-2})$$

(donde  $D$  es el tamaño promedio del cristal,  $k$  es el factor de forma del cristal,  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación utilizada,  $\beta$  es el ancho a la altura del pico de difracción de la muestra y  $\theta$  es la posición del pico de difracción).

Las medidas de las muestras suelen realizarse en polvo, generalmente, después de secar las soluciones coloidales correspondientes; siendo esto una ventaja pues los valores obtenidos son estadísticamente representativos de total del volumen de la muestra. Sin embargo, una de las principales limitaciones de esta técnica, es que no es adecuada para la caracterización de materiales amorfos, y los picos XRD son demasiado anchos para partículas con un tamaño inferior a 3 nm.

### ***Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier***

La FTIR es la técnica empleada por excelencia para la identificación de los grupos químicos en la superficie de las partículas. Esta técnica mide la energía vibracional de los enlaces a través de medidas de absorción de radiación electromagnética con longitudes de onda dentro de la región del infrarrojo medio (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ). De esta forma se obtiene un espectro en el que se puede observar la posición de las bandas que se corresponden con grupos funcionales específicos [387]. Las muestras se pueden preparar siguiendo diferentes métodos, pero el más común consiste en dispersar las partículas en bromuro de potasio para preparar una pastilla, para su posterior análisis.

### ***Análisis termogravimétrico***

El TGA es una técnica que proporciona información sobre la masa y la composición de los recubrimientos de las nanopartículas. El procedimiento de esta técnica consiste en calentar la muestra siguiendo una rampa de temperatura, para que los componentes con diferentes temperaturas de degradación se descompongan y se

evaporen, dando lugar a un cambio de masa. La temperatura y la pérdida de masa es registrada por el dispositivo TGA, y, teniendo en cuenta la masa inicial de la muestra, se puede determinar el tipo y la cantidad de ligandos, así como la masa de los núcleos (la masa final que queda sin evaporar) [388]. Es importante, eliminar los disolventes (agua u otro) antes de realizar la medida, y por ello, generalmente, se eleva la temperatura a 100 °C.

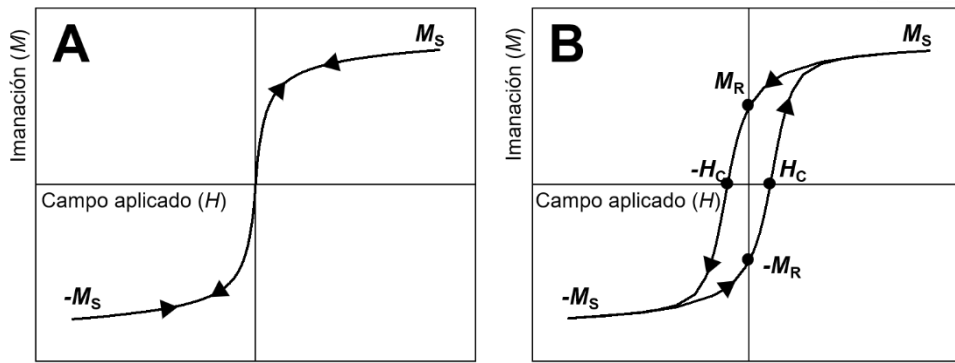
Esta técnica se utiliza con mucha frecuencia para determinar la concentración de MNP en suspensión. Para ello, generalmente se sigue una rampa de temperatura de 10 °C/min, bajo condiciones de nitrógeno para evitar la oxidación, y se registra la pérdida de masa en el rango de temperatura de 100-500 °C [389]. La masa después de la evaporación del medio de suspensión dividida por el volumen inicial de muestra proporciona la concentración.

El TGA es una técnica simple y directa que no requiere la necesidad adicional de preparación de muestra, más que tener la muestra en estado seco o evaporar el disolvente como paso previo al análisis. El inconveniente de la técnica es la necesidad de cantidades elevadas de muestra (miligramos), lo que puede elevar el coste o no ser un experimento factible para la producción de nanopartículas a escala de laboratorio.

### ***Magnetómetro de muestra vibrante***

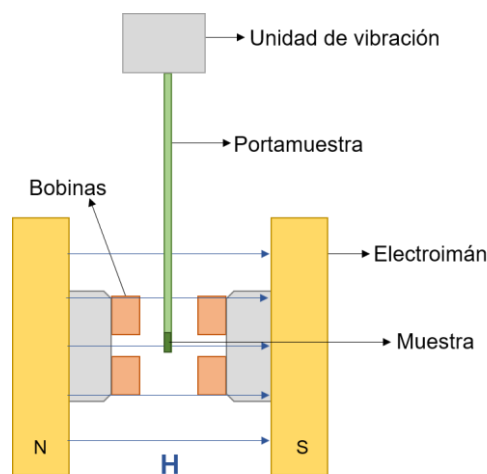
Una de las principales propiedades que se estudia en las MNPs es la forma en que se iman (o magnetizan) como respuesta a un campo magnético aplicado. La relación entre la imanación  $M$  y el campo excitador  $H$  representa la curva de imanación del material (Figura AI- 1). Cuando el material tiene memoria magnética, su curva de imanación se abre (es decir, el material responde de forma diferente al campo creciente y al decreciente), lo que se conoce como histéresis magnética. En ese caso, la curva de imanación se llama también ciclo de histéresis (Figura AI- 1).





**Figura AI- 1.** Representación gráfica de los ciclos de histéresis. (A) Nanopartículas magnéticas que no muestran histéresis. (B) Nanopartículas magnéticas que exhiben histéresis.

Entre las técnicas más populares de obtención de las curvas de imanación de las MNPs destaca el magnetómetro de muestra vibrante (VSM). Como puede verse en el esquema de la Figura AI- 2 en el VSM la muestra se hace vibrar perpendicularmente al campo aplicado. La imanación de la muestra al vibrar es variable con el tiempo. Esto genera un flujo magnético alterno que induce un voltaje en las bobinas receptoras proporcional a la frecuencia y al momento magnético de la muestra. Conocido el volumen o la masa de la muestra, puede calcularse la imanación de la misma en cada valor de campo aplicado. Este equipo es relativamente simple de usar, fiable y suele estar accesible en los servicios comunes de investigación de los centros de investigación. Muchos equipos permiten medir desde temperaturas criogénicas a temperaturas por encima de la ambiente.



**Figura AI- 2.** Esquema de las diferentes partes de un VSM.

Las características más importantes del ciclo de histéresis de un material se indican en la Figura AI- 1: la imanación máxima, denominada imanación a saturación ( $M_S$ ), que se produce cuando todos los momentos magnéticos están alineados con el campo; el valor de la imanación a campo nulo, llamado imanación de remanencia ( $M_R$ ) y el valor del campo aplicado que anula la imanación y corresponde a la semianchura del ciclo, el campo coercitivo ( $H_C$ ). El área encerrada por el ciclo es la energía disipada por el material en forma de calor en el proceso cíclico de imanación. Los materiales superparamagnéticos se caracterizan por tener una curva de imanación sin histéresis, es decir,  $H_C = 0$  y  $M_R = 0$ .



## Anexo II: Producción científica:

En este anexo se presenta la producción científica de la doctoranda desarrollada durante la tesis.

### Artículos directamente relacionados con la tesis:

La Tabla All- 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra los factores de impacto de las revistas en las que se han publicado los artículos derivados de esta tesis doctoral.

**Tabla All- 1.** Factor de impacto (IF *Impact Factor*) de las revistas en las que aparecen publicados los artículos recogidos en esta tesis doctoral.

Revista	Año de publicación	IF	Área	Ranking*	Estado
Analytical and Bioanalytical Chemistry	2019	3.637	Química analítica	Q1	Publicado
Diagnostics	2020	3.110	Medicina general e interna	Q1	Publicado Portada de la edición
Biosensors	2020	3.240	Bioquímica clínica	Q2	Publicado Portada de la edición

\*A falta de los datos correspondientes al año 2020, se indica el ranking en 2019.

### Otros artículos en los que ha participado la doctoranda:

En el período de realización de la presente Tesis Doctoral su autora ha participado activamente en distintas colaboraciones que han originado las publicaciones que se enumeran a continuación.

- Lago-Cachón, D.; Oliveira-Rodríguez, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C.; Martínez-García, J.C.; **Moyano, A.**; Salvador, M.; García, J.A. Scanning Magneto-Inductive Sensor for Quantitative Assay of Prostate-Specific Antigen. *IEEE Magn. Lett.* 2017, 8.
- López-Cobo, S.; Campos-Silva, C.; **Moyano, A.**; Oliveira-Rodríguez, M.; Paschen, A.; Yáñez-Mó, M.; Blanco-López, M.C.; Valés-Gómez, M. Immunoassays for scarce tumour-antigens in exosomes: Detection of the human NKG2D-Ligand, MICA, in tetraspanin-containing nanovesicles from melanoma. *J. Nanobiotechnology* 2018, 16, 1–12.
- Salvador, M.; **Moyano, A.**; Martínez-García, J.C.; Blanco-López, M.C.; Rivas, M. Synthesis of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: SWOT Analysis Towards Their Conjugation to Biomolecules for Molecular Recognition Applications. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2019, 19, 4839–4856.

- Serrano-Pertierra, E.; Oliveira-Rodríguez, M.; Matos, M.; Gutiérrez, G.; **Moyano, A.**; Salvador, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C. Extracellular vesicles: Current analytical techniques for detection and quantification. *Biomolecules* 2020, 10.
- Salvador, M.; Gallo-cordova, Á.; **Moyano, A.**; Martínez-garcía, J.C.; Blanco-lópez, M.C.; Morales, M.P. optimized nanotags for point-of-use inductive. *Analyst* 2020.

En la Tabla AII- 2. se muestra el factor de impacto de las revistas en las que se han publicado estos artículos.

**Tabla AII- 2.** Factor de impacto (IF *Impact Factor*) de las revistas en las que aparecen publicados otros artículos en los que ha participado la doctoranda durante su tesis.

Revista	Año	IF	Área	Ranking	Estado
IEEE Magn. Lett	2017	1.540	Física aplicada	Q3	Publicado
J. Nanobiotechnology	2018	6.618	Bioteconología y microbiología aplicada	Q1	Publicado
J. Nanosci. Nanotechnol	2019	1.134	Física aplicada	Q4	Publicado
Biomolecules	2020	4.082	-	Q1	Publicado
Analyst	2020	3.978	Química Analítica	Q1	Publicado

\*A falta de los datos correspondientes al año 2020, se indica el ranking en 2019.

### Asistencia a congresos y jornadas:

La autora ha presentado las siguientes comunicaciones relacionadas con su tesis en congresos y jornadas.

- 1) Título: Quantification of *Escherichia coli* using immuno-magnetic nanoparticles.  
Autores: A. Moyano, D. Lago-Cachón, F. Lombó, J. C. Martínez-García, J. A. García, M. Rivas.  
Tipo de participación: Póster.  
Congreso: NANOMED 2015. Manchester, Noviembre de 2015.
- 2) Título: Biosensor for immunomagnetic analysis of prostate specific antigen (PSA).  
Autores: A. Moyano, M. Salvador, M. Rivas, M. Oliveira-Rodríguez, M. C. Blanco-López, D. Lago-Cachón, J. C. Martínez-García, J. A. García.  
Tipo de participación: Póster.  
Congreso: BAC 2016. Gijón, Julio de 2016.
- 3) Título: A rapid, cheap, and simple lateral flow immunoassay test for the detection of histamine.

Autores: A. Moyano, M. C. Blanco-López, M. Rivas, M. Salvador, J. C. Martínez-García, M. Fernández.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 1st Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences, NALS 2017. Gijón, Diciembre 2017.

- 4) Título: Detection and quantification of exosomes by means of carbon-coated superparamagnetic nanoflowers.

Autores: A. Moyano, M. Salvador, J. C. Martínez-García, M. Rivas, M. C. Blanco-López, M. González-Gómez, Z. Vargas Osorio, Y. Piñeiro, J. Rivas.

Tipo de participación: Comunicación Oral.

Congreso: The Spanish magnetism club and the Spanish chapter of the IEEE magnetics society annual joint meeting. Gijón, Noviembre 2018.

- 5) Título: Carbon-coated superparamagnetic nanoflowers as labels in lateral flow immunoassays.

Autores: A. Moyano, M. Salvador, J. C. Martínez-García, M. Rivas, M. C. Blanco-López, M. González-Gómez, S. Yáñez, Y. Piñeiro, J. Rivas.

Tipo de participación: Comunicación Poster pitch.

Congreso: 10th International Conference on Fine Particle Magnetism. Gijón, Mayo 2019.

- 6) Título: Quantitative magnetic immunochromatographic test to detect histamine in wine.

Autores: Amanda Moyano, María Salvador, José C. Martínez-García, Vlad Socoliuc, Ladislau Vékás, Davide Peddis, Miguel A. Alvarez<sup>5</sup>, María Fernández<sup>5</sup>, Montserrat Rivas, M. Carmen Blanco-López.

Tipo de participación: Comunicación oral. Premio a una de las mejores comunicaciones orales presentadas por Early Stage Research (ESR).

Congreso: 2nd Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences, NALS 2017. Madrid, Enero 2020.

- 7) Título: Study of synthetic nanovesicles as labels in lateral flow immunoassay.

Autores: Amanda Moyano, Esther Serrano-Pertierra, María Matos, Gema Gutiérrez, Montserrat Rivas, M. Carmen Blanco-López.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 2nd Conference on Nanomaterials Applied to Life Sciences, NALS 2017. Madrid, Enero 2020.



**Anexo III: Facsímiles de las publicaciones científicas  
derivadas de esta tesis doctoral**





Review

# Magnetic Lateral Flow Immunoassays

Amanda Moyano <sup>1</sup>, Esther Serrano-Pertierra <sup>1</sup>, María Salvador <sup>2</sup>, José Carlos Martínez-García <sup>2</sup>,  
Montserrat Rivas <sup>2</sup> and M. Carmen Blanco-López <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry & Institute of Biotechnology of Asturias, University of Oviedo, c/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>2</sup> Department of Physics & IUTA, University of Oviedo, Campus de Viesques, 33204 Gijón, Spain

\* Correspondence: cblanco@uniovi.es

Received: 1 April 2020; Accepted: 6 May 2020; Published: 8 May 2020

**Abstract:** A new generation of magnetic lateral flow immunoassays is emerging as powerful tool for diagnostics. They rely on the use of magnetic nanoparticles (MNP) as detecting label, replacing conventional gold or latex beads. MNPs can be sensed and quantified by means of external devices, allowing the development of immunochromatographic tests with a quantitative capability. Moreover, they have an added advantage because they can be used for immunomagnetic separation (IMS), with improvements in selectivity and sensitivity. In this paper, we have reviewed the current knowledge on magnetic-lateral flow immunoassay (LFIA), coupled with both research and commercially available instruments. The work in the literature has been classified in two categories: optical and magnetic sensing. We have analysed the type of magnetic nanoparticles used in each case, their size, coating, crystal structure and the functional groups for their conjugation with biomolecules. We have also taken into account the analytical characteristics and the type of transduction. Magnetic LFIA have been used for the determination of biomarkers, pathogens, toxins, allergens and drugs. Nanocomposites have been developed as alternative to MNP with the purpose of sensitivity enhancement. Moreover, IMS in combination with other detection principles could also improve sensitivity and limit of detection. The critical analysis in this review could have an impact for the future development of magnetic LFIA in fields requiring both rapid separation and quantification.

**Keywords:** magnetic nanoparticles; lateral flow immunoassay; magnetic biosensors; optical transduction; magnetic transduction; nanocomposites

---

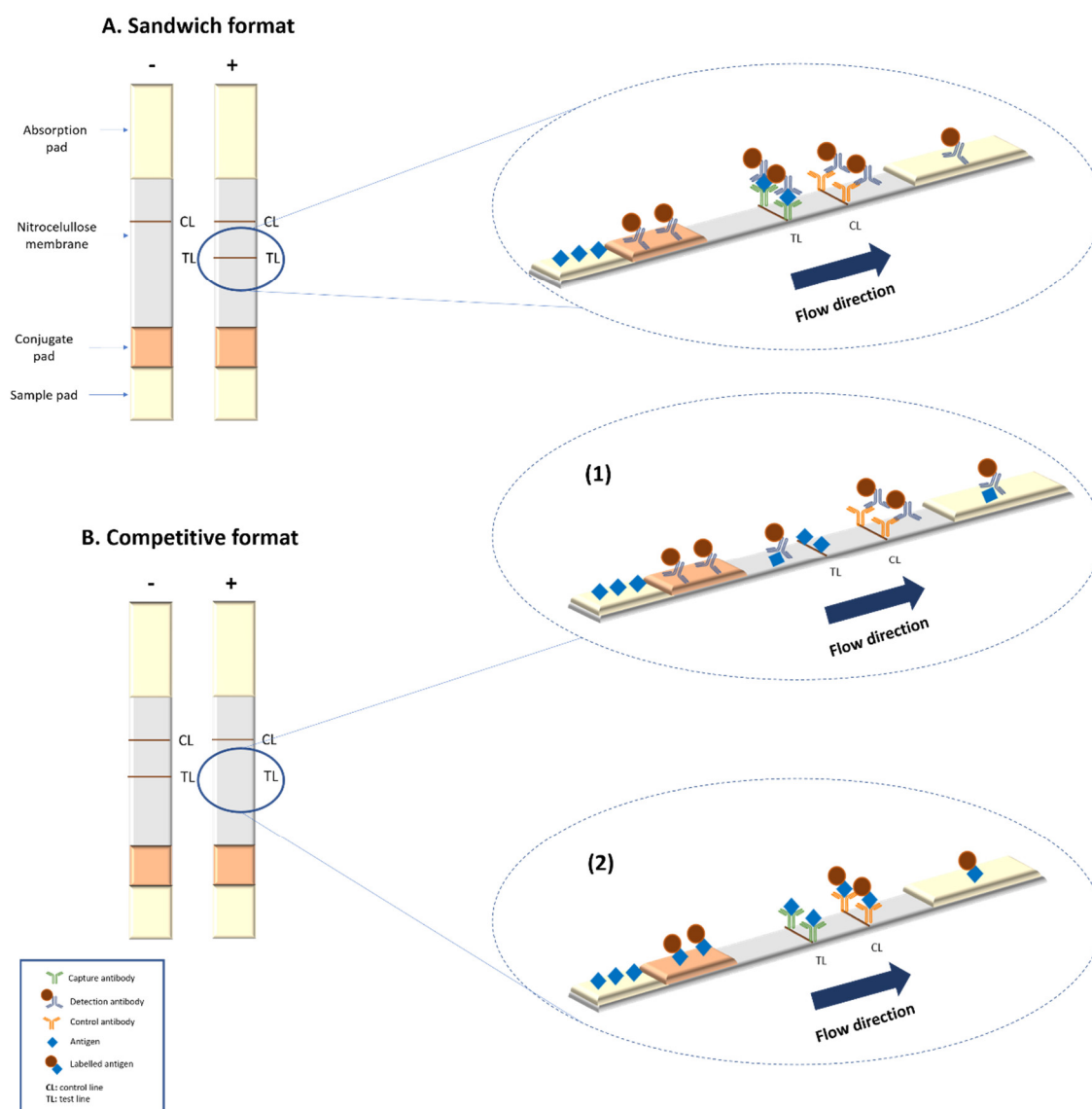
## 1. Introduction

Point-of-care testing (POCT) devices are diagnostic tools for rapid in-field analysis. They should be simple and accessible to unskilled operators at decentralized settings. They can be classified into several categories such as cell phone-based technologies, paper-based diagnostics tools and lab-on-a-chip-based platforms [1]. The blood glucose meter and the pregnancy test are the most popular examples of this technology [2]. In the last decade, research works have focused on improving sensitivity, quantification and multiplexing [3]. Thus, POCT procedures may be applied in a variety of fields such as clinical diagnosis [4], safety [5], agriculture [6], veterinary [7], drugs [8] and contaminants [9].

Lateral flow immunoassays (LFIA) are widely used as POCT due to their rapidity, simplicity, and low cost. This principle combines a chromatographic system with immunochemical reactions for specific and sensitive detection. Traditionally, LFIAs have been used only as qualitative screening tests, with a visual signal for positive/negative test. The outbreak of the coronavirus disease (COVID-19) is the most recent example of the relevance of these devices in rapid screening and monitoring [10].

The test consists of four components: sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane and absorbent pad. All these parts are assembled onto a plastic card to enable the flow and get robustness. The most critical component is the nitrocellulose membrane, where the recognition elements such as antibodies, antigens or nucleotides are immobilized by means of a dispenser. The fluid test sample flows by capillarity, which means that there is no need to use pumps that require energy to run.

Different formats may be adopted in LFIA, with the sandwich format being the most common. In this assay the labelled antibody (detection antibody) forms a complex with the target analyte. These complexes will be captured at the test lines by the capture antibody immobilised on the membrane (Figure 1A). For low molecular weight molecules (e.g., haptens) the competitive format is used, where the absence of signal in the test line indicates the presence of the analyte (Figure 1B).



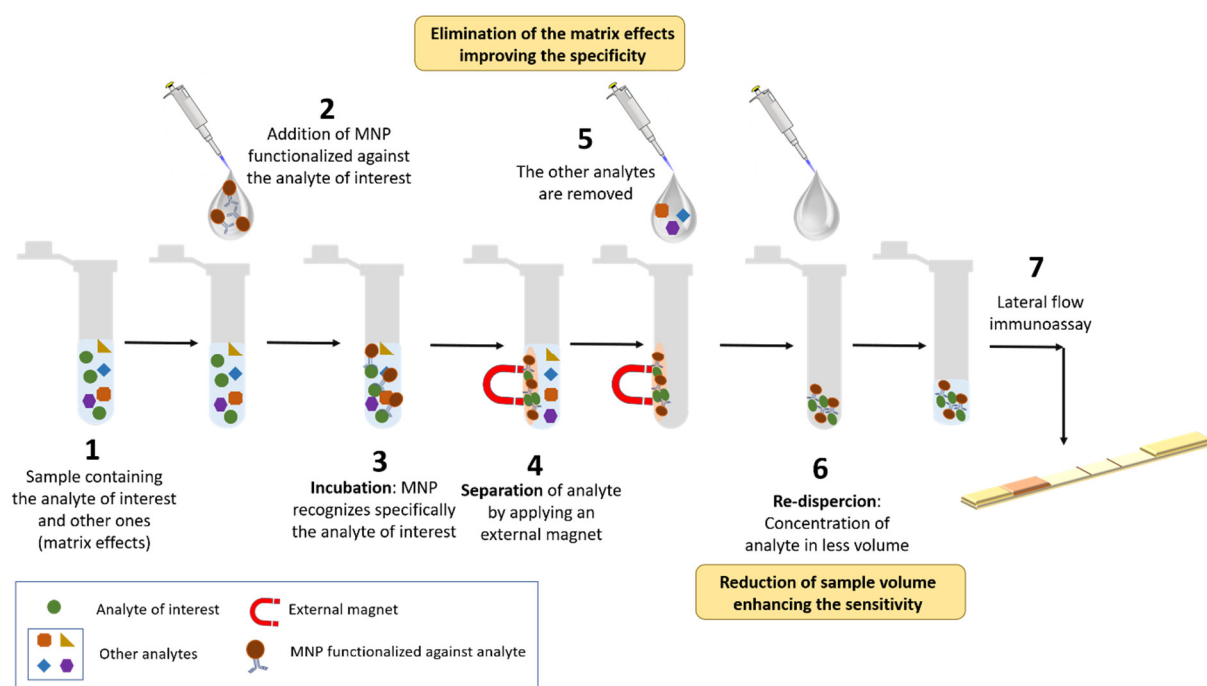
**Figure 1.** Summary of the basic formats of lateral flow assays. **(A)** Scheme of a sandwich format lateral flow immunoassays (LFIA). **(B)** Scheme of a competitive format LFIA: (1) when antigen is immobilized at the test line and labelled antibody is used as detection system; (2) when antibody is immobilized at the test line and labelled antigen is used for detection.

Nanoparticles play an important role as labels for the development of LFIA [11]. Gold nanoparticles (AuNPs) are the most popular labelling system in qualitative analysis. They display an intense red colour due to their localized surface plasmon resonance effects [12]. Latex nanoparticles are also widely employed in commercial LFIA due to their low cost [13]. They provide good performance, but the detection is not as sensitive as those achieved with other systems. Moreover,

the low versatility of the latex nanoparticles prevents the development of further strategies to couple the strips to transducers.

There is a recent interest on quantitative LFIA, with the aim of achieving rapid, cheap and simple tests for biomedical or environmental applications. Limitations such as sensitivity and quantification could be overcome by the use of novel nanoparticle labels. Several nanomaterials have been used for optical, electrochemical and other emerging detection principles such as magnetic systems [11]. Fluorescent nanoparticles, which include quantum dots [14] and up-converting phosphor technologies reporter particles [15], are suitable tags to be detected by optical methods. Carbon nanoparticles [16] or nanotubes [17] have also been used with the same purpose. Colloidal selenium [18], magnetic [19], silver [20], Au@Ag core shell [21] and platinum nanoparticles [22] have been employed to improve the performance of the most traditional optical nanoparticles. Liposomes are promising multilabel systems through the encapsulation of dyes, thus enhance the sensitivity [23].

Magnetic nanoparticles (MNP) are key players for the development of a new generation of biosensors based on LFIA. On one hand, they could be used for quantitative measurements provided that they are coupled with an external reader. On the other hand, enable IMS as well [24], which improves selectivity and sensitivity. To achieve this, MNP have to be functionalized with an active biomolecule which recognizes specifically the analyte of interest. Then, these MNP bioconjugates could be used to bind the analyte and separate it from diluted samples by applying an external magnetic field (a simple magnet could be used for many applications). The analyte-MNP complexes can be subsequently transferred to another solution and concentrated in less volume [25] as demonstrated in Figure 2.



**Figure 2.** Scheme of the immunomagnetic separation (IMS) procedure.

Magnetic LFIA, or magnetic immunochromatographic assays, have been developed in different fields of interest. Despite their promising features, they have not yet been transferred to commercial in-vitro tests. In addition, review papers in this field are still scarce at the literature, probably due to the difficulties inherent to interdisciplinary research. The following sections provide a thorough analysis of the use of magnetic nanoparticles (MNP) in LFIA and their recent applications. We have firstly analysed the type of MNP and their features related to the transducers systems. Then the magnetic principles used at research and commercial devices are described, followed by a collection of the main applications of magnetic LFIA. This work aims to have an impact on the development of novel POCT biosensors based on magnetic LFIA.

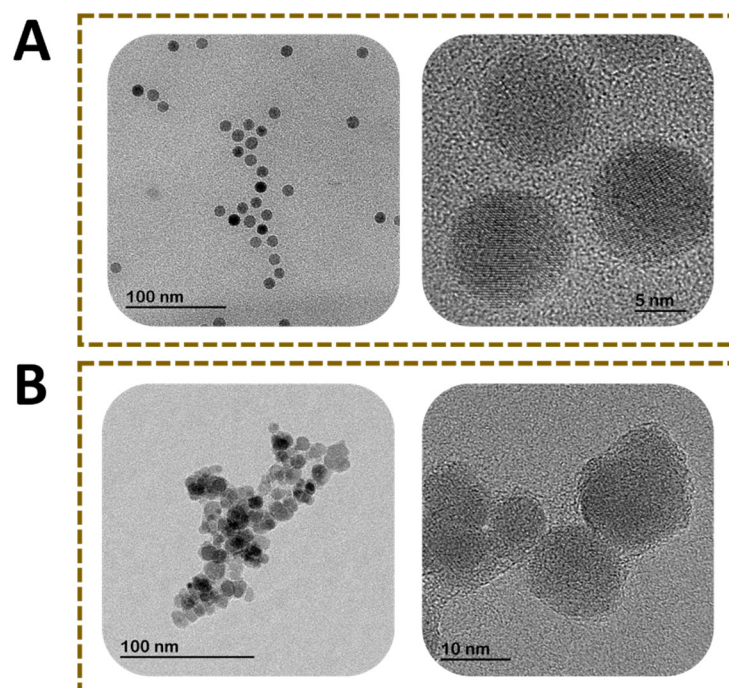
## 2. Magnetic Nanoparticles as Labels in LFIA

The desired final properties of MNP vary depending on the synthesis routes employed. Synthesis protocols may be classified into three main groups: chemical, physical and biological [26]. Chemical synthesis represents 90% of total. The main chemical routes include: coprecipitation, thermal decomposition, hydrothermal, sol-gel, polyol and microemulsion methods. Chemical synthesis can be non-aqueous or aqueous [26,27], the latter being more suitable for subsequent bioconjugation since the bioreagents have to be dispersed in water. In fact, the synthesis procedures are known to affect the outcome of the bioconjugation process, as reviewed elsewhere [28]. Once MNP are prepared, characterization of their physicochemical properties is an essential step for their control and quality [27,28]. The main parameters are shown in Table 1.

**Table 1.** Characterization techniques and their corresponding information obtained for magnetic nanoparticles (MNPs).

Techniques	Characterization Information
Microscopy: Transmission electron microscopy and Scanning electron microscopy	Morphology, size distribution, crystallinity and composition
X-ray diffraction (XRD)	Crystal structure and size
Dynamic light scattering (DLS)	Hydrodynamic size
Infrared spectroscopy (IR)	Nature of surface and functional groups on surface
Zeta potential	Surface charge and stability
Thermal analysis	Concentration and thermal stability
Mass spectroscopy	Concentration
Superconducting quantum interference device (SQUID)/Vibrating sample magnetometry (VSM)	Magnetic properties

In order to use MNPs as label in immunoassays, they need to be stabilized with chemical compounds holding a functional group for covalent reaction with active biomolecules (antibodies, aptamers, nucleic acids). In contrast to gold nanoparticles, the attachment of the biorecognition elements to MNPs by passive adsorption is not feasible. Various coating chemistries are therefore required for bioconjugation. The surface functional groups are a critical parameter that determines the chemical reactions and enables a proper functionalization [29]. Carboxyl-functionalized MNPs are widely used, since they easily bind the amino groups on bioreceptors and form covalent bonds by using the EDC-NHS (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide) chemistry. Other approach involves the coating of MNP with gold nanoparticles. These can be directly attached to biological molecules due to hydrophobic attractions, ionic interactions and dative binding [30]. The magnetic nanoparticles used for lateral flow immunoassay in the literature vary in size (10–400 nm), type of chemical coating and crystal phases. Coatings can be classified into two broad groups depending on their chemical nature: organic and inorganic [31]. These surface layers include hydroxyl, carbohydrate, thiol and phosphonate groups [26]. Magnetite and maghemite are the preferred crystal structures due to their good magnetic response, biocompatibility, facile synthesis and low-cost production [32]. The magnetic nanoparticles for LFIA are usually spherical. Figure 3 shows an example of magnetite nanoparticles. Figure 3A shows dispersed nanoparticles with a perfect spherical morphology, whereas Figure 3B shows polydisperse nanoparticle aggregates with an irregular spherical shape.

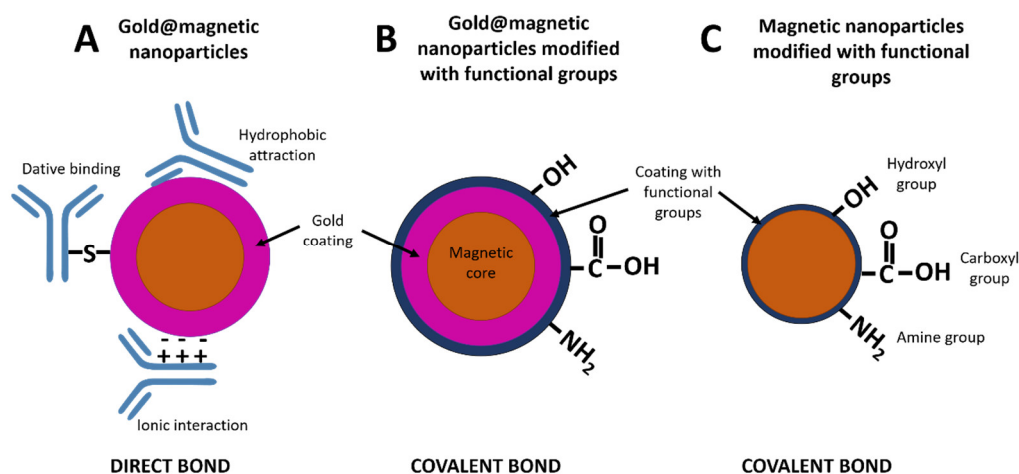


**Figure 3.** Transmission electron microscopy images of magnetite nanoparticles. (A) Monodisperse MNP with spherical shape and (B) polydisperse nanoparticles with irregular spherical shape.

The optimal type of magnetic nanoparticles depends on the final applications and the magnetic transducing principle. The different parameter related to MNP (size, crystallinity, dispersity, magnetic properties and coating) can be controlled by the synthesis procedure.

In recent years, the interest for the use of nanocomposites or core/shell nanoparticles has increased significantly. This kind of nanocomposites could synergistically combine the advantages of both nanoparticles [33].  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$  core/shell nanoparticles have been used in lateral flow immunoassay to improve the sensitivity of the assay. Gold nanoparticles can be attached to biomolecules directly, and the test line shows intense red colour. In addition, the magnetic core allows easy separation using a magnet. For this reason,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$  core/shell nanoparticles have been widely reported in lateral flow immunoassay as label to detect different analytes [34–37].

Figure 4 shows a scheme of core/shell nanoparticles and different strategies to conjugate biorecognition elements. Gold nanoparticles are attached directly to proteins through i) hydrophobic attractions between the protein and the metal surface, ii) ionic interactions between the negatively charged nanoparticle and the positively charged sites on the protein and iii) dative binding between the metal and the conducting electrons of nitrogen and sulphur atoms of the protein (Figure 4A) [38]. In addition, gold coating could be modified with functional groups (such as hydroxyl, amine or carboxyl) to establish a covalent bond with proteins. In this case, functional groups have to be activated on the nanoparticle surface in order to attach biomolecules (Figure 4B). In contrast, MNPs have to be modified with functional groups first to enable the binding of the proteins to the particle (Figure 4C).



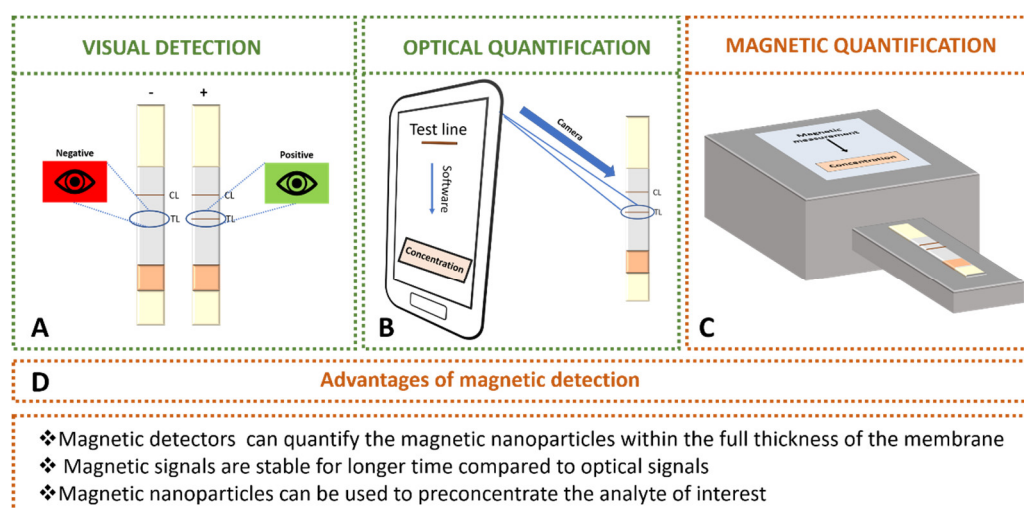
**Figure 4.** Schematic representation of direct bond between gold@magnetic nanoparticles and proteins (A), covalent bond between gold@magnetic nanoparticles and proteins (B) and covalent bond between functionalized magnetic nanoparticles and proteins (C).

### 3. Detection of Magnetic Nanoparticles Used as Labels in LFIA

#### 3.1. Optical Transduction

Magnetic nanoparticles can be detected at the test line in LFIA by means of optical techniques (Figure 5). MNP have a molar absorption coefficient comparable with colloidal gold in the visible range [19]. For this reason, the magnetic nanoparticles are used as colorimetric labels in lateral flow immunoassays, showing a dark brown colour easily distinguishable on white nitrocellulose membranes. The optical density signal displayed by magnetic nanoparticles can be observed by naked eye (Figure 5A) or by the use of optical commercial readers and smartphones [39]. Magnetic nanoparticles aggregates have been used in order to decrease the detection limit thanks to the controlled agglomeration with poly-L-lysine [19]. The limit of detection achieved for aggregates is almost 40-fold lower than the values achieved with single dispersed magnetic nanoparticles. Yan *et al.* [40] have reported other advantageous strategy to enhance the optical signal (reflectance) based on the generation of magnetic network complex by means of secondary antibodies.

Mobile phones and home-scanners have been integrated to LFIA as decentralized diagnostic tools (Figure 5B). Their simplicity and affordability make them not only a perfect candidate for devices in developing countries [41], but also an easy-to-use tool for patients requiring regular controls that may eventually reduce costs to the National Health systems. Moreover, some manufacturers provide special software, such as Novarum© or Halomic© to process strips. Applications for phone devices can provide analytical parameters for rapid tests and in simple way even in field conditions [42]. Several approaches have been reported in order to improve the limits of detection [43,44]. Ruppert *et al.* [43] have designed a statistical software which includes the colorimetric readout of test strip and tools for background and baseline correction. Saisin *et al.* [44] have optimized the camera exposure time in order to improve the sensitivity and limit of detection. They achieved enhancements up to 3-fold and 5-fold, respectively. In addition, numerous optical readers have been commercialized by several companies: Detekt Biomedical (Austin, TX, USA), Qiagen (Hilden, Germany), Axxin Inc. (Fairfield, Australia), LRE medical (Nordlingen, Germany), Abbott (Libertyville, IL, USA), Optricon (Berlin, Germany), Skannex (Oslo, Norway) and BD Company (Franklin Lakes, NJ, USA).



**Figure 5.** Detection of magnetic nanoparticles used as labels in LFIA: (A) visual detection by naked eye. (B) Optical detection using smartphone with special software. (C) Magnetic quantification using magnetic transduction. (D) Advantages of magnetic detection over optical detection.

### 3.2. Magnetic Transduction

Magnetic detection offers several advantages over optical detection. Optical detectors only record the intensity of colour from the top layer of the membrane. However, magnetic detectors can quantify the magnetic nanoparticles within the full thickness of the membrane. In addition, the magnetic signals are stable for longer time than optical signals, and magnetic nanoparticles can be used to preconcentrate the analyte of interest.

Up to now, several methods to quantify magnetic nanoparticles at the detection zones in LFIA have been described in the literature. They are based on different physicochemical transducing principles which can be divided into two groups: magnetoresistive readers and inductive readers. Some of them are commercially available and others have been developed by academic research groups with the aim of improving the analytical characteristics or portability requirements. The different types of nanoparticles used for each transducing principle are shown in Table 1. In order to select the optimal nanoparticles, several parameters must be taken into account. The size depends on the specific applications and the transducing principle, as shown in Table 2. EDC-NHS chemistry was used for bioconjugation in all the cited works.

**Table 2.** Type of magnetic nanoparticles used for each magnetic transducing principle.

Transducing Principle	Nanoparticles	References
Magnetoresistive LFIA readers	Superparamagnetic nanoparticles	[45]
	Superparamagnetic maghemite nanoparticles	[46]
	Beads of 440 nm in diameter	[47]
	Superparamagnetic Maghemite nanoparticles (200 nm)	[48]
	Magnetic beads of 200 nm	[49]
	Superparamagnetic nanoparticles (10.5 nm)	[50]
	Superparamagnetic nanoparticles (80 nm)	[51]
	Superparamagnetic nanoparticles (80 nm)	[52]
	Superparamagnetic nanoparticles encapsulated in microspheres (198 nm)	[53]
	Paramagnetic particles (760 nm)	[54]
Inductive LFIA readers	Superparamagnetic nanoparticles (50 nm)	[55]
	Superparamagnetic nanoparticles encapsulated in microspheres (198 nm)	[56]
	Magnetic nanobeads (15, 80 and 200 nm)	[57]
	Superparamagnetic nanoparticles (140 nm)	[58]
	Superparamagnetic nanoparticles (15 nm)	[59]
	Superparamagnetic nanoparticles (140 nm)	[60]

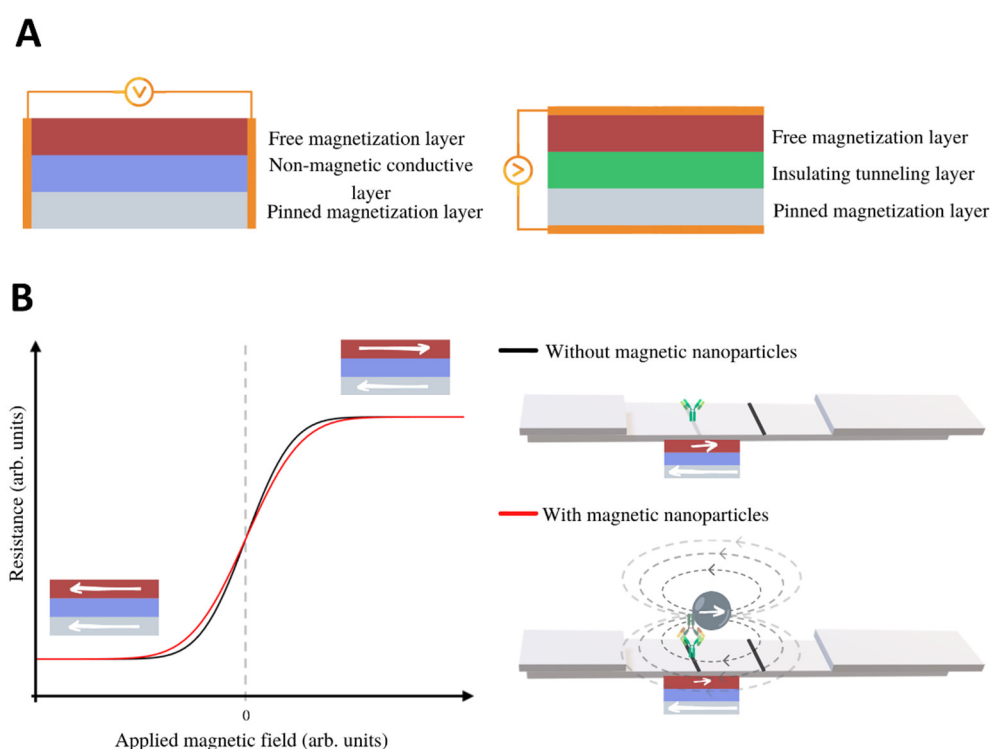


Colorimetric-Fluorescent-Magnetic nanospheres (300 nm)	[61]
Superparamagnetic nanoparticles (10 nm)	[62]
Superparamagnetic nanoparticles (200 nm)	[63]
Superparamagnetic nanoparticles (10.5 nm)	[64]
Superparamagnetic magnetite nanoparticles	[65]

### 3.2.1. Magnetoresistive LFIA Readers

Magnetoresistance (MR) is the dependence of the electrical resistivity on the applied magnetic field. Sensors based on this principle have been adapted to the dimensions of LFIA to detect the stray field fringes that the magnetic labels produce [45]. After calibration, the change in the sensor electrical resistance provides a measure of the number of particles, and consequently, the number of analytes immobilized at the strip test or control line.

Magnetoresistive sensors for biodetection are based on Giant MR (GMR) or Tunnel MR (TMR). GMR and TMR devices have an underlying common structure, namely, two ferromagnetic metal films separated by a non-magnetic film. The difference between the structures of these devices is in the non-magnetic spacer, which can be conductive (GMR) or insulating (TMR) (Figure 6A) [52]. The electrical resistance depends on the relative angle between the magnetization of the two ferromagnetic layers. When they are magnetized parallel, the resistance is small, and it increases for antiparallel alignment.



**Figure 6.** (A) Schemes of a Giant Magnetoresistance (GMR) sensor (left), and a Tunnel Magnetoresistance (TMR) sensor (right). (B) Scheme of the resistance of the MR sensor as a function of the applied field (black line). The MNP's magnetic moments align in the direction of the applied field, and their solenoidal magnetostatic field reduces the magnetization of the free layer (the magnetic field lines are represented as grey dashed lines.) In consequence, if the applied field is positive, the resistance of the sensor decreases, and if it is negative, the resistance increases (red line).

In GMR, the multilayers can be engineered to have parallel/antiparallel alignment in the absence of field so that the resistance is low/high [66]. Frequently, one of the layers has a pinned or fixed magnetization (meaning that it is hard to revert, either because it is a hard ferromagnet, a field-cooled antiferromagnet or because it is magnetically pinned by an additional layer.) Then, the applied field

tends to modify the magnetization of the free layer, so modifying the resistance (see the black line in the graph of Figure 6B). Typically, the relative change of resistance is on the order of 5–10%. There are different types of GMR structures, depending on the non-magnetic conducting spacer and the type of magnetic layers, such as antiferromagnetic superlattices, spin valves or pseudo-spin valves.

Some research groups have developed models adapted of GMR sensors for magnetic LFIA that show an excellent potential sensitivity and spatial resolution [45,46]. The basic idea of this detection is schematized in Figure 6B: When the LFIA is placed on top of the free layer of the sensor, and the magnetic nanoreporters are magnetized by the applied field, they produce below a magnetostatic field (whose field lines are represented by dashed grey lines) that effectively decreases the magnetic field in the free layer. In consequence, the MR response in the presence of the LFIA is given by the red line in Figure 6B. Taton *et al.* [47] achieved detection of only 12 pg/mL of interferon gamma (IFN $\gamma$ ), a result that is comparable to enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Serrate *et al.* [48] have reported a limit of detection for human chorionic gonadotropin hormone that is below the visual inspection limit (5.5 ng/mL). Ryu *et al.* [49] detected down to 0.01 ng/mL of the cardiac biomarker troponin I by reading out magnetic LFIA with a GMR sensor. Chicharro *et al.* [50] have developed a novel technique and detection architecture that include spin valves sensors, which present high sensitivity to the localized magnetic field in a single direction. It allows real-time measurements of flowing nanoparticles along the membrane, and can be used for dynamic quantification of analytes flowing through lateral flow strips [51].

In TMR (or magnetic tunnel junction MTJ) structures, the non-magnetic spacer is an electrical insulator, so thin that the electrons can tunnel through it. The tunnel crossing is more probable when both magnetizations are parallel. Then, also in this case, the applied field that produces alignment reduces the resistance. The magnetoresistance in TMR can be 5–10 times that of GMR, and the temperature drift and aging are smaller. Although they can be more sensitive, the Flicker noise coming from resistance fluctuations in TMR sensors can be larger. The literature of TMR application to LFIA reading is still scarce. Nevertheless, Lei *et al.* [52] have reported promising results on human chorionic gonadotropin hormone quantification.

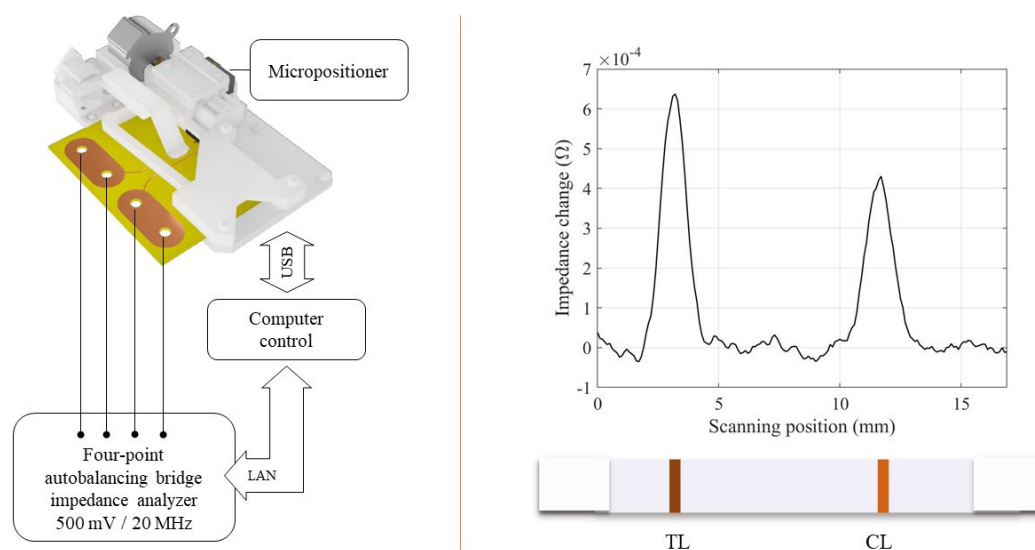
### 3.2.2. Inductive Readers

The magnetic sensors based on Faraday electromagnetic induction can also be used for magnetic LFIA reading. Briefly, the magnetic nanolabels are excited by an alternating magnetic field and, in turn, produce a stray magnetic field that is captured by a pick-up coil. Depending on the design, the signal is proportional to a change of self-inductance, impedance or resonance frequency of the pick-up coil. Different solutions are proposed that differ in the geometry and shape of the coils, the connection of several coils or combination of exciting frequencies [53,67].

This technology allowed Barnett *et al.* [54] to quantify prostate specific antigen (PSA) with a LOD of 0.8 ng/mL, and Nikitin *et al.* [55] to quantify small molecules such as fluorescein, biotin and chloramphenicol. Orlov *et al.* [56] extended the system to multiplex detection by the use of multiple pick-up coils wound around the different test lines; they simultaneously detected Botulinum Neurotoxins A, B and E in liquid samples with a LOD around 0.2 ng/mL. Among the commercial magnetic readers, the device of MagnaBioSciences (LLC, CA, USA) is most widely used in research articles, according to the number of papers.[68]. This desktop device excites the particles with a C-shaped magnet, and the signal is picked up by an array of thin-film coils. It has been used, for example, for reading out LFIA for quantification of tumour markers or pathogens [57–61]. Gas *et al.* [63] have used Magnisense portable device [62] for quantification of marine toxic algae with LOD of  $5 \times 10^4$  cells/mL.

Our group has developed a portable inductive sensor that scans the LFIA strip and measures the change of impedance produced by the initial magnetic permeability of the particles at radio frequency (Figure 7). In particles below the critical volume for superparamagnetic behaviour, the thermal energy has an enormous influence on the magnetization orientation. At radio frequencies, these nanoparticles are magnetically very susceptible, which can be used for their inductive detection, even without any externally applied field [69,70]. This fact reduces the complexity and size of the

overall device. Mechanical positioning is done by a PLA 3D-printed micro-positioner to avoid the use of any metallic moving parts that may induce artefacts in the measurement. We have applied this technique to the quantification of PSA in the clinical range of interest [64] and histamine directly in red wine [65].



**Figure 7.** Left: Scheme of the scanning inductive reader for magnetic LFIA. Right: Signal recorded for histamine competitive LFIA (blank sample, competitive immunoassay).

## 4. Fields of Application

### 4.1. Conventional Magnetic LFIA for Analyte Detection

Magnetic LFIA have been used extensively in different fields: biomedicine, food, environmental control and drug monitoring. Regarding the agri-food sector, pathogen microorganisms (bacteria and virus), toxins and other hazardous molecules have been controlled and detected by magnetic LFIA. For clinical analysis, proteins, cells and nucleic acids have been used in order to detect biomarkers, as well as hormones. In addition, the monitoring of drugs such as cocaine has been performed by means of LFIA employing magnetic nanoparticles as labels. Table 3 and Table 4 summarize the latest magnetic LFIA reported with optical and magnetic detection, respectively.

**Table 3.** Most recent Magnetic LFIA with optical detection.

Nanoparticles	Conjugation	Detection	Analyte	Limit of Detection	Reference
<b>Pathogens</b>					
Gold magnetic nanoparticles	Via Au–S bonds	Visual detection	<i>Salmonella choleraesuis</i>	5 × 10 <sup>5</sup> CFU/mL	[37]
Gold magnetic nanoparticles	Via Au–S bonds	Colour intensity. ImageJ density analysis	<i>Salmonella</i>	10 <sup>3</sup> CFU/mL	[30]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Colour intensity. TotalLab TL120	Potato virus X	0.5 ng/mL	[71]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Colour intensity. TotalLab TL120	Potato virus X	0.25 ng/mL	[25]
Gold magnetic nanoparticles	Via Au–S bonds	Visual detection	Avian influenza virus subtype H7 (AIV H7)	10 <sup>3.5</sup> EID <sub>50</sub>	[33]
<b>Toxins and allergens</b>					
Gold magnetic nanoparticles	Via Au–S bonds	Visual detection	β-Conglutin	8 fM	[35]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Visual detection	Melamine	0.4 ppm for Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PEG 2.2 ppm for Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PEG	[72]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Visual detection	Furazolidone metabolite of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	0.044 ng/mL	[40]
<b>Biomarkers</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC chemistry	Visual detection	Carcinoembryonic antigen (CEA)	0.25 ng/mL	[73]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Reflectance measurements. ESE Quant LR3 (Qiagen Inc., Germany)	Extracellular vesicles (EVs)	10 <sup>7</sup> EVs/mL	[74]
Gold magnetic nanoparticles	EDC chemistry	Visual detection	Genotyping of MTHFR C677T	5 ng	[75]
Gold magnetic nanoparticles	CTAB-PSS modification (direct bonds)	Visual detection	Genotype Apolipoprotein E	10 ng	[76]
Gold magnetic nanoparticles	EDC chemistry	Visual detection	IgM class antibodies related infections	-	[77]
Magnetic nanoparticles	Periodate-based oxidation of the glycosylated Fc residues	Colour intensity. ImageJ density analysis	Human chorionic gonadotropin (hCG)	0.31 ng/mL	[78]
<b>Drugs</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Smart phone camera was used for quantitative analysis	Cocaine	5 ng/mL	[39]

Table 4. Most recent Magnetic LFIA with magnetic detection.

Nanoparticles	Conjugation	Detection	Analyte	Limit of Detection	Reference
<b>Pathogens</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	$4.73 \times 10^3$ CFU/mL	[60]
Colorimetric-Fluorescent-Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA) Fibre optic spectrometer	<i>Salmonella typhimurium</i>	$1.88 \times 10^4$ CFU/mL: naked detection $3.75 \times 10^3$ CFU/mL: magnetic and fluorescent detection	[61]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Reader Miateks (Magnisense)	<i>Alexandrium minutum</i>	$10^5$ cells/L	[63]
<b>Toxins and allergens</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Magnetic particle quantification (MPQ) method	Botulinum neurotoxin (BoNT) types A, B and E	0.22 ng/mL for BoNT-A 0.11 ng/mL for BoNT-B 0.32 ng/mL for BoNT-E	[56]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Novel sensor developed by authors Reflectance measurements. ESE Quant LR3 (Qiagen Inc., Germany)	Histamine	1.2 mg/L for magnetic sensor 1.5 mg/L for optical reader	[65]
<b>Biomarkers</b>					
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4)	0.38 IU/mL	[59]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Novel sensor developed by authors Reflectance measurements. ESE Quant LR3 (Qiagen Inc., Germany)	Prostate-Specific Antigen	0.25 ng/mL	[64]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Neuron specific enolase (NSE) carcinoembryonic antigen (CEA).	0.094 ng/mL for NSE 0.045 ng/mL for CEA	[57]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Magnetic particle quantification (MPQ) method	Thyroxine	20 fM	[79]
Magnetic nanoparticles	EDC Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP)	100 pg/mL	[80]
Gold magnetic nanoparticles	EDC Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Single nucleotide polymorphisms (SNPs)	0.04 pg/ $\mu$ L with plasmid	[36]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MIR system developed by authors	Troponin I (cTnI) Creatine kinase isoenzyme MB (CKMB) Myoglobin (Myo)	0.0089 ng/mL for cTnI 0.063 ng/mL for CKMB 0.05 ng/mL for Myo	[81]

Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	Unconjugated estriol (uE3)	0.86 nmol/L	[82]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	MAR system (MagnaBioSciences, CA, USA)	D-dimer	0.05 µg/mL	[83]
Gold magnetic nanoparticles	-	Magnetic quantitative immunoanalyzer	C-reactive protein (CRP)	0.15 mg/mL	[34]

Sandwich and competitive LFIAs are the most common formats. Tables 3, 4 and 5 show several competitive LFIA for detection of molecules of interest in different fields: melamine [72], furazolidone metabolite of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) [40], cocaine [39], histamine [65], thyroxine [79], unconjugated estriol (uE<sub>3</sub>) [82] and aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) [84]. In all cases, the competitive assays have been developed for small molecules. However, sandwich format is more suitable for larger mean size analytes such as proteins, virus or bacteria. The limits of detection for both formats are comparable, which implies that this parameter is independent of immunoassay structure. Hwang *et al.* [30] have reported a magnetic LFIA based on unconventional format. The test line was formed by pressing the nitrocellulose membrane to decrease its thickness instead of immobilizing specific antibodies against bacteria, as it is done at the conventional procedure. The free gold/magnetic nanoparticles passed through the pore until they reached the pressed test line. However, *Salmonella*-gold/magnetic nanoparticles complexes remained in the solution because they were too large to flow along the membrane. The flow of free gold/magnetic nanoparticles was blocked at the test line displaying the colour on spot, which was inversely proportional to the bacteria concentration.

**Table 5.** Other detection and magnetic nanoparticles used for immunomagnetic separation.

Nanoparticles	Conjugation	Detection	Analyte	Limit of Detection	Reference
Magnetic nanoparticles	Glutaraldehyde chemistry	Visual detection	<i>Campylobacter jejuni</i>	10 <sup>0</sup> with pure culture 10 <sup>1</sup> with poultry samples	[24]
Magnetic nanoparticles	Biotin-streptavidin affinity	Visual detection	<i>Listeria monocytogenes</i>	3.5 × 10 <sup>3</sup> CFU/mL for standards 3.5 × 10 <sup>4</sup> CFU/g in real samples	[85]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Electrochemical detection. Glucose meter	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	6.2 × 10 <sup>4</sup> CFU/mL	[86]
Gold magnetic nanoparticles	Via Au-S bonds	Visual detection	<i>Escherichia coli O157:H7</i> and <i>Salmonella typhimurium</i>	23 CFU/mL for <i>E. coli</i> 17 CFU/mL for <i>Salmonella</i>	[87]
Magnetic nanoparticles	Glutaraldehyde chemistry	Visual detection.	<i>Enterobacter cloacae</i>	10 <sup>2</sup> CFU/mL	[88]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Fluorescent detection	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 <sup>4</sup> CFU/mL	[89]
Fluorescent magnetic nanoparticles	EDC chemistry	Fluorescent detection. Fluorescent strip reader (Suzhou Hemai Precision Instrument Co., Ltd. Jiangsu, China).	Aflatoxin B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> )	3 pg/mL in sauce extract 51 pg/mL in real dark soy sauce	[84]
Magnetic nanoparticles	EDC/NHS Chemistry	Electrochemical detection. Glucose meter	Phospho-p53 <sup>15</sup>	50 pg/mL	[90]



The limit of detection reported for both systems, optical and magnetic, are similar, thus there are not significant differences when comparing similar type of analytes. However, the possibilities for MNPs combined with preconcentration steps have not yet been fully explored. The detection ranges for bacteria obtained are from  $10^3$  to  $10^5$  CFU/mL. For virus, it was possible to quantify levels as low as ng/mL [71] getting optical enhancement by means of double strategy based on (i) aggregation of magnetic nanoparticles with gold nanoparticles by biotin-streptavidin interactions, and (ii) preconcentration with a magnetic field [25]. The detectable concentration for other analytes is also in the nanogram per mL range for both optical and magnetic detection, although in some case concentrations lower than nanograms have been reached for magnetic-LFIA [36,80].

It is worth remarking that gold-magnetic nanoparticles have been reported widely as alternative nanocomposite. Their use does not affect negatively to the limit of detection and they combine optical and magnetic transduction with an easy conjugation to biomolecules. In addition, they can be used for IMS.

Regarding the crystal structure of magnetic nanoparticles, magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) has been the preferred option in order to develop LFIA. Li *et al.* [83] have used  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  instead of magnetite in order to achieve stronger magnetization. They hypothesized that the hybridization of iron and manganese atoms increased the spin magnetic moment between them, resulting in a higher total magnetic moment for the nanoparticle. Carboxyl groups on the MNP surface are the preferred functional groups for the development of LFIA, as shown in Tables 3, 4 and 5.

#### 4.2. Immunomagnetic Separation in Combination with Other Transduction Systems

Tables 3 and 4 show that magnetic nanoparticles have mainly been used as reporters, but they can also be used for IMS, which would lower the limit of detection in comparison with a standard LFIA. A strategy to preconcentrate the analyte from matrix or/and locate it in the detection zone (test line for LFIA) with an external magnetic field has been reported, showing the capacity to decrease the lowest detectable concentration [78]. In some applications, magnetic nanoparticles have been used to perform a double function simultaneously: separation and label for optical detection [25,35,78]. In other cases, gold and fluorescent nanoparticles have been employed in combination with magnetic nanoparticles in order to use optical nanoparticles for the transduction and magnetic nanoparticles for the IMS [85,88,89]. Nanocomposites combining magnetic nanoparticles with gold or fluorescent nanomaterials have also been reported to get the same double function [84,87]. This approach has enabled the detection of  $10^0$  CFU/mL for bacteria [24] and biomarkers in picogram range [36,84].

MNP have been used for IMS in combination with other detection systems to improve sensitivity (visual, electrochemical and fluorescent), as shown in Table 5. Poonlapdech *et al.* [24] preconcentrated *Campylobacter jejuni* present in poultry samples by IMS for subsequent DNA extraction and nucleic acid detection by LFIA. Li *et al.* [85] employed a similar procedure for detection of *Listeria monocytogenes* in lettuce samples. In addition, IMS as previous pretreatment to fluorescent LFI was employed to detect *Listeria monocytogenes* [89]. Nanocomposites containing magnetic and fluorescent nanoparticles were developed to combine IMS with fluorescence detection of toxins [84]. IMS combined with colloidal gold-based LFIA for detection of *Enterobacter cloacae* enhanced the sensitivity in comparison with conventional LFIA [88]. Other strategy that combine gold nanoparticles based LFIA with magnetic gold nanostructure for bacteria detection was developed [87]. In this case, magnetic nanostructures were used to locate the analyte at the detection zone by means of external magnet, in order to increase the reaction time for the immunoassay. The authors have also employed enzymes conjugated to gold nanoparticles to enable an extra-colour change and enhance the sensitivity.

Electrochemical transductions have been reported coupled to magnetic LFIA by means of personal blood glucose meters, which are widely used as point of care devices for people with diabetes. *Escherichia coli* was quantified by using these personal glucometers [86]. The strategy is based on the use of magnetic nanoparticles attached to invertase and antibodies against *E. coli* in order to carry out both electrochemical transduction and IMS. A different approach using these

devices to quantify a biomarker of gamma-radiation exposure has recently been reported [90]. In this case, magnetic nanoparticles functionalized with specific antibodies have been used to locate the analyte in the test line with the help of a magnet. Then glucose-encapsulating liposomes were used as labels for electrochemical detection. The limit of detection obtained by personal glucose meters (Table 5) are comparable with other detection methods described previously.

Table 6 shows the limit of detection improvements by combining the detection principle with IMS.

**Table 6.** Limit of detection improvements using IMS.

Analyte	Limit of Detection Using LFIA	Limit of Detection Using LFIA in Combination with IMS	References
<b>Gold nanoparticles as label</b>			
<i>Campylobacter jejuni</i>	10 <sup>5</sup> cfu/mL for gold nanoparticles (pure culture)	10 <sup>0</sup> cfu/mL (pure culture)	[24,91,92]
	10 <sup>4</sup> cfu/mL for quantum dots (pure culture)	10 <sup>1</sup> cfu/mL (poultry sample)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	10 <sup>4</sup> cfu/mL for superparamagnetic nanoparticles	3.5 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL (buffer)	[58,85,93]
	3.7 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL for gold nanoparticles	3.5 × 10 <sup>4</sup> cfu/g (lettuce samples)	
<i>E. coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella typhimurium</i>	<i>E. coli</i> O157:H7		[87,94,95]
	10 <sup>5</sup> cfu/mL for gold nanoparticles	23 CFU/mL for <i>E. coli</i>	
	10 <sup>4</sup> cfu/mL for fluorescent microspheres	17 CFU/mL for <i>Salmonella</i>	
<i>Potato virus X</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>		[25]
	0.25 ng/mL for combination of magnetic nanoparticles with gold nanoparticles	8 ng/mL	
<i>Enterobacter cloacae</i>	10 <sup>3</sup> cfu/mL for gold nanoparticles	10 <sup>2</sup> cfu/mL	[88]
$\beta$ -conglutin	5 nM for gold nanoparticles	8 fM	[35]
<b>Fluorescent nanoparticles</b>			
Aflatoxin B1	10 $\mu$ g/mL for gold nanoparticles	3 pg/mL in sauce extract	[84,96,97]
	0.1 ng/mL for silver@gold nanoparticles	51 pg/mL in real dark soy sauce	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.7 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL for gold nanoparticles	10 <sup>4</sup> CFU/mL	[89,93]
<b>Electrochemical detection</b>			
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	10 <sup>5</sup> cfu/mL for gold nanoparticles	6.2 × 10 <sup>4</sup> CFU/mL	[86,95]
	10 <sup>4</sup> cfu/mL for fluorescent microspheres		

## 5. Conclusions

The development of LFIA using magnetic nanoparticles has emerged as a research field of great interest in the past five years. Magnetic-LFIA would enable POCT instruments to detect biomarkers, pathogens, toxins, allergens and drugs. At present, there are different magnetic transducers under research that could be coupled to LFIA. Some commercial readers, based on magnetic and optical transduction, are also available.

The control on the properties of the nanoparticles used is crucial for the development of the applications. Gold-magnetic core-shell nanoparticles have been employed as alternative to conventional nanoparticles in order to combine the properties of both materials. Nanocomposites with both materials have attracted a lot of interest to combine both the superparamagnetism of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and the surface chemistry of Au component. This enables an easy functionalization in addition to a simple separation. Although MNP are mainly used as labels, they can be employed for IMS as well, either as a previous step to LFIA or to concentrate the analyte at the detection zone. The most common functional group use to functionalize MNP is carboxyl group, which allows an easy conjugation to biomolecules with amine groups by carbodiimide chemistry. The magnetic nanoparticles sizes reported vary from 10 nm to 400 nm and magnetite has been the most employed crystalline structure.

The analysis of the literature reported in this review indicates that magnetic LFIA with quantitative capability are a suitable alternative to develop quantitative biosensors for a wide range of applications.

**Author Contributions:** Writing—original draft preparation, A.M., M.C.B-L. and M.R.; writing—review and editing, A.M., M.C.B-L., M.R., E.S-P., M.S. and J.C.M-G; funding acquisition, M.C.B-L. and M.R.; supervision, M.C.B-L. and M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported in part by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under projects MAT2017-84959-C2-1-R and the Principality of Asturias (Spain) under project IDI/2018/000185. Amanda Moyano was supported by a “Severo Ochoa” fellowship (Consejería de Educación y Cultura del Gobierno del Principado de Asturias, grant BP17-152).

**Acknowledgments:** Some figures were created using BioRender.com.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Vashist, S.K.; Lippa, P.B.; Yeo, L.Y.; Ozcan, A.; Luong, J.H.T. Emerging Technologies for Next-Generation Point-of-Care Testing. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 692–705.
2. Klonoff, D.C. Point-of-care blood glucose meter accuracy in the hospital setting. *Diabetes Spectr.* **2014**, *27*, 174–179.
3. Dincer, C.; Bruch, R.; Kling, A.; Dittrich, P.S.; Urban, G.A. Multiplexed Point-of-Care Testing—xPOCT. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 728–742.
4. Yager, P.; Domingo, G.J.; Gerdes, J. Point-of-Care Diagnostics for Global Health. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2008**, *10*, 107–144.
5. Choi, J.R.; Yong, K.W.; Choi, J.Y.; Cowie, A.C. Emerging point-of-care technologies for food safety analysis. *Sensors* **2019**, *19*, 1–31.
6. Lau, H.Y.; Botella, J.R. Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–14.
7. Cummins, B.M.; Ligler, F.S.; Walker, G.M. Point-of-care diagnostics for niche applications. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 161–176.
8. Luzzi, V. Point of Care Devices for Drugs of Abuse Testing, 2nd ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2019; ISBN 9780128156070.
9. Mandal, N.; Mitra, S.; Bandyopadhyay, D. Paper-Sensors for Point-of-Care Monitoring of Drinking Water Quality. *IEEE Sens. J.* **2019**, *19*, 7936–7941.
10. Li, Z.; Yi, Y.; Luo, X.; Xiong, N.; Liu, Y.; Li, S.; Sun, R.; Wang, Y.; Hu, B.; Chen, W.; et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J. Med. Virol.* **2020**.
11. Quesada-González, D.; Merkoçi, A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *73*, 47–63.
12. Petrakova, A.V.; Urusov, A.E.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Gold nanoparticles of different shape for bicolor lateral flow test. *Anal. Biochem.* **2019**, *568*, 7–13.
13. Available online: <https://www.expdeon.com/resources/applications/lateral-flow-immunoassay/> (accessed on 5 February 2020).
14. Sotnikov, D.V.; Barshevskaya, L.V.; Zherdev, A. V applied sciences Immunochromatographic System for Serodiagnostics of Cattle Brucellosis Using Gold Nanoparticles and Signal Amplification with Quantum Dots. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 738.
15. Yang, X.; Liu, L.; Hao, Q.; Zou, D.; Zhang, X.; Zhang, L.; Li, H.; Qiao, Y.; Zhao, H.; Zhou, L. Development and evaluation of Up-Converting phosphor technology-based lateral flow assay for quantitative detection of NT-proBNP in blood. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–13.
16. Aktas, G.B.; Wichers, J.H.; Skouridou, V.; van Amerongen, A.; Masip, L. Nucleic acid lateral flow assays using a conjugate of a DNA binding protein and carbon nanoparticles. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 426.
17. Qiu, W.; Baryeh, K.; Takalkar, S.; Chen, W.; Liu, G. Carbon nanotube-based lateral flow immunoassay for ultrasensitive detection of proteins: Application to the determination of IgG. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 436.
18. Wang, Z.; Jing, J.; Ren, Y.; Guo, Y.; Tao, N.; Zhou, Q.; Zhang, H.; Ma, Y.; Wang, Y. Preparation and application of selenium nanoparticles in a lateral flow immunoassay for clenbuterol detection. *Mater. Lett.* **2019**, *234*, 212–215.

19. Liu, C.; Jia, Q.; Yang, C.; Qiao, R.; Jing, L.; Wang, L.; Xu, C.; Gao, M. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle aggregates as color reagents. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6778–6784.
20. Rodríguez, M.O.; Covián, L.B.; García, A.C.; Blanco-López, M.C. Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays. *Talanta* **2016**, *148*, 272–278.
21. Blanco-Covián, L.; Montes-García, V.; Girard, A.; Fernández-Abedul, M.T.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Faulds, K.; Graham, D.; Blanco-López, M.C. Au@Ag SERRS tags coupled to a lateral flow immunoassay for the sensitive detection of pneumolysin. *Nanoscale* **2017**, *9*, 2051–2058.
22. Park, J.M.; Jung, H.W.; Chang, Y.W.; Kim, H.S.; Kang, M.J.; Pyun, J.C. Chemiluminescence lateral flow immunoassay based on Pt nanoparticle with peroxidase activity. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *853*, 360–367.
23. Leem, H.; Shukla, S.; Song, X.; Heu, S.; Kim, M. An Efficient Liposome-Based Immunochromatographic Strip Assay for the Sensitive Detection of SalmonellaTyphimurium in Pure Culture. *J. Food Saf.* **2014**, *34*, 239–248.
24. Poonlapdech, W.; Seetang-Nun, Y.; Wonglumsom, W.; Tuitemwong, K.; Erickson, L.E.; Hansen, R.R.; Tuitemwong, P. Antibody-conjugated ferromagnetic nanoparticles with lateral flow test strip assay for rapid detection of Campylobacter jejuni in poultry samples. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *286*, 6–14.
25. Razo, S.C.; Panferov, V.G.; Safenkova, I.V.; Varitsev, Y.A.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1007*, 50–60.
26. Anwar, S.; Khawja, M.; Ficiar, E.; Ruffinatti, F.A.; Stura, I.; Argenziano, M.; Abollino, O.; Cavalli, R.; Guiot, C.; Agata, F.D. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis , Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System. *Materials* **2019**, *12*, 465.
27. Mourdikoudis, S.; Pallares, R.M.; Thanh, N.T.K. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* **2018**, *10*, 12871–12934.
28. Sandler, S.E.; Fellows, B.; Thompson Mefford, O. Best Practices for Characterization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 14159–14169.
29. Du, J.; Zhao, Y.; Yang, Z.; Xu, C.; Lu, Y.; Pan, Y.; Shi, D.; Wang, Y. Influence of controlled surface functionalization of magnetic nanocomposites on the detection performance of immunochromatographic test. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *237*, 817–825.
30. Hwang, J.; Kwon, D.; Lee, S.; Jeon, S. Detection of: Salmonella bacteria in milk using gold-coated magnetic nanoparticle clusters and lateral flow filters. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 48445–48448.
31. Chen, Z.; Wu, C.; Zhang, Z.; Wu, W.; Wang, X.; Yu, Z. Synthesis, functionalization, and nanomedical applications of functional magnetic nanoparticles. *Chin. Chem. Lett.* **2018**, *29*, 1601–1608.
32. Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, *16*, 023501.
33. Huang, J.; Xie, Z.; Xie, L.; Xie, Z.; Luo, S.; Deng, X.; Huang, L.; Zeng, T.; Zhang, Y.; Wang, S.; et al. Au/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core-shell nanoparticles are an efficient immunochromatography test strip performance enhancer—A comparative study with Au and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 14064–14071.
34. Zhang, L.; Zhang, Q.; Gao, M.; Luo, Z.; Zhang, Y.; Li, X.; Hua, K.; Zhang, C.; Lai, W.; Cui, Y. Clinical experimental study of GoldMag<sup>®</sup> immunochromatography in high sensitive C reactive protein detection from whole blood and plasma. *J. Magn. Magn. Mater.* **2019**, *473*, 68–73.
35. Wu, Z.; He, D.; Xu, E.; Jiao, A.; Chughtai, M.F.J.; Jin, Z. Rapid detection of β-conglutin with a novel lateral flow aptasensor assisted by immunomagnetic enrichment and enzyme signal amplification. *Food Chem.* **2018**, *269*, 375–379.
36. Liu, X.; Zhang, C.; Liu, K.; Wang, H.; Lu, C.; Li, H.; Hua, K.; Zhu, J.; Hui, W.; Cui, Y.; et al. Multiple SNPs Detection Based on Lateral Flow Assay for Phenylketonuria Diagnostic. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 3430–3436.
37. Xia, S.; Yu, Z.; Liu, D.; Xu, C.; Lai, W. Developing a novel immunochromatographic test strip with gold magnetic bifunctional nanobeads (GMBN) for efficient detection of Salmonella choleraesuis in milk. *Food Control* **2016**, *59*, 507–512.

38. Thobhani, S.; Attree, S.; Boyd, R.; Kumarswami, N.; Noble, J.; Szymanski, M.; Porter, R.A. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *J. Immunol. Methods* **2010**, *356*, 60–69.
39. Wu, J.; Dong, M.; Zhang, C.; Wang, Y.; Xie, M.; Chen, Y. Magnetic lateral flow strip for the detection of cocaine in urine by naked eyes and smart phone camera. *Sensors* **2017**, *17*, 1286.
40. Yan, L.; Dou, L.; Bu, T.; Huang, Q.; Wang, R.; Yang, Q.; Huang, L.; Wang, J.; Zhang, D. Highly sensitive furazolidone monitoring in milk by a signal amplified lateral flow assay based on magnetite nanoparticles labeled dual-probe. *Food Chem.* **2018**, *261*, 131–138.
41. Pilavaki, E.; Demosthenous, A. Optimized lateral flow immunoassay reader for the detection of infectious diseases in developing countries. *Sensors* **2017**, *17*, 1–11.
42. Eltzov, E.; Guttel, S.; Low Yuen Kei, A.; Sinawang, P.D.; Ionescu, R.E.; Marks, R.S. Lateral Flow Immunoassays - from Paper Strip to Smartphone Technology. *Electroanalysis* **2015**, *27*, 2116–2130.
43. Ruppert, C.; Phogat, N.; Laufer, S.; Kohl, M.; Deigner, H.P. A smartphone readout system for gold nanoparticle-based lateral flow assays: Application to monitoring of digoxigenin. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 119.
44. Saisin, L.; Amarit, R.; Somboonkaew, A.; Gajanandana, O.; Himananto, O.; Sutapun, B. Significant sensitivity improvement for camera-based lateral flow immunoassay readers. *Sensors* **2018**, *18*, 1–8.
45. Park, J. A giant magnetoresistive reader platform for quantitative lateral flow immunoassays. *Sens. Actuators A Phys.* **2016**, *250*, 55–59.
46. Marquina, C.; De Teresa, J.M.; Serrate, D.; Marzo, J.; Cardoso, F.A.; Saurel, D.; Cardoso, S.; Freitas, P.P.; Ibarra, M.R. GMR sensors and magnetic nanoparticles for immuno-chromatographic assays. *J. Magn. Magn. Mater.* **2012**, *324*, 3495–3498.
47. Taton, K.; Johnson, D.; Guire, P.; Lange, E.; Tondra, M. Lateral flow immunoassay using magnetoresistive sensors. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1679–1682.
48. Serrate, D.; De Teresa, J.M.; Marquina, C.; Marzo, J.; Saurel, D.; Cardoso, F.A.; Cardoso, S.; Freitas, P.P.; Ibarra, M.R. Quantitative biomolecular sensing station based on magnetoresistive patterned arrays. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35*, 206–212.
49. Ryu, Y.; Jin, Z.; Kang, M.S.; Kim, H.S. Increase in the detection sensitivity of a lateral flow assay for a cardiac marker by oriented immobilization of antibody. *Biochip J.* **2011**, *5*, 193–198.
50. Chicharo, A.; Cardoso, F.; Cardoso, S.; Freitas, P.P. Dynamical detection of magnetic nanoparticles in paper microfluidics with spin valve sensors for point-of-care applications. *IEEE Trans. Magn.* **2014**, *50*, 1–4.
51. Chicharo, A.; Cardoso, F.; Cardoso, S.; Freitas, P.J.P. Real-time monitoring of magnetic nanoparticles diffusion in lateral flow microporous membrane using spin valve sensors. *IEEE Trans. Magn.* **2015**, *51*, 1–4.
52. Lei, H.; Wang, K.; Ji, X.; Cui, D. Contactless measurement of magnetic nanoparticles on lateral flow strips using tunneling magnetoresistance (TMR) sensors in differential configuration. *Sensors* **2016**, *16*, 2130.
53. Guteneva, N.V.; Znoyko, S.L.; Orlov, A.V.; Nikitin, M.P.; Nikitin, P.I. Volumetric registration of magnetic nanoparticles for optimization of quantitative immunochromatographic assays for detection of small molecules. *EPJ Web Conf.* **2018**, *185*, 10006.
54. Barnett, J.M.; Wraith, P.; Kiely, J.; Persad, R.; Hurley, K.; Hawkins, P.; Luxton, R. An inexpensive, fast and sensitive quantitative lateral flow magneto-immunoassay for total prostate specific antigen. *Biosensors* **2014**, *4*, 204–220.
55. Nikitin, M.P.; Orlov, A.V.; Znoyko, S.L.; Bragina, V.A.; Gorshkov, B.G.; Ksenevich, T.I.; Cherkasov, V.R.; Nikitin, P.I. Multiplex biosensing with highly sensitive magnetic nanoparticle quantification method. *J. Magn. Magn. Mater.* **2018**, *459*, 260–264.
56. Orlov, A.V.; Znoyko, S.L.; Cherkasov, V.R.; Nikitin, M.P.; Nikitin, P.I. Multiplex Biosensing Based on Highly Sensitive Magnetic Nanolabel Quantification: Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins A, B, and e in Liquids. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 10419–10426.
57. Lu, W.; Wang, K.; Xiao, K.; Qin, W.; Hou, Y.; Xu, H.; Yan, X.; Chen, Y.; Cui, D.; He, J. Dual Immunomagnetic Nanobeads-Based Lateral Flow Test Strip for Simultaneous Quantitative Detection of Carcinoembryonic Antigen and Neuron Specific Enolase. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10.

58. Shi, L.; Wu, F.; Wen, Y.; Zhao, F.; Xiang, J.; Ma, L. A novel method to detect *Listeria monocytogenes* via superparamagnetic lateral flow immunoassay. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 529–535.
59. Chen, Y.; Wang, K.; Liu, Z.; Sun, R.; Cui, D.; He, J. Rapid detection and quantification of tumor marker carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4) using a superparamagnetic immunochromatographic strip. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 2319–2327.
60. Liu, Y.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Lu, Y.; Xu, X.; Yan, J.; Pan, Y. A highly sensitive and flexible magnetic nanoprobe labeled immunochromatographic assay platform for pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *211*, 109–116.
61. Hu, J.; Jiang, Y.Z.; Tang, M.; Wu, L.L.; Xie, H.Y.; Zhang, Z.L.; Pang, D.W. Colorimetric-Fluorescent-Magnetic Nanosphere-Based Multimodal Assay Platform for Salmonella Detection. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 1178–1184.
62. Motte, L.; Benyettou, F.; De Beaucorps, C.; Lecouvey, M.; Milesovic, I.; Lalatonne, Y. Multimodal superparamagnetic nanoplatform for clinical applications: Immunoassays, imaging & therapy. *Faraday Discuss.* **2011**, *149*, 211–225.
63. Gas, F.; Baus, B.; Queré, J.; Chapelle, A.; Dreanno, C. Rapid detection and quantification of the marine toxic algae, *Alexandrium minutum*, using a super-paramagnetic immunochromatographic strip test. *Talanta* **2016**, *147*, 581–589.
64. Lago-Cachón, D.; Oliveira-Rodríguez, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C.; Martínez-García, J.C.; Moyano, A.; Salvador, M.; García, J.A. Scanning Magneto-Inductive Sensor for Quantitative Assay of Prostate-Specific Antigen. *IEEE Magn. Lett.* **2017**, *8*, 1–5.
65. Moyano, A.; Salvador, M.; Martínez-García, J.C.; Socoliuc, V.; Vékás, L.; Peddis, D.; Alvarez, M.A.; Fernández, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C. Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 6615–6624.
66. Hall, D.A.; Gaster, R.S.; Lin, T.; Osterfeld, S.J.; Han, S.; Murmann, B.; Wang, S.X. GMR biosensor arrays: A system perspective. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2051–2057.
67. J. J. Makiranta and J. O. Lekkala. Modeling and Simulation of Magnetic Nanoparticle Sensor. In Proceedings of the 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference, Shanghai, China, 17–18 January 2006; pp. 1256–1259.
68. MagnaBioSciences, LLC. Available online: <http://www.magnabiosciences.com/> (accessed on 5 February 2020).
69. Lago-Cachón, D.; Rivas, M.; Martínez-García, J.C.; García, J.A. Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 245501.
70. Rivas, M.; Lago-Cachón, D.; Martínez-García, J.C.; García, J.A.; Calleja, A.J. Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits. *Sens. Actuators A Phys.* **2014**, *216*, 123–127.
71. Panferov, V.G.; Safenkova, I.V.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Setting up the cut-off level of a sensitive barcode lateral flow assay with magnetic nanoparticles. *Talanta* **2017**, *164*, 69–76.
72. Huang, W.-C.; Wu, K.-H.; Hung, H.-C.; Wang, J.-C.; Chang, S.-C. Magnetic Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunochromatographic Strip as a Reporter for Rapid Detection of Melamine. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2018**, *18*, 7190–7196.
73. Liu, F.; Zhang, H.; Wu, Z.; Dong, H.; Zhou, L.; Yang, D.; Ge, Y.; Jia, C.; Liu, H.; Jin, Q.; et al. Highly sensitive and selective lateral flow immunoassay based on magnetic nanoparticles for quantitative detection of carcinoembryonic antigen. *Talanta* **2016**, *161*, 205–210.
74. Oliveira-Rodríguez, M.; Serrano-Pertierra, E.; García, A.C.; Martín, S.L.; Mo, M.Y.; Cernuda-Morollón, E.; Blanco-López, M.C. Point-of-care detection of extracellular vesicles: Sensitivity optimization and multiple-target detection. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 38–45.
75. Hui, W.; Zhang, S.; Zhang, C.; Wan, Y.; Zhu, J.; Zhao, G.; Wu, S.; Xi, D.; Zhang, Q.; Li, N.; et al. A novel lateral flow assay based on GoldMag nanoparticles and its clinical applications for genotyping of MTHFR C677T polymorphisms. *Nanoscale* **2016**, *8*, 3579–3587.
76. Lian, T.; Hui, W.; Li, X.; Zhang, C.; Zhu, J.; Li, R.; Wan, Y.; Cui, Y. Apolipoprotein e genotyping using PCR-GoldMag lateral flow assay and its clinical applications. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 4153–4161.
77. Li, X.; Zhang, Q.; Hou, P.; Chen, M.; Hui, W.; Vermorken, A.; Luo, Z.; Li, H.; Li, Q.; Cui, Y. Gold magnetic nanoparticle conjugate-based lateral flow assay for the detection of IgM class antibodies related to TORCH infections. *Int. J. Mol. Med.* **2015**, *36*, 1319–1326.

78. Jacinto, M.J.; Trabuco, J.R.C.; Vu, B.V.; Garvey, G.; Khodadady, M.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros, M.R.; Chang, L.; Kourentzi, K.; Litvinov, D.; et al. Enhancement of lateral flow assay performance by electromagnetic relocation of reporter particles. *PLoS ONE* **2018**, *13*, 1–14.
79. Znoyko, S.L.; Orlov, A.V.; Pushkarev, A.V.; Mochalova, E.N.; Guteneva, N.V.; Lunin, A.V.; Nikitin, M.P.; Nikitin, P.I. Ultrasensitive quantitative detection of small molecules with rapid lateral-flow assay based on high-affinity bifunctional ligand and magnetic nanolabels. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1034*, 161–167.
80. Yang, D.; Ma, J.; Xue, C.; Wang, L.; Wang, X. One-pot synthesis of poly (acrylic acid)-stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystal clusters for the simultaneously qualitative and quantitative detection of biomarkers in lateral flow immunoassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *159*, 119–126.
81. Hong, L.; Wang, K.; Yan, W.; Xu, H.; Chen, Q.; Zhang, Y.; Cui, D.; Jin, Q.; He, J. High performance immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of multiplex cardiac markers based on magnetic nanobeads. *Theranostics* **2018**, *8*, 6121–6131.
82. Wang, C.; Guan, D.; Chen, C.; He, S.; Liu, X.; Wang, C.; Wu, H. Rapid detection of unconjugated estriol in the serum via superparamagnetic lateral flow immunochromatographic assay. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 123–130.
83. Li, X.; Wang, Y.; Tang, Q.; Li, Q. MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoclusters as labels for the quantitative detection of D-dimer in a lateral-flow immunochromatographic assay. *J. Chinese Chem. Soc.* **2019**, *66*, 297–302.
84. Guo, L.; Shao, Y.; Duan, H.; Ma, W.; Leng, Y.; Huang, X.; Xiong, Y. Magnetic Quantum Dot Nanobead-Based Fluorescent Immunochromatographic Assay for the Highly Sensitive Detection of Aflatoxin B 1 in Dark Soy Sauce. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 4727–4734.
85. Li, F.; Li, F.; Luo, D.; Lai, W.; Xiong, Y.; Xu, H. Biotin-exposure-based immunomagnetic separation coupled with nucleic acid lateral flow biosensor for visibly detecting viable *Listeria monocytogenes*. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1017*, 48–56.
86. Huang, H.; Zhao, G.; Dou, W. Portable and quantitative point-of-care monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 using a personal glucose meter based on immunochromatographic assay. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *107*, 266–271.
87. Ren, W.; Cho, I.H.; Zhou, Z.; Irudayaraj, J. Ultrasensitive detection of microbial cells using magnetic focus enhanced lateral flow sensors. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4930–4933.
88. Zhang, X.; Zhou, J.; Zhang, C.; Zhang, D.; Su, X. Rapid detection of *Enterobacter cloacae* by immunomagnetic separation and a colloidal gold-based immunochromatographic assay. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 1279–1287.
89. Li, Q.; Zhang, S.; Cai, Y.; Yang, Y.; Hu, F.; Liu, X.; He, X. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using fluorescence immunochromatographic assay combined with immunomagnetic separation technique. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52*, 1559–1566.
90. Zhao, Y.; Chen, X.; Lin, S.; Du, D.; Lin, Y. Integrated immunochromatographic strip with glucometer readout for rapid quantification of phosphorylated proteins. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *964*, 1–6.
91. Xu, F.; Xu, D.; Ming, X.; Xu, H.; Li, B.; Li, P.; Aguilar, Z.P.; Cheng, T.; Wu, X.; Wei, H. Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid detection of *Campylobacter jejuni*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 4552–4559.
92. Xu, D.; Wu, X.; Li, B.; Li, P.; Ming, X.; Chen, T.; Wei, H.; Xu, F. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* using fluorescent microspheres as label for immunochromatographic strip test. *Food Sci. Biotechnol.* **2013**, *22*, 585–591.
93. Wang, W.; Liu, L.; Song, S.; Xu, L.; Kuang, H.; Zhu, J.; Xu, C. Identification and quantification of eight *Listeria monocytogene* serotypes from *Listeria* spp. using a gold nanoparticle-based lateral flow assay. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 715–724.
94. Moongkarndi, P.; Rodpai, E.; Kanarat, S. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid detection of salmonella enterica serovars typhimurium and enteritidis. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2011**, *23*, 797–801.
95. Xie, Q.Y.; Wu, Y.H.; Xiong, Q.R.; Xu, H.Y.; Xiong, Y.H.; Liu, K.; Jin, Y.; Lai, W.H. Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 262–265.

96. Liao, J.Y.; Li, H. Lateral flow immunodipstick for visual detection of aflatoxin B1 in food using immuno-nanoparticles composed of a silver core and a gold shell. *Microchim. Acta* **2010**, *171*, 289–295.
97. Moon, J.; Kim, G.; Lee, S. A Gold Nanoparticle and Aflatoxin B1-BSA Conjugates Based Lateral Flow Assay Method for the Analysis of Aflatoxin B1. *Materials* **2012**, *5*, 634–643.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).











Article

# Carbon-Coated Superparamagnetic Nanoflowers for Biosensors Based on Lateral Flow Immunoassays

Amanda Moyano <sup>1</sup>, Esther Serrano-Pertierra <sup>1</sup>, María Salvador <sup>2</sup>, José Carlos Martínez-García <sup>2</sup>, Yolanda Piñeiro <sup>3</sup>, Susana Yañez-Vilar <sup>3</sup>, Manuel González-Gómez <sup>3</sup>, José Rivas <sup>3</sup>, Montserrat Rivas <sup>2</sup> and M. Carmen Blanco-López <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry & Institute of Biotechnology of Asturias, University of Oviedo, c/Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain; moyanoamanda@uniovi.es (A.M.); serranoesther@uniovi.es (E.S.-P.)

<sup>2</sup> Department of Physics & IUTA, University of Oviedo, Campus de Viesques, 33204 Gijón, Spain; salvadormaria@uniovi.es (M.S.); jcmg@uniovi.es (J.C.M.-G.); rivas@uniovi.es (M.R.)

<sup>3</sup> Department of Applied Physics, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Spain; yolanda.fayoly@gmail.com (Y.P.); susana.yanez@usc.es (S.Y.-V.); manuelantonio.gonzalez@usc.es (M.G.-G.); jose.rivas@usc.es (J.R.)

\* Correspondence: cblanco@uniovi.es

Received: 22 June 2020; Accepted: 18 July 2020; Published: 22 July 2020



**Abstract:** Superparamagnetic iron oxide nanoflowers coated by a black carbon layer (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C) were studied as labels in lateral flow immunoassays. They were synthesized by a one-pot solvothermal route, and they were characterized (size, morphology, chemical composition, and magnetic properties). They consist of several superparamagnetic cores embedded in a carbon coating holding carboxylic groups adequate for bioconjugation. Their multi-core structure is especially efficient for magnetic separation while keeping suitable magnetic properties and appropriate size for immunoassay reporters. Their functionality was tested with a model system based on the biotin–neutravidin interaction. For this, the nanoparticles were conjugated to neutravidin using the carbodiimide chemistry, and the lateral flow immunoassay was carried out with a biotin test line. Quantification was achieved with both an inductive magnetic sensor and a reflectance reader. In order to further investigate the quantifying capacity of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoflowers, the magnetic lateral flow immunoassay was tested as a detection system for extracellular vesicles (EVs), a novel source of biomarkers with interest for liquid biopsy. A clear correlation between the extracellular vesicle concentration and the signal proved the potential of the nanoflowers as quantifying labels. The limit of detection in a rapid test for EVs was lower than the values reported before for other magnetic nanoparticle labels in the working range 0–3 × 10<sup>7</sup> EVs/μL. The method showed a reproducibility (RSD) of 3% (n = 3). The lateral flow immunoassay (LFIA) rapid test developed in this work yielded to satisfactory results for EVs quantification by using a precipitation kit and also directly in plasma samples. Besides, these Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles are easy to concentrate by means of a magnet, and this feature makes them promising candidates to further reduce the limit of detection.

**Keywords:** superparamagnetic iron oxide nanoflowers; lateral flow immunoassays; biosensor; extracellular vesicles; exosomes

## 1. Introduction

The small size and the unique properties of magnetic nanoparticles have aroused considerable interest in the field of nanomedicine. In fact, they are currently being studied for biomedical applications such as hyperthermia, drug delivery, biosensors, and imaging [1,2]. Superparamagnetic nanoparticles

(SPM NPs) are especially attractive due to their large saturation magnetization and initial magnetic permeability [3]. One of the most interesting features of SPM NPs is the possibility to be attracted by magnetic field gradient and then redispersed when the field is removed. This enables remote manipulation at immunoseparations for analytical determinations and other customized applications.

Magnetite and maghemite are the preferred crystal structures of iron oxide superparamagnetic nanoparticles due to their good magnetic response, biocompatibility, facile synthesis, and low-cost production. In addition, they can be modified with different surface coatings for electrosteric stabilization to prevent their uncontrolled agglomeration in solution [4]. Core/shell superparamagnetic nanoparticles are considered as a superparamagnetic core coated with other materials such as polymers, gold, silver, fatty acids, or surfactants, which increase colloidal stability and biocompatibility, preventing the oxidation of the iron oxide core and enhancing chemical versatility by linking functional groups [5]. A chemical versatile shell is desirable for the conjugation of bioreceptors such as antibodies, nucleotides, or peptides, which are used for molecular recognition of specific targets at analytical tests and devices [6].

Carbon coatings have several advantages as capping agents, since they are chemically stable, cheap, and light and allow an easy encapsulation of iron oxide cores [7–9]. Additionally, carbon films include carboxylic groups enabling the bioconjugation of nanoparticles with receptors for molecular recognition [10,11]. Carbon nanoparticles and other carbon nanomaterials have been reported as novel labels in lateral flow due to their advantages such as its strong color and its high contrast against the white background of nitrocellulose membrane [12,13]. Moreover, the limit of detection reached for these labels have been demonstrated to be better than those obtained with gold nanoparticles [14,15]. Therefore, the carbon coating can develop a strong visual signal as other carbon materials, and this could be advantageous when the nanoparticles are used in biosensors based on immunoassays.

In recent years, biosensors based on superparamagnetic nanoparticles have received considerable attention due to magnetic nanoparticles properties mentioned above, because they enhance the analytical figures of merit of biosensors such as electrochemical, optical, and piezoelectric sensors [16]. The magnetic nanoparticles are generally used to attract the analyte towards the detection surface by an external magnetic field. Sometimes, they are even integrated into the sensor transducer. Numerous biosensors based on superparamagnetic nanoparticles have been reported by using electrochemical [17–19], optical [20,21], piezoelectric [22,23], and magnetic [24–27] transducers.

Lateral flow immunoassay (LFIA) is a rapid test that meets the requirements for point of care (POC) testing. It is simple and provides results within a short time without the necessity of centralized laboratory at low cost [28]. The tests consist of different cellulosic elements (sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane, and adsorption pad), which are assembled on a plastic backing to get robustness. Biorecognition elements are immobilized on the nitrocellulose membrane displaying lines (generally control and test lines), which become active upon flow of the liquid sample that contains the analyte of interest and nanoparticles. Generally, this kind of test relies on a visual signal, providing a yes/no response by means of colored nanoparticles such as gold or latex [29]. Magnetic nanoparticles are key players for the development of quantitative LFIA in combination with external magnetic transducers [30]. Additionally, magnetic nanoparticles have been used as colorimetric labels detected by naked-eye and optical readers due to their dark brown color easily distinguishable on white nitrocellulose membranes [31–33]. To date, several LFIA based on magnetic nanoparticles have been reported to detect and quantify human immunodeficiency virus (HIV) [34], allergen parvalbumin [35], and *Bacillus anthracis* spores [36,37] by means of a magnetic assays readers (MAR) system. The magnetic measurements require the excitation of the magnetic nanoparticles used as labels in the immunoassay by an oscillating magnetic field in order to quantify the magnetization of the nanoparticles. Moreover, magnetic nanoparticles can be used in order to purify and enrich analytes, enhancing the limits of detections and selectivity of conventional LFIA [38–41].

Our research group developed a novel magnetic sensor coupled to LFIA to quantify superparamagnetic nanoparticles immobilized at test and control lines. We used it to determine prostate specific antigen concentrations in the clinical range of interest by using a sandwich format [42]

and histamine in wine following a competitive immunoassay [43]. For those studies, we used 10–12 nm size magnetic nanoparticles, which are stable in solution due to their electrostatic repulsion. The sensor is simpler compared with others, because the external field is not required. However, the superparamagnetism of the nanoparticles should be carefully optimized in order to produce the desired increase of impedance on a radio frequency (RF) current-carrying copper conductor [44,45]. This impedance change is directly proportional to the number of magnetic nanoparticles. Thus, this device allows an indirect detection of analyte of interest thanks to magnetic reporters.

The aim of this work was to study the use of iron oxide nanoflowers coated by a black carbon layer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ ) as labels for LFIA. The nanoflower structure consists of several superparamagnetic cores embedded with an external carbon surface. This core-shell structure was designed aiming its use at both immunoseparation and detection; multiple cores are suitable for immunoisolation, and the carbon coating provides a strong optical signal, keeping the magnetic properties unaltered.

In order to test their applicability to LFIA, we firstly studied these  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles with a model affinity molecular recognition system. With this aim, we bioconjugated the particles to neutravidin and tested them against biotin printed across the membrane. Then, the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles were applied to an immunoassay for extracellular vesicles (EVs). EVs are nanovesicles produced by all cells via endocytosis processes. They carry proteins and nucleic acids from the original cell and therefore can be used to get molecular information about their parent cells. They are attracting a lot of attention in recent years as a source of non-invasive biomarkers for liquid biopsy. The bottleneck at EV research that is limiting industrial and clinical translations is the current isolation from biological fluids and the development of simple quantification methods. Our research group developed LFIA for EVs based on tetraspanin recognition [46,47]. In this work, as proof of concept, we tested the potential of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles to EVs separation and quantification.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Instruments

Ferrocene ( $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ , 98%), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%), acetone ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ , 99.9%), bovine serum albumin (BSA), 1-ethyl-3-[3dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride (EDC), and 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) were of analytical reagent grade purchased from Aldrich (Madrid, Spain) and were used without further purification. NeutrAvidin protein was obtained from Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA).

For biotin–neutravidin tests, glass fiber membrane (GF001000) used as sample pad and backing cards (HF000MC100) were purchased from Millipore (Darmstadt, Germany). Other materials used were nitrocellulose membranes (UniSart CN95, Sartorius, Spain) and absorbent pads (Whatman, Madrid, Spain). The sample buffer consisted of 10 mM phosphate buffer (PB) pH 7.4 with 0.5% Tween-20 and 1% BSA.

For EVs tests, nitrocellulose membranes (HF07504XSS) were purchased from Millipore (Germany). Other materials used for the preparation of strips were similar to the biotin–neutravidin test. Based on previous results, the sample buffer consisted of 10 mM HEPES pH 7.4 with 0.5% Tween-20 and 1% BSA. HEPES was purchased from Fisher Scientific (Madrid, Spain). Anti-tetraspanin antibodies anti-CD9 and anti-CD63 were provided by Immunostep (Salamanca, Spain). Anti-mouse IgG was purchased from Sigma-Aldrich (Spain). Lyophilized commercial exosomes purified from plasma (HBM-PEP) of healthy donors were purchased from HansaBioMed (Tallinn, Estonia).

In order to dispense the control and the detection lines, an IsoFlow reagent dispensing system (Imagene Technology, Lebanon, NH, USA) was used with a dispense rate of 0.100  $\mu\text{L}/\text{mm}$ . A guillotine Fellowes Gamma (Madrid, Spain) was used to cut the strips. For quantification at the test line by reflectance measurements, a portable strip reader ESE Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., GmbH, Hilden, Germany) was used.

## 2.2. Synthesis and Characterization of Carbon-Coated Nanoflowers

### 2.2.1. Synthesis

The synthesis was carried out following a one-pot solvothermal method as previously reported by Wang [48]. Typically, ferrocene ( $m = 0.3$  g) was dissolved in acetone ( $V = 25$  mL) under vigorous magnetic stirring for 30 min; then, hydrogen peroxide ( $V = 1.5$  mL) was slowly added into the above mixture solution and vigorously stirred for another 30 min. This precursor solution was transferred to the Teflon-lined stainless-steel autoclave (Parr Instrument, Illinois, IL, USA) with a total volume of 45.0 mL and heated to 210 °C for 96 h. Finally, the autoclave was cooled to room temperature, the reaction products were magnetically collected, and the supernatant was discarded. The precipitates were washed with acetone four times, and again, the products were magnetically separated to eliminate the acetone and were repeatedly washed with water.

### 2.2.2. Characterization

Hysteresis loops were recorded with a vibrating sample magnetometer (VSM, DMS, Lowell, MA, USA) at room temperature and under external magnetic fields from  $-10,000$  to  $10,000$  Oe.

Room temperature X-ray diffraction (XRD) patterns of powder samples were obtained with a Philips PW1710 diffractometer (Panalytical, Callo End, UK) with a Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.54186$  Å) between 10° and 80° with steps of 0.02° and 10 s/step.

The composition was analyzed with a TGA Perkin Elmer model 7 (Perkin, Waltham, MA, USA).

Fourier transform infrared (FTIR) spectra were performed in a Thermo Nicolet Nexus spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) using the attenuated total reflectance (ATR) method from 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Scanning electron microscopy (SEM) with a Zeiss FE-SEM ULTRA Plus (5 kV) microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and transmission electron microscopy (TEM) with a JEOL JEM-1011 microscope (100 kV) were employed to study the morphology.

## 2.3. Bioconjugation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoflowers Coated by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C

### 2.3.1. Functionalization

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C with carboxyl functional groups were functionalized using neutravidin to test their performance as label in immunoassays through the neutravidin–biotin interaction. Firstly, 100  $\mu\text{L}$  of nanoflowers were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of neutravidin (different concentrations were studied) and 20  $\mu\text{L}$  of EDC (1 mg/mL in MES 1 mM, pH 6.00) under continuous sonication for one hour. Then, 20  $\mu\text{L}$  of EDC were added one hour and two hours after under sonication. After the last addition of EDC, the mixture was sonicated for 10 min.

The protocol to cover nanoflowers with neutravidin was adapted to bioconjugate the nanoflowers to antitetraspanin antibodies against EVs. Firstly, 50  $\mu\text{L}$  of nanoflowers were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of anti-CD63 (1 mg/mL) and 20  $\mu\text{L}$  of EDC (1 mg/mL in MES 1 mM, pH 6.00) under continuous sonication for one hour. Then, 20  $\mu\text{L}$  of EDC were added one hour and two hours after under sonication. After the last addition of EDC, the mixture was sonicated for 10 min.

### 2.3.2. Characterization of Nanoparticles Conjugates by Dynamic Light Scattering

A Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a solid-state He–Ne laser ( $\lambda = 633$  nm) was used to measure size distribution and  $\zeta$ -potential. In order to monitor the conjugation process, 30 measurements of the backscattered (173°) intensity were carried out at 25 °C and averaged. For data analysis, Zetasizer software version 7.03 was used.

#### 2.4. Enrichment and Quantification of EV from Real Samples

Extracellular vesicles derived from human plasma samples were isolated using ExoQuick™ precipitation reagent (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Freshly isolated EVs were analyzed using a NanoSight LM10 instrument (Malvern, Worcestershire, UK) and NTA 3.1 software at Nanovex Biotechnologies S.L (Asturias, Spain).

#### 2.5. Lateral Flow Assays

##### 2.5.1. Preparation of the Strips

The immunoassay was based on a dipstick format. The strips consist of four parts: sample pad, nitrocellulose membrane, absorbent pad, and backing plastic card. The first step was to incorporate the nitrocellulose membrane into the backing plastic card to get robustness. Then, for biotin–neutravidin affinity test, a biotin-BSA test line was immobilized on the membrane with a concentration of 1 mg/mL. An IsoFlow dispenser at a rate of 0.100 µL/mm was employed.

For EVs tests, two lines of antibodies were immobilized across the nitrocellulose strip: (i) the test line gave us the result of the analysis following a sandwich format and (ii) the control line was used to validate the strip indicating that the liquid sample flowed adequately along the strip. Both lines were applied by the IsoFlow dispenser at a rate of 0.100 µL/mm with 1 mg/mL concentration of anti-CD9 and anti-IgG for test line and control line, respectively.

The nitrocellulose membrane after dispensing was kept for 20 min at 37 °C. Finally, the absorbent pad and the sample pad were stuck onto the backing card overlapping them 2 mm. Finally, individual strips of 5 mm were cut. For storage, strips were kept at room temperature and preserved with desiccant bags to avoid moisture.

##### 2.5.2. Magnetic Quantification

Quantification of the test line in the LFIA was provided by a Scanning MagnetoInductive Sensor (SMISensor) specifically designed in-house for this task. The sensing head consists of a double copper line printed on a rigid insulating substrate across which an alternating current is continuously flowing. A precision impedance analyzer (Agilent 4294A, Agilent Technologies, Madrid, Spain) was used to monitor the magnitude and the phase of the sensing head impedance. For this purpose, 16048G test leads and a 500 mV/40 MHz excitation voltage were used. The test lines on the strips were scanned laterally over the sensing head by a micro-positioner producing an increase of the impedance of the circuit due to the large magnetic permeability of the superparamagnetic particles present on it. This variation proved to be directly proportional to number of nanoparticles at the test line in previous studies. To account for all the particles in the test line, the signal was integrated across the position. For further information, please, see Supplementary Materials.

##### 2.5.3. Optical Measurements

In order to quantify the color intensity of the test line by reflectance measurements, a portable strip reader ESE-Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., Hilden, Germany) was used.

##### 2.5.4. Characterization of the Strip by SEM

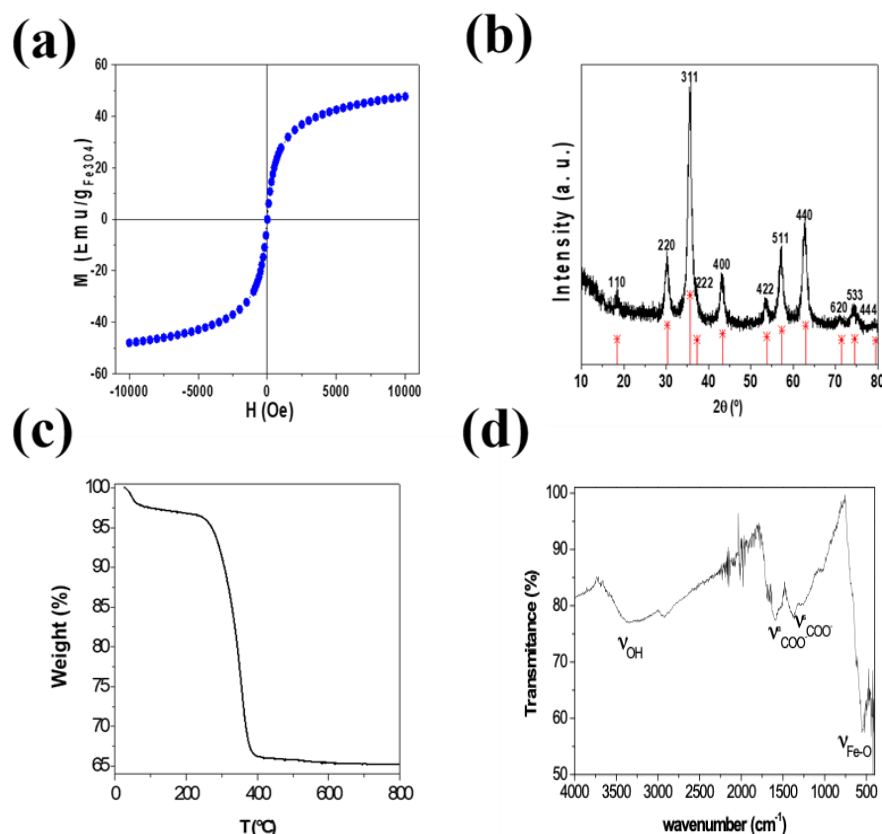
The morphology of the strips was characterized by SEM in a Zeiss FE-SEM ULTRA Plus (5 kV) microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Characterization of the Carbon-Coated Nanoflowers before Bioconjugation

After synthesis, carbon-coated nanoflowers were characterized using various analytical techniques: VSM, X-ray diffraction, ζ potential, thermogravimetric analysis (TGA), FTIR, SEM, and TEM (Figure 1).





**Figure 1.** (a) Hysteresis loops of core/shell structure of magnetite/carbon performed at room temperature with a vibrating sample magnetometer (VSM) (−10, +10) KOe. (b) X-ray diffraction (XRD) pattern of the core/shell structure of magnetite/carbon colloidal nanoparticles compared to the XRD pattern of magnetite from JCPDS 19-0629 data base (c) thermogravimetric analysis (TGA) curves of the core/shell structure of magnetite/carbon colloidal nanoparticles. (d) FT-IR.

Magnetic characterization of the dried samples performed with a VSM at room temperature showed a magnetization normalized to the content of magnetite with a saturation at 10 KOe around 50 emu. This indicated superparamagnetic behavior (Figure 1a), in concordance with the dominant surface effects in small nanoparticles, for which the dead magnetic layer significantly decreased the magnetization. Moreover, negligible coercivity and absent remanence were observed. This can be ascribed to the superparamagnetic behavior of small magnetite nanoparticles.

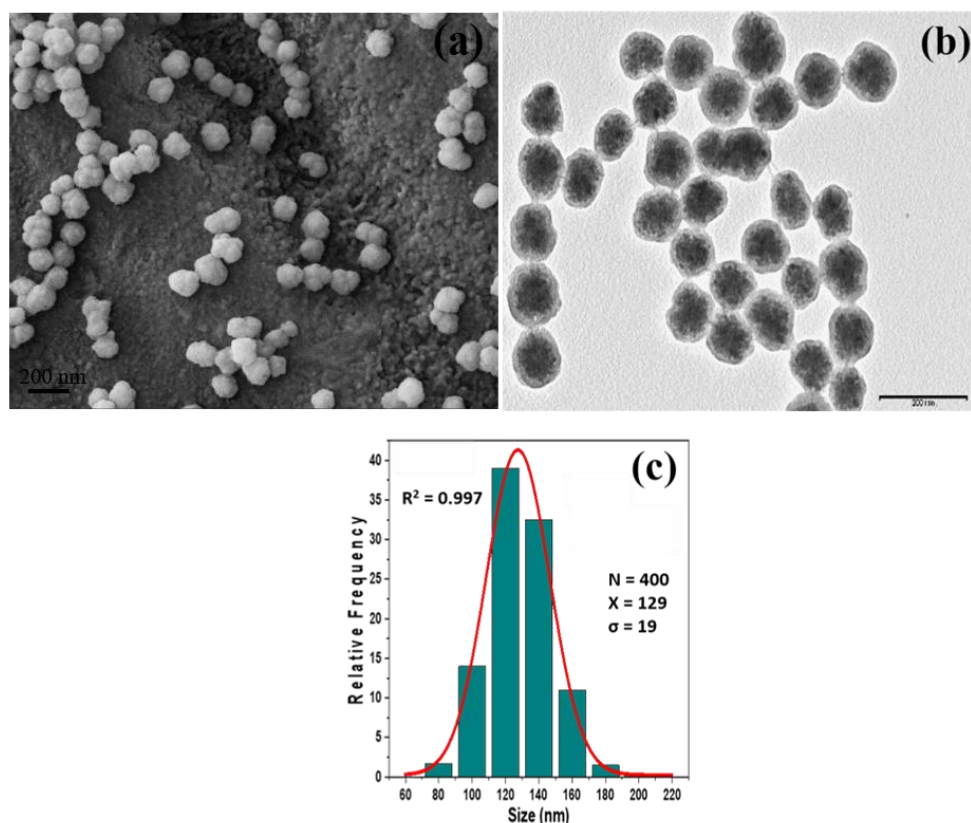
Figure 1b shows X-ray diffraction spectra of the carbon coated multicore NP shown together with the theoretical diffraction peaks of magnetite (JCPDS card No. 19-0629) [49]. It can be seen that both the location and the relative intensity of  $m\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{@C}$  nanoparticles coincided with the main theoretical 111, 220, 311, 400, 422, 511, 440 magnetite reflections (red lines in Figure 1b). This confirmed that magnetite was the crystalline phase of iron oxide present in the sample. To obtain the crystallite size, Scherrer formula [50] was applied to main reflection peak 311, providing an average  $D_{hkl} = 16.3$  nm and  $\sigma = 2.8$  nm. Moreover, on low diffraction angles, a broad band corresponding to the amorphous carbon coating shell could be seen.

The surface charge of  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C}$  nanoparticles was negative with a  $\zeta$  potential value of  $-32$  mV and a rate of magnetite/total mass of 0.651% ( $W_{\text{magnetite}}/W_{\text{sample}}$ ) (Figure 1c). The  $\zeta$  potential value confirms the stability of  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C}$  nanoparticles in water suspension.

Figure 1d shows the FT-IR spectra of  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C}$  nanoparticles. The peak observed around  $550\text{ cm}^{-1}$  was characteristic of Fe-O vibrations [51]. Additionally, a large band around  $3400\text{ cm}^{-1}$  was also observed due to the -OH groups adsorbed on the nanoparticle surface. Besides, two peaks appeared

around 1595 and 1384<sup>-1</sup>, which corresponded to the asymmetric and the symmetric stretching vibrations of COO<sup>-</sup> groups.

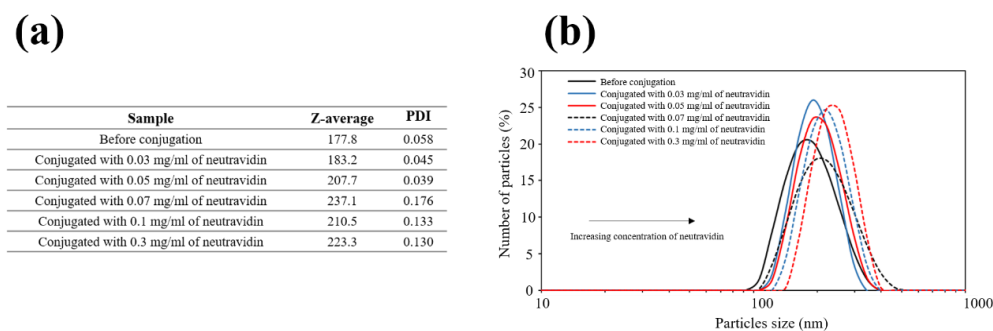
The morphology of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and by transmission electron microscopy (TEM), as shown in Figure 2a,b respectively. It can be seen (Figure 2a) that the obtained particles had a nearly spherical shape and uniform size with a regular core@shell structure where the carbon coating homogeneously encapsulated dozens of magnetite nanocrystals with a size 10–20 nm (Figure 2b). From TEM images, distribution of sizes was analyzed showing a mono-modal histogram with slight polydispersity, with an average diameter of 129 nm ± 19 nm (Figure 2c).



**Figure 2.** (a) SEM and (b) TEM images of the core/shell structure of magnetite/carbon colloidal NPs. (c) Analysis of size distribution obtained from (b).

### 3.2. Study of Neutravidin Concentration during the Bioconjugation Process

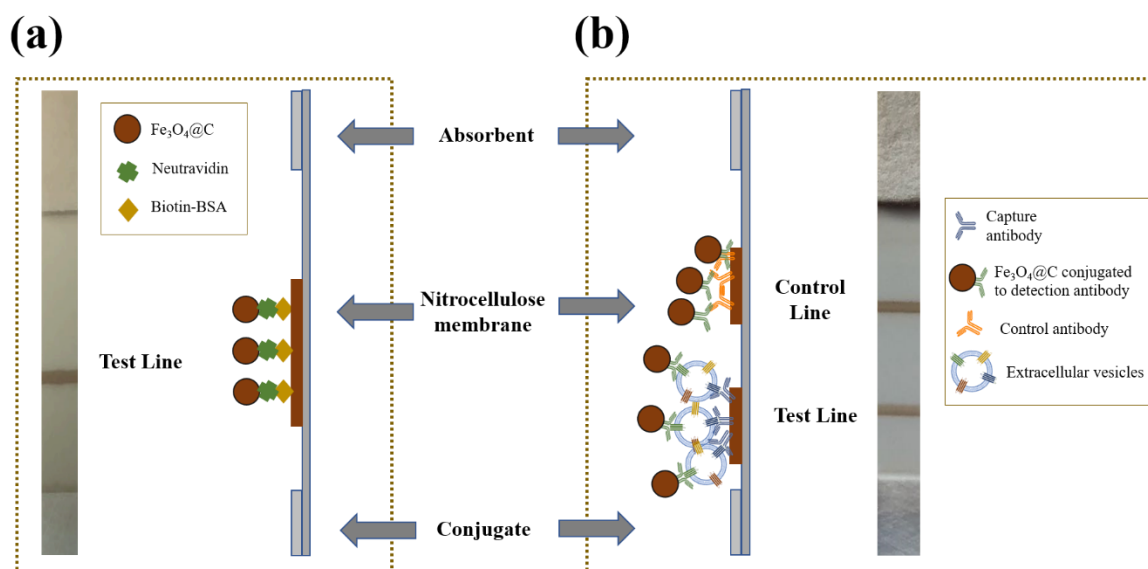
Increasing neutravidin concentrations were used to coat the nanoflowers: 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, and 0.3 mg/mL. Phosphate buffer was used as diluent to prepare the neutravidin standards. Dynamic light scattering (DLS) measurements were carried out to compare nanoparticles hydrodynamic size before and after conjugation reaction. The hydrodynamic diameter of nanoparticles before conjugation was 178 nm (polydispersity index 0.058). The Figure 3a shows the values for Z-average of the hydrodynamic sizes for the different concentration of neutravidin used during the conjugation process. The hydrodynamic diameter of nanoparticles was higher when the concentration of neutravidin increased (Figure 3b). The bioconjugation process was confirmed by the increase of the hydrodynamic diameter of nanoparticles before and after conjugation. The mean size of neutravidin is around 2–3 nm (60 kDa). Therefore, considering the neutravidin size, it can be confirmed that this protein was bound to nanoparticles surface through the carboxyl functional groups available. The Z-average of the hydrodynamic sizes increased directly with the concentration of neutravidin. This could be because more than one molecule of neutravidin can be bound to a nanoparticle through their multiple functional groups on their surface.



**Figure 3.** (a) Results obtained by dynamic light scattering (DLS) (Z-average and polydispersity index) for study performed with neutravidin. (b) Hydrodynamic size distribution profiles of  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C}$  nanoparticles before (solid black line) and after conjugation with neutravidin concentrations of 0.3 mg/mL (solid red line), 0.1 mg/mL (solid blue line), 0.07 mg/mL (dashed black line), 0.05 mg/mL (dashed red line), and 0.03 mg/mL (dashed blue line) of neutravidin.

### 3.3. Lateral Flow Assay Procedure

A biotin–neutravidin affinity test (Figure 4a) and a lateral flow immunoassay for extracellular vesicles (Figure 4b) were developed.



**Figure 4.** (a) Photography (front view) and schematic illustration of the biotin–neutravidin affinity test (side view). (b) Photography (front view) and schematic representation of the lateral flow immunoassay for extracellular vesicles (side view).

#### 3.3.1. Biotin-Neutravidin Affinity Test

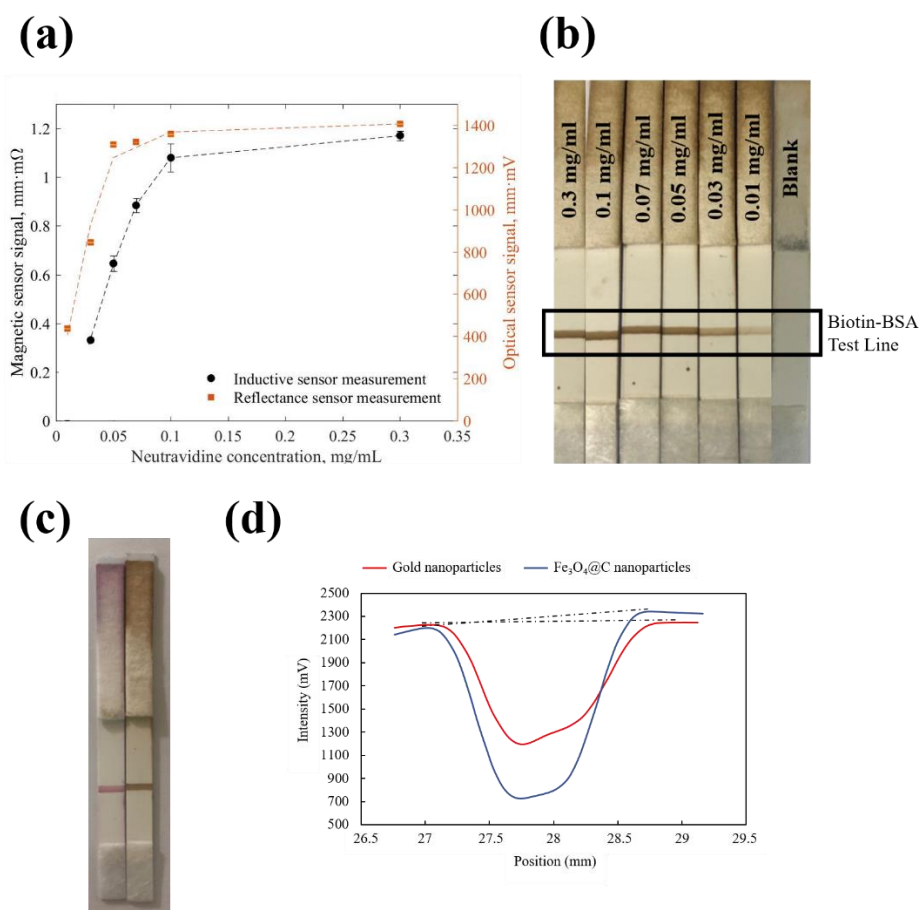
The biotin–streptavidin/neutravidin/avidin system has been widely used in immunoassays because it is a powerful non-covalent interaction with high specificity and strong affinity [52,53]. Streptavidin, neutravidin, and avidin are molecules that contain four binding sites with an extraordinarily high affinity for biotin. This system is very attractive for biosensing because of its amplification capability [54–56]. In addition, biotin can be easily covalently bonded to proteins such as antibodies, nucleotides, and enzymes, enabling a strong binding between biotinylated proteins and streptavidin, neutravidin, or avidin. In this case, the biotin–neutravidin system was used as model system for affinity interactions as a first step to study the feasibility to bioconjugate these nanoparticles.

In order to test the suitability of the NP for LFIA, 20  $\mu\text{L}$  of suspensions with different concentration of neutravidin and 80  $\mu\text{L}$  of running buffer were transferred into a microtube. The sample pad was

introduced into the mixture, and the buffer started to flow through the strip by capillary action. Only the nanoflowers coated with neutravidin were retained at the biotin-BSA line, as shown in Figure 4. A simplified schematic representation of biotin–neutravidin interaction in LFIA is shown in Figure 4.

### 3.3.2. Magnetic and Optical Quantification for Biotin-Neutravidin Test

The test line, once dried, was analyzed by reflectance and magnetic measurements. Figure 5a shows the results for both measurements. The optical and the magnetic signals increased with neutravidin concentration until saturation was reached. The saturation was produced due to the depletion of free biotin molecules at the test line, thus the nanoflowers coated with neutravidin were not retained. The optical and the magnetic methods showed a reproducibility (RSD) of 1% ( $n = 3$ ) for both cases. Figure 5b shows a representative example of strips for an increase in neutravidin concentration. Both curves followed the same trend, achieving a slightly better fit for the magnetic one. The signal corresponding to nanoparticles coated with 0.01 mg/mL of neutravidin was difficult to distinguish from the blank at the inductive sensor. However, the optical signal was significantly different from the blank, as Figure 5b shows. For the blank,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles without neutravidin coating were assayed in order to test that bare nanoparticles were not attached to biotin-BSA test line. The Figure 5b confirms that there were not non-specific interactions between bare  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles and biotin-BSA test line. A higher concentration of neutravidin (0.03 mg/mL) on the nanoparticles could be easily detected by both magnetic and optical instruments.



**Figure 5.** (a) Magnetic and optical signals as function of the concentration of neutravidin. (b) Representative example of results obtained in the strips for the different concentrations of neutravidin. (c) Comparison of different labels: gold nanoparticles (left) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  nanoparticles (right). (d) Intensity profiles measured using ESEQuant reader for gold (red line) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$  (blue line) nanoparticles.

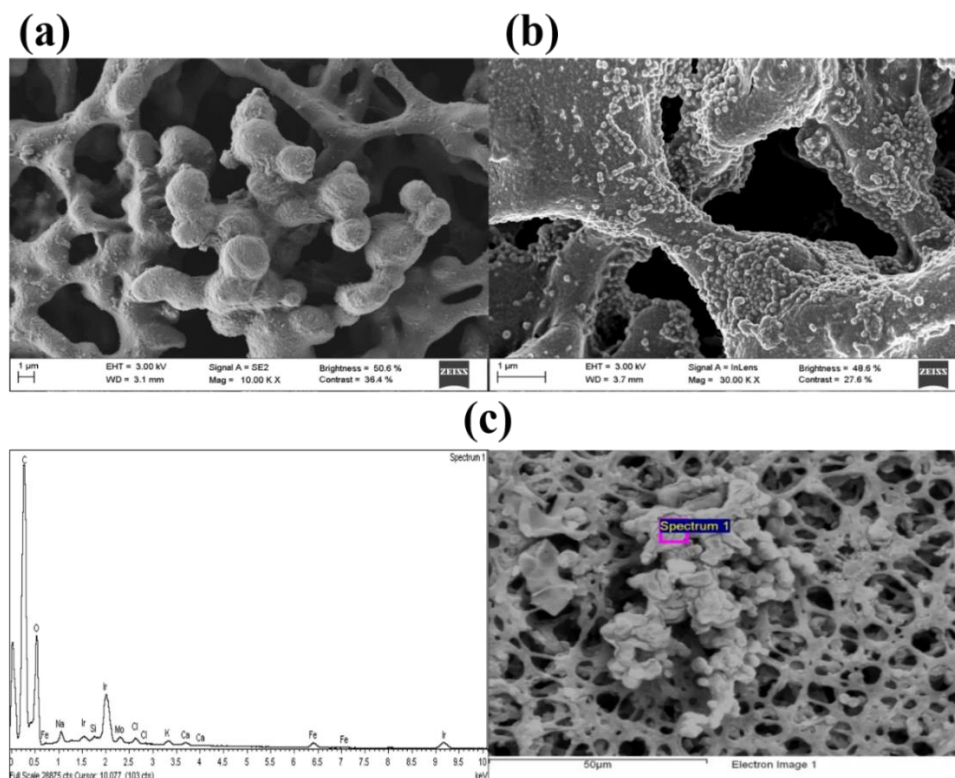
Colloidal gold was used as label at the same immunoassay (biotin-neutravidin interaction test) to compare the results with those of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles. Colloidal nanoparticles have been widely used as labels in LFIA, the 40 nm size being the most popular choice for this kind of assay due to their higher sensitivity [57]. Gold nanoparticles were conjugated to neutravidin by passive binding [58]. The optimal concentration of neutravidin to stabilize the colloidal gold was found through a titration assay as described in reference [58]. The protocol for the titration was executed as described elsewhere [58]. The results indicated that 0.4 mg/mL of neutravidin was the lower concentration needed for the conjugation with gold nanoparticles (data not shown). To perform the comparison, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles were conjugated to 0.3 mg/mL of neutravidin, because at this concentration, the optical signal has reached the saturation (Figure 5a), and therefore the intensity of this signal should be similar to that obtained by 0.4 mg/mL of neutravidin. Therefore, the concentrations chosen were comparable for both labels.

The test was carried out using the same protocol described above, and the optical reader was used to analyze the signals. Figure 5c shows that naked-eye signals for gold and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles at the test line apparently looked equivalent. However, when the test lines were quantified by optical reader, the results show that the nanoflowers displayed a significantly stronger optical signal (1405.9 mm·mV) compared with gold nanoparticles (937.3 mm·mV). Figure 5d shows the intensity profiles measured using ESEQuant reader for gold nanoparticles (red line) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles (blue line). The intensity profiles were based on reflectance measurements. The ESEQuant reader scanned the test line by moving the light source over the strip. The reader was adjusted so that the light reflected from the strip was collected by a confocal detector and registered as intensity (mV). When the incident beam passed across the test line, the reflected light decreased compared with the light reflected from the membrane (base line). This was because the nanoparticles at the test line absorbed light, and this effect reduced light intensity. This was shown as a negative peak (Figure 5d). Hence, the recorded graph represents intensity (mV) versus position (mm). The result of reflectance measurements for gold and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles were obtained by integration of negative peak area (Figure 5d, dashed black lines). Absorption and reflection of the light were proportional to the overall intensity of the nanoparticles of the test line. Therefore, the results indicate that the density of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles was higher than the density of gold nanoparticles at the biotin-BSA test line for a similar concentration of neutravidin.

### 3.3.3. Characterization of the Strip by SEM

Morphological characterization of the strips was carried out by SEM in order to observe the distribution of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles after using the strip in the detection device. Figure 6a shows an image of the porous structure of a non-colored part of the strip. Spheres with size between 3–5 μm embedded in a network of fibers were clearly observed in the region corresponding to the test line (Figure 6b). We tried several membranes with different pore sizes to let Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles flow along membrane until the end of the strip. It could be observed that the pores of this cellulose network were large enough to allow the diffusion of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles through the membrane (Figure 6b).

An energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis was also carried out in order to confirm that these spherical nanoparticles corresponded to Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles agglomerates. The EDS spectrum showed the presence of Fe on the analyzed area (Figure 6c). With this analysis, we confirmed the presence of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles on the test line.



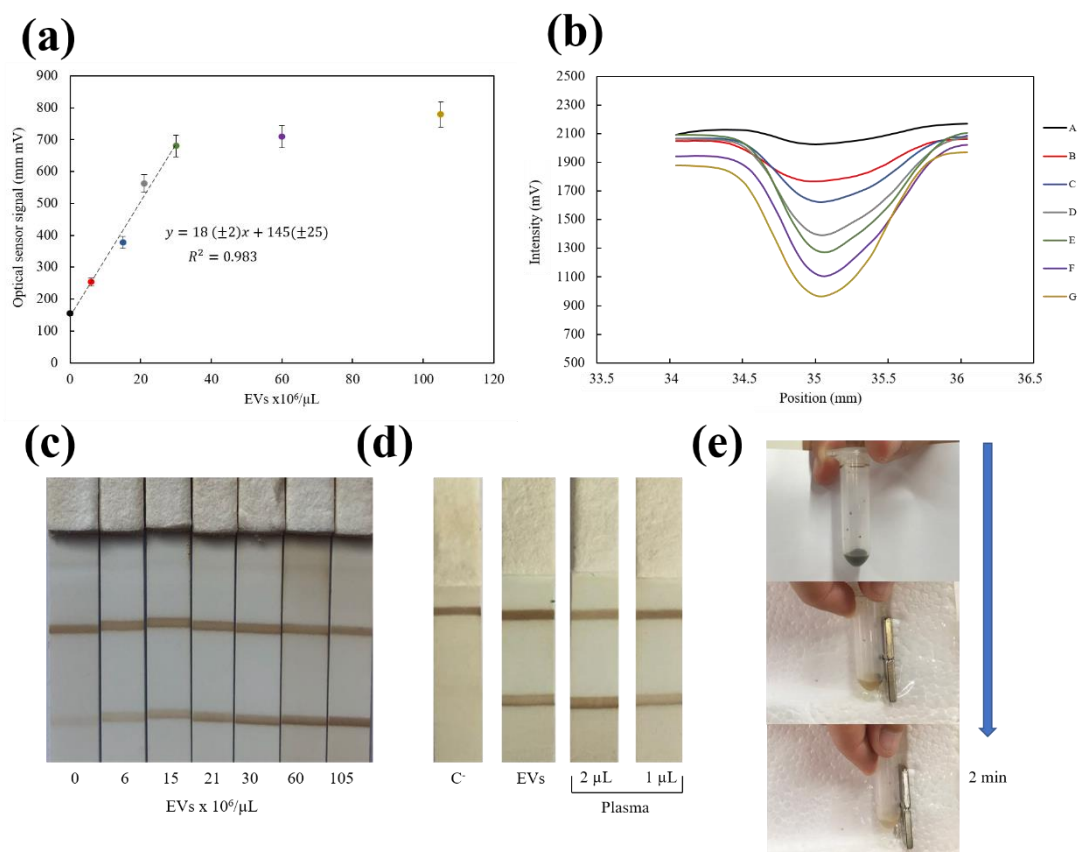
**Figure 6.** (a) SEM images of the cellulose membrane and (b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticle agglomerates attached to the cellulose network at the test line. The strips were examined after use in the detection device. (c) energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) spectrum obtained from one particular location in a SEM image of the strips with presence of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles.

### 3.3.4. Applications of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C Nanoparticles for Detection of EVs by LFIA

Finally, as proof of concept, we developed a lateral flow immunoassay for EVs by using these nanoflowers as label. The immunoassay relies on sandwich format developed in our research group [46,47]. Anti-CD9 and anti-CD63 were used as capture and detection antibodies, respectively. Capture antibody was immobilized on the nitrocellulose membrane at the test line, and detection antibody was conjugated to the nanoflower surfaces. Figure 4b shows a schematic illustration of the immunoassay for EVs. Commercial standard exosomes were used to study these magnetic nanoparticles as labels and to evaluate the magnetic signal in this application.

In order to carry out the test, different concentrations of standard commercial exosomes ( $6.00 \times 10^6$ ,  $1.50 \times 10^7$ ,  $2.10 \times 10^7$ ,  $3.00 \times 10^7$ ,  $6.00 \times 10^7$ ,  $1.05 \times 10^8$  EVs/μL) were added into a microtube that contained 10 μL nanoflowers coated with anti-CD63 and buffer until a final volume of 100 μL. HEPES was used to dilute the standard commercial exosomes.

The strips were analyzed at both the magnetic sensor and the optical reader, but quantification was possible only with the optical reader. Previous results were based on the plain biotin–neutravidin interaction, but the assay used for the EVs detection was more complex; it involved a capture antibody of bulky EVs at the test line and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C bioconjugated antibody for detection. The optical signal corresponding to the highest concentration of EVs was 779 mm·mV (Figure 7). If we look at Figure 5a, the corresponding value at the magnetic sensor curve for that concentration would be below the quantification possibilities of this device. Further work is in progress to optimize the microelectronics for amplification.



**Figure 7.** (a) Optical calibration curve for extracellular vesicles (EVs). (b) Intensity profiles measured using ESEQuant reader for different concentration of EVs: blank (A),  $6.00 \times 10^6$  (B),  $1.50 \times 10^7$  (C),  $2.10 \times 10^7$  (D),  $3.00 \times 10^7$  (E),  $6.00 \times 10^7$  (F),  $1.05 \times 10^8$  (G) EVs/μL (c) Representative example of results obtained in the strips with different concentrations of standard EVs. (d) Representative strips of lateral flow immunoassay (LFIA) tested with real samples: negative control (C-), EVs isolated from plasma sample using ExoQuick (EVs), and plasma. (e) Separation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles using a conventional magnet.

Nevertheless, a direct relationship between the concentration of exosomes and the optical signal was found (Figure 7). Figure 7b shows the intensity profiles obtained by commercial optical reader for different concentration of EVs. Reflectance peak area increased proportionally with EVs concentration since the density of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles at the test line was higher. The limit of detection (LOD) achieved was  $4 \times 10^6$  EVs/μL (calculated with the  $3 S_B/m$  criterium), and the method showed a reproducibility (RSD) of 3% ( $n = 3$ ). This LOD agrees with the values reported before with this type of tests [46,47] by using gold nanoparticles ( $8.5 \times 10^5$  and  $4.5 \times 10^6$  EVs/μL), carbon black nanoparticles ( $9.2 \times 10^6$  EVs/μL) or other commercial magnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid ( $1.0 \times 10^7$  EVs/μL). Figure 7c shows a representative example of the strips for standard EVs. Prompted by these results, this LFIA system was next tested with freshly isolated EV from human plasma and also directly with different volumes of plasma (Figure 7d). Quantification of isolated EVs using the optical calibration curve (Figure 7a) was compared to that obtained by NTA. Despite the different basis of these measuring principles, results were in the same range of concentration ( $3 \times 10^9$  EVs/μL determined in LFIA vs.  $7 \times 10^9$  EVs/μL determined by NTA). Estimation of the number of EVs by NTA is based on the tracking of their Brownian displacements, whereas LFIA is a single step procedure, in which EVs are recognized by targeting their surface markers. Moreover, human plasma without previous treatment was used for the first time directly on the test strips. An excellent agreement was achieved for the number of EVs obtained in two different volumes using the calibration curve:  $21.4 \times 10^6$  EVs/μL in 1 μL and  $20.9 \times 10^6$  EVs/μL when a 2 μL plasma aliquot was tested. This is

an indication of the absence of matrix effects. Thus, the magnetic LFIA developed in this work with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoflowers was found suitable for analysis of complex samples such as plasma or serum with minimum sample preparation in a simple protocol.

In addition, another important strength of these particles is their rapid separation with a conventional magnet in 2 min (Figure 7e) while keeping their superparamagnetic behavior. Therefore, they show a great potential to easily enrich CD63+ EV for further functional or analytical assays.

#### 4. Conclusions

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles were synthesized with the purpose of having the double function of separation and quantification at immunoassays. Their characteristics are summarized in Table 1. They exhibited superparamagnetic behavior, and their value of  $\zeta$  potential confirms their stability in suspension.

**Table 1.** Characteristics of carbon-coated superparamagnetic oxide nanoflowers Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C.

Carbon-Coated Superparamagnetic Oxide Nanoflowers (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @C)	
Synthesis	One-pot solvothermal method
Composition (core/shell)	Magnetite cores Black carbon coating
Magnetite crystals size (d)	10–20 nm
Magnetization saturation	50 emu per g of magnetite
Mean size	129 nm
Mean hydrodynamic diameter	178 nm
Electrokinetic potential ( $\zeta$ )	−32 mV
Rate magnetite/total mass	0.651%

These carbon coated nanoflowers were conjugated to neutravidin by using the carbodiimide chemistry and tested at lateral flow immunoassays with a biotin test line. The conjugations process was monitored by DLS and confirmed by LFIA based on biotin–neutravidin interaction line. Quantification was carried out by means of an optical reader and a magnetic sensor. With this basis, the nanoflowers were used to develop a lateral flow immunoassay for detection of EVs.

In summary, these Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C magnetic particles proved to be effective for bioconjugation purposes due to the availability of carboxylic groups on their surface. Their carbon coating provided a strong optical signal when using them as labels in lateral flow assays. In fact, the LFIA developed in this work achieved lower LOD values than those obtained by means of other commercial magnetic nanoparticle labels for EV detection. Therefore, the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C magnetic particles employed in this study have a great potential of application as labels in EV enrichment and detection.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-6374/10/8/80/s1>, Figure S1: (a) Photograph of the sensing planar coil. (b) Image of the device integrating the planar coil and the micropositioner. (c) 40 MHz Impedance variation measured in a scan of a sample of nanoparticles containing 32  $\mu$ g of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (d) Impedance recording observed for the scan of an LFIA with 1 mg/mL of neutravidin in two consecutive scans in the sensor.

**Author Contributions:** Methodology, A.M., E.S.-P., S.Y.-V., and M.G.-G.; investigation, A.M., E.S.-P., M.S., J.C.M.-G., S.Y.-V., and M.G.-G.; writing—original draft preparation, A.M. and S.Y.-V.; writing—review and editing, E.S.-P., Y.P., J.R., M.R., and M.C.B.-L.; supervision, Y.P., J.R., M.R., and M.C.B.-L.; project administration, Y.P., J.R., M.R., and M.C.B.-L.; funding acquisition, Y.P., J.R., M.R., and M.C.B.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported in part by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under projects MAT2017-84959-C2-1-R and the Principality of Asturias (Spain) under project IDI/2018/000185 and the Consellería de Educación Program for Development of a Strategic Grouping in Materials (AEMAT) at the University of Santiago de Compostela under Grant No. ED431E208/08, Xunta de Galicia. Amanda Moyano was supported by a “Severo Ochoa” fellowship (Consejería de Educación y Cultura del Gobierno del Principado de Asturias, grant BP17-152).

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.



## References

1. Colombo, M.; Carregal-Romero, S.; Casula, M.F.; Gutierrez, L.; Morales, M.P.; Boehm, I.B.; Heverhagen, J.T.; Prospero, D.; Parak, W.J. ChemInform abstract: Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4306–4334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Zhang, L.; Dong, W.-F.; Sun, H.-B. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Design, synthesis and biomedical photonic applications. *Nanoscale* **2013**, *5*, 7664–7684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Knobel, M.; Nunes, W.C.; Socolovsky, L.M.; De Biasi, E.; Vargas, J.M.; Denardin, J.C. Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: A review on ideal and real systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 2836–2857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, *16*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. McNamara, K.; Tofail, S.A.M. Nanoparticles in biomedical applications. *Adv. Phys. X* **2017**, *2*, 54–88. [[CrossRef](#)]
6. Salvador, M.; Moyano, A.; Martínez-García, J.C.; Blanco-López, M.C.; Rivas, M. Synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: SWOT analysis towards their conjugation to biomolecules for molecular recognition applications. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *19*, 4839–4856. [[CrossRef](#)]
7. Rafiee, E.; Khodayari, M. Starch as a green source for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@carbon core-shell nanoparticles synthesis: A support for 12-tungstophosphoric acid, synthesis, characterization, and application as an efficient catalyst. *Res. Chem. Intermed.* **2016**, *42*, 3523–3536. [[CrossRef](#)]
8. Mendes, R.G.; Koch, B.; Bachmatiuk, A.; El-Gendy, A.A.; Krupskaya, Y.; Springer, A.; Klingeler, R.; Schmidt, O.; Büchner, B.; Sanchez, S.; et al. Synthesis and toxicity characterization of carbon coated iron oxide nanoparticles with highly defined size distributions. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 160–169. [[CrossRef](#)]
9. Prajapat, C.L.; Sharma, P.; Gonal, M.R.; Vatsa, R.K.; Singh, M.R.; Ravikumar, G. Synthesis and magnetic study of carbon coated iron oxide nanoparticles by laser ablation in solution. *AIP Conf. Proc.* **2016**, *1731*, 130011.
10. Taylor, A.; Krupskaya, Y.; Costa, S.; Oswald, S.; Kramer, K.; Füssel, S.; Klingeler, R.; Büchner, B.; Borowiak-Palen, E.; Wirth, M.P. Functionalization of carbon encapsulated iron nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12*, 513–519. [[CrossRef](#)]
11. Bonanni, A.; Ambrosi, A.; Pumera, M. On oxygen-containing groups in chemically modified graphenes. *Chem. A Eur. J.* **2012**, *18*, 4541–4548. [[CrossRef](#)]
12. Zhang, X.; Zhao, F.; Sun, Y.; Mi, T.; Wang, L.; Li, Q.; Li, J.; Ma, W.; Liu, W.; Zuo, J.; et al. Development of a highly sensitive lateral flow immunoassay based on receptor-antibody-amorphous carbon nanoparticles to detect 22 β-lactams in milk. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *321*, 128458. [[CrossRef](#)]
13. Guoa, J.; Chenb, S.; Jinhong Guoa, J.; Ma, X. Nanomaterial Labels in lateral flow immunoassays for point-of-care-testing. *J. Mater. Sci. Technol.* **2020**, *60*, 90–104. [[CrossRef](#)]
14. Zhang, X.; Yu, X.; Wen, K.; Li, C.; Mujtaba Mari, G.; Jiang, H.; Shi, W.; Shen, J.; Wang, Z. Multiplex lateral flow immunoassays based on amorphous carbon nanoparticles for detecting three fusarium mycotoxins in maize. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 8063–8071. [[CrossRef](#)]
15. Liu, B.; Wang, L.; Tong, B.; Zhang, Y.; Sheng, W.; Pan, M.; Wang, S. Development and comparison of immunochromatographic strips with three nanomaterial labels: Colloidal gold, nanogold-polyaniline-nanogold microspheres (GPGs) and colloidal carbon for visual detection of salbutamol. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 337–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rocha-Santos, T.A.P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *62*, 28–36. [[CrossRef](#)]
17. Hervás, M.; López, M.Á.; Escarpa, A. Simplified calibration and analysis on screen-printed disposable platforms for electrochemical magnetic bead-based immunosensing of zearalenone in baby food samples. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1755–1760. [[CrossRef](#)]
18. Yang, Z.; Zhang, C.; Zhang, J.; Bai, W. Potentiometric glucose biosensor based on core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-enzyme-polypyrrole nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51*, 268–273. [[CrossRef](#)]
19. Yola, M.L.; Eren, T.; Atar, N. A novel and sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe@Au nanoparticles decorated graphene oxide. *Electrochim. Acta* **2014**, *125*, 38–47. [[CrossRef](#)]

20. Wang, J.; Sun, Y.; Wang, L.; Zhu, X.; Zhang, H.; Song, D. Surface plasmon resonance biosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au nanocomposites. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *81*, 600–606. [[CrossRef](#)]
21. Wang, Y.; Dostalek, J.; Knoll, W. Magnetic nanoparticle-enhanced biosensor based on grating-coupled surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6202–6207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Li, D.; Wang, J.; Wang, R.; Li, Y.; Abi-Ghanem, D.; Berghman, L.; Hargis, B.; Lu, H. A nanobeads amplified QCM immunosensor for the detection of avian influenza virus H5N1. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4146–4154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gan, N.; Wang, L.; Li, T.; Sang, W.; Hu, F.; Cao, Y. A Novel signal-amplified immunoassay for myoglobin using magnetic core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au-multi walled carbon nanotubes composites as labels based on one piezoelectric sensor. *Integr. Ferroelectr.* **2013**, *144*, 29–40. [[CrossRef](#)]
24. Haun, J.B.; Yoon, T.J.; Lee, H.; Weissleder, R. Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 291–304. [[CrossRef](#)]
25. Srinivasan, B.; Li, Y.; Jing, Y.; Xing, C.; Slaton, J.; Wang, J.P. A three-layer competition-based giant magnetoresistive assay for direct quantification of endoglin from human urine. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2996–3002. [[CrossRef](#)]
26. Zu, P.; Chan, C.C.; Koh, G.W.; Lew, W.S.; Jin, Y.; Liew, H.F.; Wong, W.C.; Dong, X. Enhancement of the sensitivity of magneto-optical fiber sensor by magnifying the birefringence of magnetic fluid film with Loyo-Sagnac interferometer. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *191*, 19–23. [[CrossRef](#)]
27. Hathaway, H.J.; Butler, K.S.; Adolph, N.L.; Lovato, D.M.; Belfon, R.; Fegan, D.; Monson, T.C.; Trujillo, J.E.; Tessier, T.E.; Bryant, H.C.; et al. Detection of breast cancer cells using targeted magnetic nanoparticles and ultra-sensitive magnetic field sensors. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 1–13. [[CrossRef](#)]
28. Sajid, M.; Kawde, A.N.; Daud, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *J. Saudi Chem. Soc.* **2015**, *19*, 689–705. [[CrossRef](#)]
29. 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.* **2015**, *75*, 166–180. [[CrossRef](#)]
30. 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. [[CrossRef](#)]
31. Panferov, V.G.; Safenkova, I.V.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Setting up the cut-off level of a sensitive barcode lateral flow assay with magnetic nanoparticles. *Talanta* **2017**, *164*, 69–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Liu, C.; Jia, Q.; Yang, C.; Qiao, R.; Jing, L.; Wang, L.; Xu, C.; Gao, M. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle aggregates as color reagents. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6778–6784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wu, J.; Dong, M.; Zhang, C.; Wang, Y.; Xie, M.; Chen, Y. Magnetic lateral flow strip for the detection of cocaine in urine by naked eyes and smart phone camera. *Sensors* **2017**, *17*, 1286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Workman, S.; Wells, S.K.; Pau, C.P.; Owen, S.M.; Dong, X.F.; LaBorde, R.; Granade, T.C. Rapid detection of HIV-1 p24 antigen using magnetic immuno-chromatography (MICT). *J. Virol. Methods* **2009**, *160*, 14–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zheng, C.; Wang, X.; Lu, Y.; Liu, Y. Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control* **2012**, *26*, 446–452. [[CrossRef](#)]
36. Wang, D.B.; Tian, B.; Zhang, Z.P.; Deng, J.Y.; Cui, Z.Q.; Yang, R.F.; Wang, X.Y.; Wei, H.P.; Zhang, X.E. Rapid detection of Bacillus anthracis spores using a super-paramagnetic lateral-flow immunological detectionsystem. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 661–667. [[CrossRef](#)]
37. Wang, D.B.; Tian, B.; Zhang, Z.P.; Wang, X.Y.; Fleming, J.; Bi, L.J.; Yang, R.F.; Zhang, X.E. Detection of bacillus anthracis spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on “Road Closure”. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 608–614. [[CrossRef](#)]
38. Sharma, A.; Tok, A.I.Y.; Lee, C.; Ganapathy, R.; Alagappan, P.; Liedberg, B. Magnetic field assisted preconcentration of biomolecules for lateral flow assaying. *Sens. Actuators B Chem.* **2019**, *285*, 431–437. [[CrossRef](#)]
39. Razo, S.C.; Panferov, V.G.; Safenkova, I.V.; Varitsev, Y.A.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1007*, 50–60. [[CrossRef](#)]
40. Huang, Z.; Xiong, Z.; Chen, Y.; Hu, S.; Lai, W. Sensitive and matrix-tolerant lateral flow immunoassay based on fluorescent magnetic nanobeads for the detection of clenbuterol in swine urine. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3028–3036. [[CrossRef](#)]

41. 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](#)]
42. Lago-Cachón, D.; Oliveira-Rodríguez, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C.; Martínez-García, J.C.; Moyano, A.; Salvador, M.; García, J.A. Scanning magneto-inductive sensor for quantitative assay of prostate-specific antigen. *IEEE Magn. Lett.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
43. Moyano, A.; Salvador, M.; Martínez-García, J.C.; Socoliuc, V.; Vékás, L.; Peddis, D.; Alvarez, M.A.; Fernández, M.; Rivas, M.; Blanco-López, M.C. Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 6615–6624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lago-Cachón, D.; Rivas, M.; Martínez-García, J.C.; García, J.A. Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 245501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rivas, M.; Lago-Cachón, D.; Martínez-García, J.C.; García, J.A.; Calleja, A.J. Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits. *Sens. Actuators A Phys.* **2014**, *216*, 123–127. [[CrossRef](#)]
46. Oliveira-Rodríguez, M.; López-Cobo, S.; Reyburn, H.T.; Costa-García, A.; López-Martín, S.; Yáñez-Mó, M.; Cernuda-Morollón, E.; Paschen, A.; Valés-Gómez, M.; Blanco-López, M.C. Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids. *J. Extracell. Vesicles* **2016**, *5*, 31803. [[CrossRef](#)]
47. Oliveira-Rodríguez, M.; Serrano-Pertierra, E.; García, A.C.; Martín, S.L.; Mo, M.Y.; Cernuda-Morollón, E.; Blanco-López, M.C. Point-of-care detection of extracellular vesicles: Sensitivity optimization and multiple-target detection. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 38–45. [[CrossRef](#)]
48. Wang, H.; Sun, Y.B.; Chen, Q.W.; Yu, Y.F.; Cheng, K. Synthesis of carbon-encapsulated superparamagnetic colloidal nanoparticles with magnetic-responsive photonic crystal property. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 9565–9569. [[CrossRef](#)]
49. Nakagiri, N.; Manghnani, M.H.; Ming, L.C.; Kimura, S. Crystal structure of magnetite under pressure. *Phys. Chem. Miner.* **1986**, *13*, 238–244. [[CrossRef](#)]
50. Zsigmondy, R.; Scherrer, P. Bestimmung der inneren struktur und der gröÙe von kolloidteilchen mittels röntgenstrahlen. In *Kolloidchemie Ein Lehrbuch*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1912; Volume 277, pp. 387–409.
51. Wang, L.; Bao, J.; Wang, L.; Zhang, F.; Li, Y. One-pot synthesis and bioapplication of amine-functionalized magnetite nanoparticles and hollow nanospheres. *Chem. A Eur. J.* **2006**, *12*, 6341–6347. [[CrossRef](#)]
52. LakshmiPriya, T.; Gopinath, S.C.B.; Tang, T.H. Biotin-streptavidin competition mediates sensitive detection of biomolecules in enzyme linked immunosorbent assay. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 16–20. [[CrossRef](#)]
53. Lin, Z.; Wang, X.; Li, Z.J.; Ren, S.Q.; Chen, G.N.; Ying, X.T.; Lin, J.M. Development of a sensitive, rapid, biotin-streptavidin based chemiluminescent enzyme immunoassay for human thyroid stimulating hormone. *Talanta* **2008**, *75*, 965–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sai, N.; Chen, Y.; Liu, N.; Yu, G.; Su, P.; Feng, Y.; Zhou, Z.; Liu, X.; Zhou, H.; Gao, Z.; et al. A sensitive immunoassay based on direct hapten coated format and biotin-streptavidin system for the detection of chloramphenicol. *Talanta* **2010**, *82*, 1113–1121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Liu, N.; Nie, D.; Zhao, Z.; Meng, X.; Wu, A. *Ultrasensitive Immunoassays Based on Biotin-Streptavidin Amplified System for Quantitative Determination of Family Zearalenones*; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2015; Volume 57, ISBN 8621549220.
56. Liu, R.; Liu, J.; Xie, L.; Wang, M.; Luo, J.; Cai, X. A fast and sensitive enzyme immunoassay for brain natriuretic peptide based on micro-magnetic probes strategy. *Talanta* **2010**, *81*, 1016–1021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kim, D.S.; Kim, Y.T.; Hong, S.B.; Kim, J.; Huh, N.S.; Lee, M.K.; Lee, S.J.; Kim, B., II; Kim, I.S.; Huh, Y.S.; et al. Development of lateral flow assay based on size-controlled gold nanoparticles for detection of hepatitis B surface antigen. *Sensors* **2016**, *16*, 2154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Thobhani, S.; Attree, S.; Boyd, R.; Kumarswami, N.; Noble, J.; Szymanski, M.; Porter, R.A. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *J. Immunol. Methods* **2010**, *356*, 60–69. [[CrossRef](#)]









# Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine

Amanda Moyano<sup>1,2</sup> · María Salvador<sup>2,3</sup> · José C. Martínez-García<sup>2</sup> · Vlad Socoliuc<sup>4</sup> · Ladislau Vékás<sup>4</sup> · Davide Peddis<sup>3</sup> · Miguel A. Alvarez<sup>5</sup> · María Fernández<sup>5</sup> · Montserrat Rivas<sup>2</sup> · M. Carmen Blanco-López<sup>1</sup> 

Received: 2 May 2019 / Revised: 24 June 2019 / Accepted: 10 July 2019 / Published online: 30 July 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Histamine, a biogenic amine, is abundant in fermented foods and beverages, notably wine. A high intake of this monoamine may produce adverse reactions in humans, which may be severe in individuals with a reduced capacity to catabolise extrinsic histamine. Thus, control of histamine concentration during wine production and before distribution is advisable. Simple, rapid, point-of-use bioanalytical platforms are needed because traditional methods for the detection and quantification of histamine are expensive and time-consuming. This work applies the lateral flow immunoassay technique to histamine detection. Superparamagnetic particle labels, and an inductive sensor designed to read the test line in the immunoassay, enable magnetic quantification of the molecule. The system is calibrated with histamine standards in the interval of interest for wine production. A commercial optical strip reader is used for comparison measurements. The lateral flow system has a limit of detection of 1.2 and 1.5 mg/L for the inductive and optical readers, respectively. The capability of the inductive system for histamine quantification is demonstrated for wine samples at different processing points (at the end of alcoholic fermentation, at the end of malolactic fermentation, in freshly bottled wine, and in reserve wine). The results are validated by ultra-high-performance liquid chromatography.

**Keywords** Biogenic amines · Histamine · Lateral flow immunoassay · Superparamagnetic nanoparticles · Histamine biosensor

## Introduction

Biogenic amines (BAs) are basic nitrogenous compounds with low molecular weight and biological activity. The most

frequent among them are histamine, tyramine, tryptamine, putrescine and cadaverine, and are present in several foodstuffs in a variable range of concentrations depending on the food [1]. BAs are produced by certain bacteria and yeasts during the fermentation of wines, and other beverages and foods as beer, chocolate or cheese. They can also be produced by the normal metabolic activity of animal and vegetal cells. However, in fermented products, where BAs can reach the highest concentrations, they are normally generated by the microbial decarboxylation of the corresponding amino acids. In some cases, these microorganisms, Gram-positive and Gram-negative bacteria, are part of the starter and/or the secondary microbiota, necessary to produce the desired fermentation of the product. In other cases, they are present as food contaminants [2].

Histamine is one of the most abundant and toxic BAs in fermented foods. Even in small amounts it can produce symptoms in susceptible individuals, and in high levels it can cause serious toxicological problems [3]. In alcoholic beverages, the toxic effects can be stronger due to the inhibition effect of alcohol on the intestinal epithelium detoxification system [4], which is one of the main reasons why it is so important to analyse wines.

Published in the topical collection *Nanoparticles for Bioanalysis* with guest editors María Carmen Blanco-López and Montserrat Rivas.

✉ Montserrat Rivas  
rivas@uniovi.es

✉ M. Carmen Blanco-López  
cblanco@uniovi.es

<sup>1</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, c/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>2</sup> Department of Physics, University of Oviedo, 33204 Gijón, Spain

<sup>3</sup> Institute of Structure of Matter (CNR), 00015 Monterotondo Scalo, RM, Italy

<sup>4</sup> Laboratory of Magnetic Fluids, Center for Fundamental and Advanced Technical Research, Romanian Academy - Timisoara Branch, 300223 Timisoara, Romania

<sup>5</sup> Dairy Research Institute of Asturias, IPLA (CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain

Despite the risk of histamine, there is no consensus in the legislation to regulate its concentration in food. Only in fishery products the maximum histamine levels have been set at 50 mg/kg by the US Food and Drug Administration [5] and at 100 mg/kg by the European Community [6]. In the case of wine, there are no legal restrictions, but some European countries recommend upper limits that range from 2 to 10 mg/L depending on the country [7–9]. These considerations need to be taken into account to facilitate commercial transactions.

But, besides the health risks of BAs, they can also affect the organoleptic quality of the wine. It has been reported that histamine can be generated during different stages of the winemaking process: alcoholic fermentation by yeasts [10, 11], malolactic fermentation by bacteria [12, 13] and ageing [14]. Other factors such as time, storage conditions (temperature and pH), raw material quality and possibility of contamination during ageing can contribute to increase histamine content. All kind of wines may contain BAs, but typically red wines have more than other varieties (white, rose, rice, and Porto) due to their vinification processes [15], and even high-rated wines may have them.

These considerations have prompted attentive wine producers and consumers to get interested in bioanalytical methods that are fast and unsophisticated to detect and quantify BAs for sensitive individuals and wine producers both during the winery process and in the final product.

Up to now, different methods have been reported to detect BAs. Currently, the most used analytical technique is liquid chromatography (LC) coupled to ultraviolet, fluorescence or mass spectrophotometry detectors [16]. Gas chromatography (GC) is a faster alternative for which pre-derivatisation is required to increase the volatility and decrease polarities of the BAs [17]. Capillary electrophoresis (CE) is the second most common technique for BA determination because it is very adequate for screenings [18]. The chromatographic techniques described above (LC, GC and CE) give a precise and sensitive analysis of numerous BAs simultaneously. However, they are time-consuming and require expensive instruments and qualified personnel. Non-chromatographic analyses are alternatives that include biosensors [19–21], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [22] and flow injection analysis [23]. These methods are faster but require sample pretreatment to clean up matrix interferences. Moreover, they still require specialised personnel and are difficult to implement in a cellar, where a rapid respond with the minimum complexity is needed.

Lateral flow immunoassay (LFIA) is a powerful point-of-use system for simple, rapid, portable and low-cost analysis in different fields (clinical diagnosis, food safety and environment). The LFIA technique is based on an immunochromatographic separation at nitrocellulose dipsticks, as sample flows by capillary action. The test involves different cellulosic materials (sample pad, conjugate

pad, nitrocellulose membrane and adsorption pad) assembled on a plastic backing to get robustness. The recognition of the analyte relies on the use of specific molecules immobilised on the membrane in two lines (test and control lines). LFIA combines the technology of ELISA and chromatography, overcoming some drawbacks of both methods, such as time-consumption and complexity. There are different formats depending on the analyte. The most common are sandwich format, in which two antibodies are used to recognise the analyte, and competitive format for low molecular weight compounds, such as histamine, in which a single antibody is available for the recognition of the molecule of interest. Several systems have been used as reporter labels in LFIAs: gold, iron oxide, carbon, selenium or silver nanoparticles (NPs), coloured latex beads, quantum dots, enzymes or liposomes. Frequently, LFIA operates on a purely qualitative basis, displaying a positive/negative answer. Motivated by the concern on fishery products, lateral flow devices for a rapid visual detection of histamine have been developed [24], some of which can be applied also to wine. These tests are aimed at detecting unsafe levels of histamine according to legal regulation on fish, so they provide a positive/negative response with a threshold of 50 ppm or 200 ppm.

This article focuses on adding quantitative capacities to LFIAs for histamine in red wine, while reducing the LOD to levels to match the European recommendations for this product (2–10 ppm). Associating the LFIA to a reading equipment which does not compromise the rapidity and simplicity of the test is a major challenge [25]. Recently, magnetic nanoparticles have been proposed as LFIA labels to enable, besides the visual detection, magnetic quantification [26–29]. The authors have reported on a novel inductive sensor to quantify superparamagnetic particles without the application of exciting fields, which largely reduces the complexity and cost of the device [30, 31]. The system, adapted for LFIA strips, has been successfully used to determine prostate-specific antigen concentrations in the clinical range of interest by using a sandwich format [32]. This measuring device does not require bulky components. This means that it can be easily miniaturised to a point-of-use portable device.

In this article, we use this novel approach to detect and quantify histamine, in the concentration range of interest for wines. Although the thresholds already adopted as recommendation in some EU countries are 2–10 mg/L, studies on 100 selected high-quality red wines made from seven different cultivars found that 34% were above this limit and as high as 27 mg/L [9]. The range of interest widens then to 1–100 mg/L.

We report for the first time on a histamine quantification technique for red wine based on a magnetic competitive LFIA. Red wine is especially challenging to its intensely coloured matrix that implies high background and poor reliability for

the traditional optical readers. The purple colour of red wine aggravates the problem as the classical labels are gold NPs that yield a similar red-purple colour. Therefore, this work was aimed at developing a LFIA based on superparamagnetic labels. The immunoassay is combined to an inductive sensor capable to quantify the magnetic moment of such labels. The system has been tested with red wine samples and validated against ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) analyses. The system proved to be successful as a histamine point-of-use analytical technique in the range of regulatory concern.

## Materials and methods

### Reagents and instruments for the immunoassay

Mouse histamine monoclonal antibody (MBS2025715) and histamine-BSA conjugate antigen (MBS358205) were purchased from Mybiosource. Anti-mouse IgG, bovine serum albumin (BSA), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and histamine dihydrochloride were provided by Sigma-Aldrich (Spain). Recombinant protein A/G was purchased at Thermo Scientific (MA, USA). Gold nanoparticles of size 40 nm were purchased from BB International (UK). Disposable 0.45- $\mu$ m PVDF filters were purchased from GE Healthcare Life Sciences.

Glass fibre membrane (GFCP001000) used as sample pad and backing cards (HF000MC100) were purchased from Millipore (Germany). Other materials used were nitrocellulose membranes (UniSart CN95, Sartorius, Spain) and absorbent pads (Whatman, USA). Based on previous results, the sample buffer consisted of 10 mM phosphate buffer (PB) pH 7.4 with 0.5% Tween-20 and 1% BSA.

An IsoFlow reagent dispensing system (Image Technology, USA) was used to dispense the detection lines (dispense rate 0.100  $\mu$ L/mm) and the strips were cut with a guillotine Fellowes Gamma (Spain). A portable strip reader ESE Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., Germany) was used to quantify the intensity of the test line by reflectance measurements.

### Functionalisation of labels with protein A/G

Protein A/G was conjugated to gold nanoparticles for its functionalisation. A gold colloidal titration was carried out to find the optimal concentration of protein A/G to stabilise the gold nanoparticles. The titration experiments show that 1.5 mg/mL of protein is the optimal concentration for its functionalisation. For the conjugation, 100  $\mu$ L of 1.5 mg/mL protein A/G was added to 1.5 mL of gold nanoparticles in suspension. After

shaking for 1 h, 100  $\mu$ L of blocking solution (1 mg/mL BSA in PB 10 mM, pH 7.4) was added to block the residual surfaces of the gold conjugate. After 20 min of blocking reaction, the mixture was centrifuged at 6800g for 20 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 2 mM of PB buffer, pH 7.4, with 10% sucrose and 1% BSA. The conjugate protein A/G-gold nanoparticles were stored at 4 °C until used.

Superparamagnetic magnetite nanoparticles prepared by a coprecipitation route and coated with a double layer of oleic acid [33] were functionalised using recombinant protein A/G to develop the immunoassay. Firstly, the carboxyl groups of the nanoparticles were activated using the carbodiimide chemistry. For this, 100  $\mu$ L of EDC (5 mg/mL in MES 50 mM, pH 6.00), 100  $\mu$ L of NHS (5 mg/mL in MES 50 mM, pH 6.00) and 100  $\mu$ L of recombinant protein A/G (different concentrations were used to optimise the assay) were mixed with 10  $\mu$ L of nanoparticles. After shaking for 4 h, the residual carboxyl groups on the surfaces were blocked by adding 100  $\mu$ L of the blocking solution (1% BSA in PB 10 mM, pH 7.4). Then, the mixture was centrifuged at 21,448g for 20 min. Finally, 300  $\mu$ L of supernatant was discarded and the pellet was resuspended in PB 10 mM, pH 7.4.

### Characterisation of nanoparticle conjugates by dynamic light scattering

Size distribution and  $\zeta$  potential assays were carried out with a Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a solid-state He-Ne laser (633 nm). This instrument was used to monitor the conjugation process. A total of three readings were carried out at 25 °C. Each reading was composed of 15 measurements of the backscattered (173°) intensity. Zetasizer software version 7.03 was used for data processing and analysis.

### Preparation of the immunostrips

The competitive LFIA to detect histamine was carried out in a dipstick format. The nitrocellulose membrane (25 mm wide) was incorporated into a backing plastic card to make it robust enough. Two lines of antibodies were immobilised across the nitrocellulose strip: (i) the test line to provide the result of the analysis and (ii) the control line to get the guarantee that the liquid sample has flowed adequately along the strip. Both lines were applied by the IsoFlow dispenser at a rate of 0.100  $\mu$ L/mm. A 1 mg/mL concentration of histamine-BSA conjugate was used for the test line and a 1 mg/mL concentration of anti-IgG for the control line. The nitrocellulose membrane was dried for 20 min at 37 °C after the immobilisation of the control and test lines. Then, the sample pad and the absorbent pad were settled onto a backing card with an



overlap between them of 2 mm. The complete strip was cut into individual 5-mm-wide dipsticks.

## Magnetic quantification

To provide a quantitative signal of the test line, an inductive sensor specially developed for strip immunoassays was used [32]. Its sensing head consists of a double copper line printed on a rigid insulating substrate across which alternating current flows. The magnitude and phase of the sensing head impedance are continuously monitored by a precision impedance analyser (Agilent 4294A) using 16048G test leads and 500-mV/20-MHz excitation voltage. The change of magnetic permeability produced by the particles in the surrounding of the conductor increases significantly its impedance. The test lines on the strips were scanned laterally over the sensing head by a micro-positioner, producing a peak of the impedance signal over the base line that is integrated to account for all the particles in the line no matter how they are distributed. The signal provided by the sensor is then measured in  $\Omega \cdot \text{mm}$  coming from the cumulative integral of the impedance ( $\Omega$ ) across the width of the test line (mm). This alteration in the impedance is directly proportional to the number of superparamagnetic nanoparticles at the test line. As the magnetic NPs were used in the strips as labels, this approach was used to calibrate the quantification of histamine. After the calibration with histamine standards, a similar procedure was used to quantify the concentration of histamine in real red wine samples.

## Optical measurements

A portable strip reader ESE-Quant LR3 lateral flow system (Qiagen Inc., Germany) was used to quantify the colour intensity of the test line by reflectance measurements. The optical reader analyses the reflectance at the control and test line by using two channels (LED excitation and photodiode detection). The reader scans the strip by illuminating it with a light beam and then measures the attenuation from the surface of the strip through a confocal detector. The detector registers the signal and converts it into an electrical signal that is related to the amount of analyte at the control and test lines. The device provides values in units of mm mV, resulting from integrating the electrical signal (mV) across the width of the test line (mm).

## Validation by ultra-high-performance liquid chromatography measurements

The wine samples were prepared and analysed by UHPLC following a method reported elsewhere [34]. The samples analysed correspond to red wine from different elaboration stages, at the end of the alcoholic fermentation (sample A),

freshly bottled (sample B), reserve wine (sample C) and at the end of the malolactic fermentation (samples D and E), all from the Vino de Cangas Protected Origin Region (from Asturias in Spain).

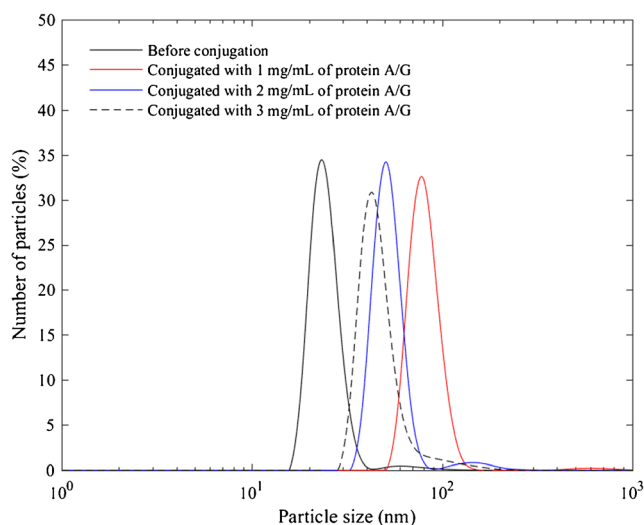
## Results and discussion

### Optimisation of the immunoassay

The first step to develop the immunoassay was to optimise the amount of protein used to coat the nanoparticles and the concentration of antibody.

### Protein A/G concentration for nanoparticle conjugation

Different concentrations of recombinant protein A/G were tested (1, 2, and 3 mg/mL). Dynamic light scattering (DLS) measurements were carried out to confirm the conjugation reaction. This technique allows comparison between nanoparticle hydrodynamic sizes before and after the conjugation reaction. The hydrodynamic diameter of nanoparticles before conjugation was 86.6 nm (PDI 0.2). The  $\zeta$  average of the hydrodynamic sizes was 479.8 nm (PDI 0.4), 193.0 nm (PDI 0.4) and 120.8 nm (PDI 0.3) after conjugation with 1 mg/mL, 2 mg/mL and 3 mg/mL of protein, respectively (Fig. 1). The results showed that, for all concentrations of protein A/G, the nanoparticle size increased after the addition of the protein. This demonstrates that the conjugation process through the carbodiimide chemistry was successful. Furthermore, the diameter of the conjugates was larger when concentration of the protein was lower. This could be



**Fig. 1** Hydrodynamic size distribution profiles of superparamagnetic iron oxide nanoparticles before (solid black line) and after conjugation with concentrations of 1 mg/mL (red), 2 mg/mL (blue) and 3 mg/mL (dashed) of protein A/G

explained because a protein molecule could bind to several nanoparticles when there were not enough molecules to cover every single nanoparticle; thus, aggregates were formed.

With the aim to select the most suitable protein concentration, the immunoassay without histamine (blank sample) was carried out in the range 1–3 mg/mL and the line tests were analysed by reflectance measurements using reader ESE-Quant LR3 lateral flow system. In all cases, the aggregates were able to flow through the nitrocellulose membrane by capillarity. The results of the measurements of the test line yielded values of 909.99, 845.73 and 639.40 mm•mV for 1 mg/mL, 2 mg/mL and 3 mg/mL of protein, respectively. The reflectance signal increases when the diameter of protein A/G-NP conjugates is larger because in this case, there are more NPs attached to each antibody unit. These agglomerates have a signal amplification effect, proportional to the size of the conjugate. In view of these results, we concluded that 1 mg/mL of recombinant protein A/G produced the largest signal. Therefore, this was the concentration chosen for the next experiments.

### Anti-histamine antibody concentration

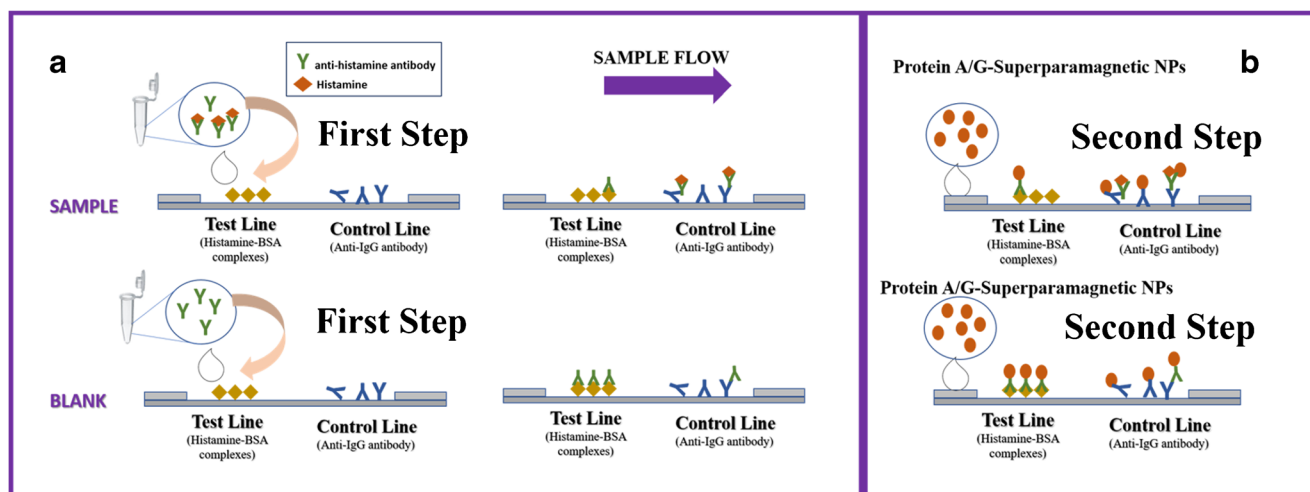
Different concentrations of antibody were assayed in order to optimise the signal. This step was made with gold conjugates and used to estimate the antibody concentration for the competitive assay. The antibody was added during the first step of the immunoassay and therefore, direct binding to the histamine-BSA complex immobilised on the membrane occurs. For the immunoassays, 13, 10, 9 and 5 mg/L of antibody were used. The reflectance measurements yielded 996.97, 984.62, 862.05 and 431.48 mm•mV, respectively. Finally, 10 mg/L was chosen because, even when the signal increases

with the concentration, there were no significant differences between 10 and 13 mg/L.

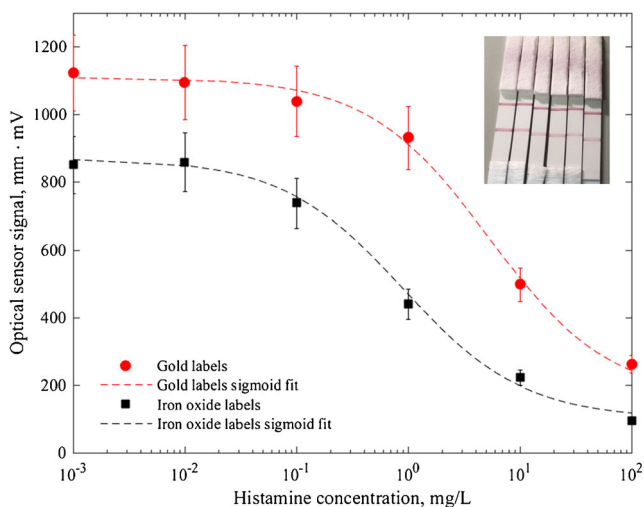
### Competitive lateral flow immunoassay procedure

The test to quantify histamine is based on a competitive immunoassay; thus, the relationship between the concentration and signals, either magnetic or optical, tends asymptotically to zero. The procedure consists of two steps, as illustrated in Fig. 2. The first step is the competition of the anti-histamine antibodies in solution for the histamine in the sample and the one immobilised at the test line. The second step is the colour developing, based on the retention of the conjugate protein A/G-NP at the test line thanks to the ability of protein A/G to bind to antibodies of any kind. The surplus of protein A/G-NP (not retained at the test line) proceed along the strip and are trapped at the control line by the Fc region of the anti-IgG and anti-histamine antibodies (see Fig. 2).

In order to calibrate the strips, several histamine standard solutions were prepared in 10 mM PB and pH 7.4. The competitive LFIA was carried out in dipstick format. For the first step, 10  $\mu$ L of histamine of different concentrations and 2  $\mu$ L of anti-histamine antibody (0.5 mg/mL) were transferred into a microtube from a stock solution to get a final concentration of the anti-histamine antibody of 10 mg/L. Then buffer was added, always keeping a final volume of 100  $\mu$ L (98  $\mu$ L of buffer for the blank and 88  $\mu$ L of buffer for the samples). The optimised running buffer had 1% BSA. The sample pad was introduced into the mixture and the solution flowed along the strip by capillary action. After 30 min, 10  $\mu$ L of NPs coated with protein A/G and 90  $\mu$ L of running buffer were added to the microtube for the developing step.



**Fig. 2** Schematic illustration of the competitive LFIA. **a** First step: immobilisation of the anti-histamine antibodies. **b** Second step: colour development



**Fig. 3** Quantification of LFIA by the optical reader using gold (red) and iron oxide (black) NPs. The lines plotted to guide the eye are four-parameter sigmoid curves. Inset: One of the series of standard samples used to obtain the red curve, with the control line on top and the test line below

### Histamine standards calibration

To calibrate the strips, several histamine standard solutions were prepared by dilution and assayed following the procedure previously described. In a first run, the experiments were conducted in a wide range of histamine concentrations. The protein concentration in the functionalisation protocol was 1.5 and 2 mg/mL for gold and magnetic nanoparticles respectively. Figure 3 shows the calibration curves in the immunoassays using gold (red) and iron oxide (black) NPs as labels. Six standard samples with histamine concentrations in the range from  $10^{-3}$  to  $10^2$  mg/L, besides a negative reference sample,

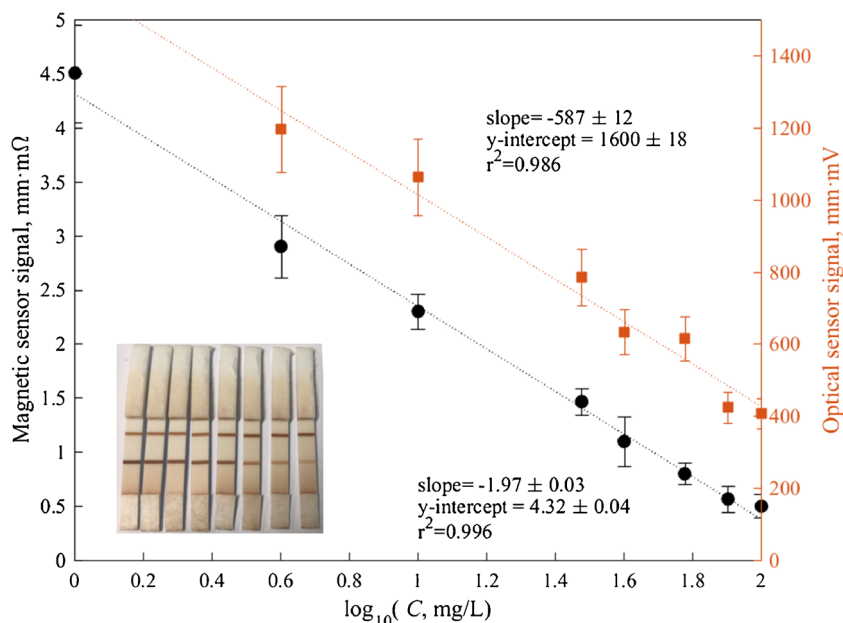
were run by triplicate and measured with the optical reader. The results yield sigmoid-shape profiles, characteristic of competitive immunoassays. For very low concentrations, the curve has an asymptotic behaviour as a result of the total occupancy of the immobilised histamine-BSA complexes by anti-histamine antibodies. The measured points have been fitted in Fig. 3 (dotted lines) using the four-parameter logistic equation:

$$S = \frac{\alpha - \delta}{1 + (C/\gamma)^\beta} + \delta \quad (1)$$

where  $S$  and  $C$  are the sensor measurement and the histamine concentration,  $\alpha$  and  $\delta$  are the  $S$ -values of the upper and lower asymptote, respectively,  $\beta$  is the slope at the inflexion point, and  $\gamma$  is the value of  $C$  corresponding to 50% of the maximum asymptote [35]. The parameter values used for the fits of Fig. 3 were respectively  $\alpha = 1110$  mm·mV,  $\beta = 0.8$ ,  $\gamma = 5.3$  mg/L, and  $\delta = 160$  mm·mV (red line) and  $\alpha = 1130$  mm·mV,  $\beta = 0.8$ ,  $\gamma = 4.5$  mg/L, and  $\delta = 190$  mm·mV (black line). This first analysis leads to the conclusion that quantification is feasible in the range of 1–100 mg/L for the gold nanoparticles and 0.1–100 mg/L for the iron oxide superparamagnetic particles. Besides their wider working range, iron oxide NPs have the advantage of enabling the magnetic pre-concentration of the analyte. Although this procedure has not been yet tested in histamine immunoassays, it has been commonly used for pre-concentration of analytes associated to different bioanalytical techniques [36]. This allows bringing the samples with lower concentrations into the working range by a simple magnetic pre-treatment.

Figure 4 shows a detailed calibration with magnetic NPs in the range 1–100 mg/L. For this, the A/G protein concentration

**Fig. 4** Inductive (left axis) and optical (right axis) signals of the magnetic LFIA as a function of the concentration of histamine. Least-squares linear regression curves are plotted as dotted lines. Inset: One of the series of standard samples used to obtain the plotted lines. The control line is on top and the test line below



**Fig. 5** LFIA run with red wine samples using (a) superparamagnetic nanoparticles and (b) colloidal gold as reporters



for functionalisation was optimised according to the DLS results. Optical and inductive readers have been used, the latter yielding better correlation factor. Dotted lines represent the least-squares linear fit of the data; slopes,  $y$ -intercepts and correlation factors are also shown on the graph. The limits of detection (LOD) have been calculated following ref. [37] from the blank-subtracted results and give values of 1.2 mg/L and 1.5 mg/L for the inductive and optical methods, respectively.

### Application to wine samples

The analytical method was tested against five samples of red wine taken at different stages of the fabrication. The only pre-treatment was a simple filtering through a 0.45- $\mu$ m PVDF filter. All the assays were performed in triplicate. The strips were measured with the inductive reader once dried, to get a quantitative reproducible reading.

Initial tests were done with both types of particles, iron oxide and the traditional colloidal gold. For comparison, Fig. 5 shows an image of both types of strips after running a sample of red wine. Even a naked eye inspection allows concluding that red wine stains the white paper. This is especially remarkable in the case of gold labels which seem not to flow as well as magnetite. In such case, a quantitative determination by optical measurements becomes impossible or is very poor. For this reason, together with the better results yielded by the calibration, the combination of iron oxide NPs and inductive sensor was chosen to perform the histamine quantification. The results are summarised in Table 1.

To validate the results, wines were also analysed by UHPLC and the results of histamine content are compared in Table 1. The error in the UHPLC measurements comes from the injection volume, which has been considered the only significant source of error. In the case of the LFIA,

several error sources were identified that influence the inductive signal value: the printing of the antibody across the membrane (which may have small inhomogeneities in the line width), the guillotine cut of the strip from the membrane original card (this produces variability in the width of the strips), and the sensor resolution. Considering that the errors produced are probabilistically independent, we can use the rule of error propagation to add up the relative errors. For this calculation, three strips have been run with each wine and each of them has been measured four times. The resulting uncertainty of the sensor signals for the different wines is in the range 2–18% for the optical measurement and 2–5% for the inductive sensor. The uncertainties of the concentrations shown in Table 1 have been obtained by the propagation rule applied to the calibration curve considering the errors of the slope and  $y$ -intercept given in Fig. 4.

The LFIA values of the histamine content measured with the commercial optical reader are deficient. Moreover, the relative uncertainties are unacceptable due mainly to a considerable variability in the three strips of each wine. The problem is associated to the variability in colour intensity of the three strips of each wine more than a lack of sensitivity of the reader itself. For this method to be useful for quantification, the removal of the interfering matrix would be necessary. In contrast, the LFIA histamine levels given by the inductive reader are remarkably similar to the reference, taking into account the margins of error. Only wines D and E fall out of these ranges, the average LFIA value being overestimated in about a 30%.

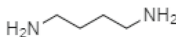

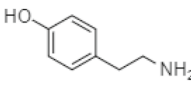
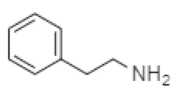
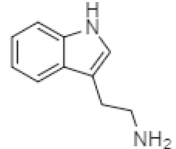
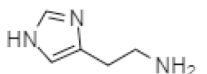
To investigate the possible origin of this deviation, several BAs have been quantified by UHPLC in the wines under study, namely, histamine, putrescine, cadaverine, tyramine, phenylethylamine, and tryptamine (see Table 2).

Of all the amines analysed, tyramine has a similar structure to histamine and reaches higher values in wines D and E, so it

**Table 1** Results obtained by magnetic LFIA coupled to the inductive sensor and UHPLC for the red wine samples analysed in this work

Wine	Stage of fabrication	LFIA and inductive sensor mg/L/ $\mu$ M		LFIA and optical sensor mg/L/ $\mu$ M		UHPLC mg/L/ $\mu$ M	
A	End of the alcoholic fermentation	46 $\pm$ 2	0.41 $\pm$ 0.02	25 $\pm$ 3	0.22 $\pm$ 0.03	44 $\pm$ 3	0.39 $\pm$ 0.03
B	Freshly bottled	82 $\pm$ 4	0.74 $\pm$ 0.04	56 $\pm$ 14	0.50 $\pm$ 0.13	83 $\pm$ 3	0.74 $\pm$ 0.03
C	Reserve wine	25 $\pm$ 3	0.22 $\pm$ 0.03	10 $\pm$ 1	0.09 $\pm$ 0.01	20 $\pm$ 3	0.18 $\pm$ 0.03
D	End of the malolactic fermentation	63 $\pm$ 4	0.57 $\pm$ 0.04	37 $\pm$ 7	0.33 $\pm$ 0.06	46 $\pm$ 3	0.42 $\pm$ 0.03
E	End of the malolactic fermentation	65 $\pm$ 5	0.58 $\pm$ 0.05	101 $\pm$ 18	0.90 $\pm$ 0.16	55 $\pm$ 3	0.49 $\pm$ 0.03

**Table 2** Concentrations of biogenic amines by UHPLC. All the samples are red wine at different steps of the fabrication

Biogenic amines	Structure	Wine A (mM)	Wine B (mM)	Wine C (mM)	Wine D (mM)	Wine E (mM)
Putrescine		1.717	1.842	0.754	1.417	1.769
Cadaverine		0.025	0.050	0.049	0.063	0.060
Tyramine		0.108	0.375	0	0.406	0.623
Phenylethylamine		0.072	0.418	0.452	0.112	0.350
Tryptamine		0	0	0	0	0
Histamine		0.39	0.742	0.175	0.416	0.494

is likely to be producing a cross-reaction effect. In order to test this hypothesis, we have run the test with standard solutions of histamine (H) and tyramine (T). In one case, we have used 2.5  $\mu\text{g}$  of histamine while in the other we have also added 6.5  $\mu\text{g}$  of tyramine. This leads to tests with 0.22 and 0.69 mM concentration of BAs. These tests were performed with iron oxide NPs as labels and evaluated with the inductive sensor. The results are shown in Table 3 together with the “apparent histamine amount,” that is obtained applying the calibration parameters given in Fig. 4. It can be concluded that the presence of tyramine interferes at the test, which displays lower magnetic signals and give rise to a value of histamine 27% larger than the nominal one. Another parameter that can be affecting these results is the different flowing velocity of the samples due to the matrix composition and viscosity.

**Table 3** Cross-reactivity study. The letters H and T stand for histamine and tyramine, respectively

BAs	Concentration of BAs (mM)	Signal by inductive measurements (mm mV)	Apparent concentration of histamine (mg/L)/(mM)
H	0.22	1.5	26/0.23
H + T	0.69	1.3	33/0.28

Although further research is needed to improve the reliability of the test, the results of LFIA are a proof of the capability of the system not only to detect, but also to quantify histamine in red wine in the range of interest for wineries and sensitive consumers.

## Conclusions

A biosensor for histamine quantification in red wines has been developed based on the combination of magnetic competitive lateral flow immunoassay strips and an inductive sensor to perform the reading out. The labels are superparamagnetic iron oxide nanoparticles 10 nm in size with a double lipidic layer as coating that enables their functionalisation. The magnetic perturbation of the NPs is detected by the inductive sensor as an increase of its impedance proportional to the number of NPs in the test line, which is in turn proportional to the number of anti-histamine antibodies. The system has been calibrated with histamine standard solutions. To validate the new method, the competitive immunoassay has been done also with traditional gold NPs and evaluated, both with gold and magnetite, with a commercial reflectance reader. The combination of magnetic particles and inductive reader gave

the best calibration correlation factor and LOD, besides the well-known magnetic pre-concentration potential.

Finally, the system was tested for reliability and validity with five real red wine samples corresponding to different stages during vinification and the final consumption state. In this case, the magnetic particles proved a new advantage compared with colloidal gold, which has a better flow of the wine sample along the paper resulting in a cleaner strip. In addition, the magnetic inductive signal does not depend on the dyeing of the paper, which is a complication for gold labels whose reading relies on an optical signal.

The measurements were cross-checked by UHPLC, leading to the finding that in two of the wine samples they can be overestimated in about 30%, probably due to cross-reactivity with tyramine. Despite this, the conclusion is that the analytical method based on magnetic LFIA is very promising for point-of-use determination of histamine. Keeping the advantages of simplicity, rapidity and low cost of traditional LFIA, the magnetic character of the labels and their detection principle provide additional advantages like the avoidance of sample pre-treatment for matrix removal, possibility of magnetic pre-concentration for low-concentration samples, and improved calibration and LOD.

**Acknowledgements** Wine samples were kindly provided by Juan M. Redondo from DOP Vino de Cangas. The authors acknowledge the technical assistance of Begoña Redruello (IPLA) in the chromatographic analysis in wine samples.

**Funding information** This work was financially supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under projects MAT2017-84959-C2-1-R, MAT2016-81955-REDT, and AGL2016-78708-R; the Council of Gijón-IUTA under grant SV-18-GIJON-1-27; and the Principality of Asturias under project IDI/2018/000185.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Ordóñez JL, Troncoso AM, García-Parrilla MDC, Callejón RM. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – a review. *Anal Chim Acta*. 2016;939:10–25.
- Daniel ML, MaCruz M, Victor L, Miguel AA, María F. Biogenic amines in dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 51(7):691–703.
- Ladero V, Calles-Enriquez M, Fernandez M, Alvarez MA. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr Nutr Food Sci*. 2010;6(2):145–56.
- Bodmer S, Imark C, Kneubühl M. Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflamm Res*. 1999;48(6):296–300.
- FDA. Fish and fishery products hazards and controls guidance, Fourth Edition, Chapter 7. April 2011;113.
- EU Directive, Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007. Official Journal of European Union 2007.
- Bauza T, Blaise A, Daumas F, Cabanis JC. Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *J Chromatogr A*. 1995;707(2):373–9.
- Landete JM, Ferrer S, Polo L, Pardo I. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J Agric Food Chem*. 2005;53(4):1119–24.
- Konakovsky V, Focke M, Hoffmann-Sommergruber K, Schmid R, Scheiner O, Moser P, et al. Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines. *Food Addit Contam A*. 2011;28(4):408–16.
- Caruso M, Fiore C, Contursi M, Salzano G, Paparella A, Romano P. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World J Microbiol Biotechnol*. 2002;18(2):159–63.
- Goñi DT, Azpilicueta CA. Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines: relationship with the utilization of amino acids during fermentation. *Am J Enol Viticult*. 2001;52(3):185–90.
- Lonvaud-Funel A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;199(1):9–13.
- Landete JM, Ferrer S, Pardo I. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *J Appl Microbiol*. 2005;99(3):580–6.
- Hernández-Orte P, Lapeña AC, Peña-Gallego A, Astrain J, Baron C, Pardo I, et al. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: factors affecting formation. *Food Res Int*. 2008;41(7):697–706.
- Peña-Gallego A, Hernández-Orte P, Cacho J, Ferreira V. High-performance liquid chromatography analysis of amines in must and wine: a review. *Food Rev Int*. 2012;28(1):71–96.
- García-Villar N, Hernández-Cassou S, Saurina J. Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2009;1216(36):6387–93.
- Cunha SC, Faria MA, Fernandes JO. Gas chromatography–mass spectrometry assessment of amines in port wine and grape juice after fast chloroformate extraction/derivatization. *J Agric Food Chem*. 2011;59(16):8742–53.
- Daniel D, Santos V, Tadeu Rajh Vidal D, do Lago C. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2015;1416.
- Kivirand K, Rinken T. Biosensors for biogenic amines: the present state of art mini-review. *Anal Lett*. 2011;44(17):2821–33.
- Basozabal I, Guerreiro A, Gomez-Caballero A, Aranzazu Goicolea M, Barrio RJ. Direct potentiometric quantification of histamine using solid-phase imprinted nanoparticles as recognition elements. *Biosens Bioelectron*. 2014;58:138–44.
- Henaio-Escobar W, del Tomo-de Román L, Domínguez-Renedo O, Alonso-Lomillo MA, Arcos-Martínez MJ. Dual enzymatic biosensor for simultaneous amperometric determination of histamine and putrescine. *Food Chem*. 2016;190:818–23.
- Marcobal A, Polo MC, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV. Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Res Int*. 2005;38(4):387–94.
- Hernández-Cassou S, Saurina J. Determination of histamine in wine samples by flow-injection analysis and multivariate calibration. *Anal Lett*. 2013;46(11):1758–68.
- Surya T, Sivaraman B, Alamelu V, Priyatharshini A, Arisekar U, Sundhar S. Rapid methods for histamine detection in fishery products. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2019;8.
- Mak WC, Beni V, Turner APF. Lateral-flow technology: from visual to instrumental. *TrAC-Trends Anal Chem*. 2016;79:297–305.
- Wang D-B, Tian B, Zhang Z-P, Deng J-Y, Cui Z-Q, Yang R-F, et al. Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using a super-

- paramagnetic lateral-flow immunological detection system. *Biosens Bioelectron.* 2013;42:661–7.
27. Wang D-B, Tian B, Zhang Z-P, Wang X-Y, Fleming J, Bi L-J, et al. Detection of *Bacillus anthracis* spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on “road closure”. *Biosens Bioelectron.* 2015;67:608–14.
  28. Wang Y, Xu H, Wei M, Gu H, Xu Q, Zhu W. Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2009;29(3): 714–8.
  29. Zheng C, Wang X, Lu Y, Liu Y. Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control.* 2012;26(2):446–52.
  30. Lago-Cachón D, Rivas M, Martínez-García JC, García JA. Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles. *Nanotechnology.* 2013;24(24):245501.
  31. Rivas M, Lago-Cachón D, Martínez-García JC, García JA, Calleja AJ. Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits. *Sensors Actuators A Phys.* 2014;216: 123–7.
  32. Lago-Cachón D, Oliveira-Rodríguez M, Rivas M, Blanco-López MC, Martínez-García JC, Moyano A, et al. Scanning magneto-inductive sensor for quantitative assay of prostate-specific antigen. *IEEE Magn Lett.* 2017;8:1–5.
  33. Bica D, Vékás L, Avdeev MV, Marinică O, Socoliuc V, Bălăsoiu M, et al. Sterically stabilized water based magnetic fluids: synthesis, structure and properties. *J Magn Magn Mater.* 2007;311(1):17–21.
  34. Redruello B, Ladero V, del Rio B, Fernández M, Martín M, Alvarez M. A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. *Food Chem.* 2016;217:117–24.
  35. Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin Chem.* 1974;20(10):1255.
  36. Aguilar-Arteaga K, Rodríguez JA, Barrado E. Magnetic solids in analytical chemistry: a review. *Anal Chim Acta.* 2010;674(2):157–65.
  37. Hayashi Y, Matsuda R, Maitani T, Imai K, Nishimura W, Ito K, et al. Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA. *Anal Chem.* 2004;76(5):1295–301.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.







## REFERENCIAS

---



## REFERENCIAS

- [1] P. Yager, G.J. Domingo, J. Gerdes, Point-of-Care Diagnostics for Global Health, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 10 (2008) 107–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160524>.
- [2] D.C. Klonoff, Point-of-care blood glucose meter accuracy in the hospital setting, *Diabetes Spectr.* 27 (2014) 174–179. <https://doi.org/10.2337/diaspect.27.3.174>.
- [3] J.R. Choi, K.W. Yong, J.Y. Choi, A.C. Cowie, Emerging point-of-care technologies for food safety analysis, *Sensors* (Switzerland). 19 (2019) 1–31. <https://doi.org/10.3390/s19040817>.
- [4] H.Y. Lau, J.R. Botella, Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection, *Front. Plant Sci.* 8 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02016>.
- [5] B.M. Cummins, F.S. Ligler, G.M. Walker, Point-of-care diagnostics for niche applications, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.01.005>.
- [6] V. Luzzi, *Point of Care Devices for Drugs of Abuse Testing*, Second Edi, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815607-0.00011-3>.
- [7] N. Mandal, S. Mitra, Di. Bandyopadhyay, Paper-Sensors for Point-of-Care Monitoring of Drinking Water Quality, *IEEE Sens. J.* 19 (2019) 7936–7941. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2019.2919269>.
- [8] C. Dincer, R. Bruch, A. Kling, P.S. Dittrich, G.A. Urban, Multiplexed Point-of-Care Testing – xPOCT, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 728–742. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.03.013>.
- [9] R.W. Peeling, D. Mabey, Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world, *Clin. Microbiol. Infect.* 16 (2010) 1062–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03279.x>.
- [10] S.K. Vashist, P.B. Lippa, L.Y. Yeo, A. Ozcan, J.H.T. Luong, Emerging Technologies for Next-Generation Point-of-Care Testing, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 692–705. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.001>.
- [11] S. Vashist, E. Schneider, J. Luong, Commercial Smartphone-Based Devices and Smart Applications for Personalized Healthcare Monitoring and Management, *Diagnostics.* 4 (2014) 104–128. <https://doi.org/10.3390/diagnostics4030104>.
- [12] S. Smith, J.G. Korvink, D. Mager, K. Land, The potential of paper-based diagnostics to meet the ASSURED criteria, *RSC Adv.* 8 (2018) 34012–34034. <https://doi.org/10.1039/C8RA06132G>.
- [13] A. Suska, D. Filippini, Autonomous lab-on-a-chip generic architecture for disposables with

## Referencias

---

- integrated actuation, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55111-z>.
- [14] A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson, P.J. Worsfold, *Biosensors: fundamentals and applications*, 1987. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)85361-1](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)85361-1).
- [15] A.P.F. Turner, *Biosensors: Sense and sensibility*, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3184–3196. <https://doi.org/10.1039/c3cs35528d>.
- [16] B. György, T.G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, É. Pállinger, E. Pap, Á. Kittel, G. Nagy, A. Falus, E.I. Buzás, *Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles*, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 2667–2688. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>.
- [17] C. Théry, K.W. Witwer, E. Aikawa, M.J. Alcaraz, J.D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G.K. Atkin-smith, D.C. Ayre, M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, N.N. Bauer, A.A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A.B. Zavec, A. Benmoussa, A.C. Berardi, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F.E. Borràs, S. Bosch, C.M. Boulanger, X. Breakefield, A.M. Breglio, Á. Meadhbh, D.R. Brigstock, A. Brisson, M.L.D. Broekman, F. Bromberg, P. Bryl-górecka, S. Buch, A.H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E.I. Buzás, B. Byrd, G. Camussi, D.R.F. Carter, S. Caruso, W. Lawrence, Y. Chang, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, R. Chin, A. Clayton, S.P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, J. Coffey, A. Cordeiro-da-silva, Y. Couch, F.A.W. Coumans, F.D.S. Junior, O. De Wever, H.A. Portillo, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L.C. Dieterich, V. Dolo, A. Paula, D. Rubio, M.R. Dourado, T.A.P. Driedonks, F. V Duarte, M. Duncan, R.M. Eichenberger, K. Ekström, S.E.L. Andaloussi, C. Elie-caille, U. Erdbrügger, J.M. Falcón-pérez, F. Fatima, J.E. Fish, M. Flores-bellver, A. Försonits, A. Frelet-barrand, C. Gilbert, M. Gimona, I. Giusti, D.C.I. Goberdhan, H. Hochberg, K.F. Hoffmann, B. Holder, H. Holthofer, A.G. Ibrahim, T. Ikezu, J.M. Inal, M. Isin, G. Jenster, L. Jiang, S.M. Johnson, G.D. Kusuma, S. Kuypers, S. Laitinen, S.M. Langevin, E. Lázaro-ibáñez, S. Le Lay, M. Lee, Y. Xin, F. Lee, S.F. Libregts, E. Ligeti, R. Lim, S.K. Lim, A. Linē, J. Lorenowicz, Á.M. Lőrincz, J. Lötvall, J. Lovett, M.C. Lowry, *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 ( MISEV2018 )*: a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, 3078 (2018). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- [18] X. Zhang, X. Yuan, H. Shi, L. Wu, H. Qian, W. Xu, *Exosomes in cancer: Small particle, big player*, *J. Hematol. Oncol.* 8 (2015) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0181-x>.
- [19] E.M. Krämer-Albers, *Ticket to Ride: Targeting Proteins to Exosomes for Brain Delivery*, *Mol. Ther.* 25 (2017) 1264–1266. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.05.001>.
- [20] D.W. Greening, S.K. Gopal, R. Xu, R.J. Simpson, W. Chen, *Exosomes and their roles in immune regulation and cancer*, *Semin. Cell Dev. Biol.* 40 (2015) 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.009>.

- [21] S. Mathivanan, H. Ji, R.J. Simpson, Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication, *J. Proteomics.* 73 (2010) 1907–1920. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>.
- [22] I. Del Conde, C.N. Shrimpton, P. Thiagarajan, J.A. López, Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation, *Blood.* 106 (2005) 1604–1611. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1095>.
- [23] C. Théry, Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications, *F1000 Biol. Rep.* 3 (2011) 1–8. <https://doi.org/10.3410/B3-15>.
- [24] A.S. Azmi, B. Bao, F.H. Sarkar, Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review, *Cancer Metastasis Rev.* 32 (2013) 623–642. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9441-9>.
- [25] K.B. Johnsen, J.M. Gudbergsson, M.N. Skov, L. Pilgaard, T. Moos, M. Duroux, A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1846 (2014) 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.005>.
- [26] C. Lässer, V. Seyed Alikhani, K. Ekström, M. Eldh, P. Torregrosa Paredes, A. Bossios, M. Sjöstrand, S. Gabrielsson, J. Lötval, H. Valadi, Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages, *J. Transl. Med.* 9 (2011) 1–8. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>.
- [27] P.J. Mitchell, J. Welton, J. Staffurth, J. Court, M.D. Mason, Z. Tabi, A. Clayton, Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer?, *J. Transl. Med.* 7 (2009) 1–13. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-4>.
- [28] M.D. Beckler, J.N. Higginbotham, J.L. Franklin, A.J. Ham, P.J. Halvey, I.E. Imasuen, C. Whitwell, M. Li, D.C. Liebler, R.J. Coffey, Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS, *Mol. Cell. Proteomics.* 12 (2013) 343–355. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.022806>.
- [29] S.H. Jalalian, M. Ramezani, S.A. Jalalian, K. Abnous, S.M. Taghdisi, Exosomes, new biomarkers in early cancer detection, *Anal. Biochem.* 571 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.013>.
- [30] Y. Zhang, Y. Liu, H. Liu, W.H. Tang, Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential, *Cell Biosci.* 9 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>.
- [31] B.K. Thakur, H. Zhang, A. Becker, I. Matei, Y. Huang, B. Costa-Silva, Y. Zheng, A. Hoshino, H. Brazier, J. Xiang, C. Williams, R. Rodriguez-Barrueco, J.M. Silva, W. Zhang, S. Hearn, O. Elemento, N. Paknejad, K. Manova-Todorova, K. Welte, J. Bromberg, H. Peinado, D. Lyden, Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection, *Cell Res.* 24 (2014) 766–769. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>.
- [32] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J.J. Lee, J.O. Lötval, Exosome-mediated

## Referencias

---

- transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>.
- [33] M.D. Bullock, A.M. Silva, P. Kanlikilicer-Unaldi, J. Filant, M.H. Rashed, A.K. Sood, G. Lopez-Berestein, G.A. Calin, Exosomal non-coding RNAs: Diagnostic, prognostic and therapeutic applications in cancer, *Non-Coding RNA.* 1 (2015) 53–68. <https://doi.org/10.3390/ncrna1010053>.
- [34] D.D. Taylor, C. Gerçel-Taylor, MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.* 110 (2008) 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.04.033>.
- [35] G. Rabinowits, C. Gerçel-Taylor, J.M. Day, D.D. Taylor, G.H. Kloecker, Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer, *Clin. Lung Cancer.* 10 (2009) 42–46. <https://doi.org/10.3816/CLC.2009.n.006>.
- [36] M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30 (2014) 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- [37] Z. Chu, D.P. Witte, X. Qi, Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes, *Exp. Cell Res.* 303 (2005) 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.09.029>.
- [38] R. Valenti, V. Huber, M. Iero, P. Filipazzi, G. Parmiani, L. Rivoltini, Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression, *Cancer Res.* 67 (2007) 2912–2915. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0520>.
- [39] T.L. Whiteside, T.L. Whiteside, Exosomes and tumor-mediated immune suppression Find the latest version : Exosomes and tumor-mediated immune suppression, *J. Clin. Invest.* 126 (2016) 1216–1223. <https://doi.org/10.1172/JCI81136.vesicular>.
- [40] M. Colombo, C. Moita, G. Van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L.F. Moita, C. Théry, G. Raposo, Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>.
- [41] J.S. Schorey, S. Bhatnagar, Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology, *Traffic.* 9 (2008) 871–881. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x>.
- [42] S. Boukouris, S. Mathivanan, Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers, *Proteomics - Clin. Appl.* 9 (2015) 358–367. <https://doi.org/10.1002/prca.201400114>.
- [43] S.A. Melo, L.B. Luecke, C. Kahlert, A.F. Fernandez, S.T. Gammon, J. Kaye, V.S. LeBleu, E.A. Mittendorf, J. Weitz, N. Rahbari, C. Reissfelder, C. Pilarsky, M.F. Fraga, D. Piwnicka-Worms, R. Kalluri, Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer, *Nature.* 523 (2015) 177–182. <https://doi.org/10.1038/nature14581>.

- [44] C. Zijlstra, W. Stoorvogel, Protasomes as a source of diagnostic biomarkers for prostate cancer, *J. Clin. Invest.* 126 (2016) 1144–1151. <https://doi.org/10.1172/JCI81128>.
- [45] B.N. Hannafon, Y.D. Trigo, C.L. Calloway, Y.D. Zhao, D.H. Lum, A.L. Welm, Z.J. Zhao, K.E. Blick, W.C. Dooley, W.Q. Ding, Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer, *Breast Cancer Res.* 18 (2016) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0753-x>.
- [46] Z. Zhao, Y. Yang, Y. Zeng, M. He, A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis, *Lab Chip.* 16 (2016) 489–496. <https://doi.org/10.1039/c5lc01117e>.
- [47] L.M. Cumba Garcia, T.E. Peterson, M.A. Cepeda, A.J. Johnson, I.F. Parney, Isolation and Analysis of Plasma-Derived Exosomes in Patients With Glioma, *Front. Oncol.* 9 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00651>.
- [48] E. Alegre, L. Zubiri, J.L. Perez-Gracia, M. González-Cao, L. Soria, S. Martín-Algarra, A. González, Circulating melanoma exosomes as diagnostic and prognosis biomarkers, *Clin. Chim. Acta.* 454 (2016) 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.12.031>.
- [49] P. Li, M. Kaslan, S.H. Lee, J. Yao, Z. Gao, Progress in exosome isolation techniques, *Theranostics.* 7 (2017) 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>.
- [50] J. Kowal, G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J.P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, C. Théry, Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E968–E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>.
- [51] D.K. Jeppesen, M.L. Hvam, B. Primdahl-Bengtson, A.T. Boysen, B. Whitehead, L. Dyrskjøt, T.F. Ørntoft, K.A. Howard, M.S. Ostfeld, Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation, *J. Extracell. Vesicles.* 3 (2014). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.25011>.
- [52] M.L. Heinemann, M. Ilmer, L.P. Silva, D.H. Hawke, A. Recio, M.A. Vorontsova, E. Alt, J. Vykoukal, Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration, *J. Chromatogr. A.* 1371 (2014) 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.026>.
- [53] J.Z. Nordin, Y. Lee, P. Vader, I. Mäger, H.J. Johansson, W. Heusermann, O.P.B. Wiklander, M. Hällbrink, Y. Seow, J.J. Bultema, J. Gilthorpe, T. Davies, P.J. Fairchild, S. Gabrielsson, N.C. Meisner-Kober, J. Lehtiö, C.I.E. Smith, M.J.A. Wood, S.E.L. Andaloussi, Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11 (2015) 879–883. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.003>.
- [54] A.M. Leshansky, A. Bransky, N. Korin, U. Dinnar, Tunable nonlinear viscoelastic “focusing” in a microfluidic device, *Phys. Rev. Lett.* 98 (2007) 1–4.



## Referencias

---

- <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.234501>.
- [55] X. Lu, X. Xuan, Continuous Microfluidic Particle Separation via Elasto-Inertial Pinched Flow Fractionation, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6389–6396. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01432>.
- [56] C. Liu, J. Guo, F. Tian, N. Yang, F. Yan, Y. Ding, J. Wei, G. Hu, G. Nie, J. Sun, Field-Free Isolation of Exosomes from Extracellular Vesicles by Microfluidic Viscoelastic Flows, *ACS Nano*. 11 (2017) 6968–6976. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02277>.
- [57] Y. Weng, Z. Sui, Y. Shan, Y. Hu, Y. Chen, L. Zhang, Y. Zhang, Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling, *Analyst*. 141 (2016) 4640–4646. <https://doi.org/10.1039/c6an00892e>.
- [58] J. Caradec, G. Kharmate, E. Hosseini-Beheshti, H. Adomat, M. Gleave, E. Guns, Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods, *Clin. Biochem.* 47 (2014) 1286–1292. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.06.011>.
- [59] C. Eichelser, I. Stückrath, V. Müller, K. Milde-Langosch, H. Wikman, K. Pantel, H. Schwarzenbach, Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients, *Oncotarget*. 5 (2014) 9650–9663. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2520>.
- [60] D.H. Atha, K.C. Ingham, Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume., *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 12108–12117.
- [61] M.A. Rider, S.N. Hurwitz, D.G. Meckes, ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep23978>.
- [62] K. Rekker, M. Saare, A.M. Roost, A.L. Kubo, N. Zarovni, A. Chiesi, A. Salumets, M. Peters, Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling, *Clin. Biochem.* 47 (2014) 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.10.020>.
- [63] C.S. Hong, L. Muller, M. Boyiadzis, T.L. Whiteside, Isolation and characterization of CD34+ blast-derived exosomes in acute myeloid leukemia, *PLoS One*. 9 (2014) 2–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103310>.
- [64] B.J. Tauro, D.W. Greening, R.A. Mathias, H. Ji, S. Mathivanan, A.M. Scott, R.J. Simpson, Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes, *Methods*. 56 (2012) 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.002>.
- [65] S. Mathivanan, J.W.E. Lim, B.J. Tauro, H. Ji, R.L. Moritz, R.J. Simpson, Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature, *Mol. Cell. Proteomics*. 9 (2010) 197–208. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900152-MCP200>.

- [66] C. Gardiner, Y.J. Ferreira, R.A. Dragovic, C.W.G. Redman, I.L. Sargent, Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis, *J. Extracell. Vesicles*. 2 (2013). <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19671>.
- [67] R.A. Dragovic, C. Gardiner, A.S. Brooks, D.S. Tannetta, D.J.P. Ferguson, P. Hole, B. Carr, C.W.G. Redman, A.L. Harris, P.J. Dobson, P. Harrison, I.L. Sargent, Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 7 (2011) 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>.
- [68] M. Franquesa, M.J. Hoogduijn, E. Ripoll, F. Luk, M. Salih, M.G.H. Betjes, J. Torras, C.C. Baan, J.M. Grinyó, A.M. Merino, Update on controls for isolation and quantification methodology of extracellular vesicles derived from adipose tissue mesenchymal stem cells, *Front. Immunol.* 5 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00525>.
- [69] C.M. Hoo, N. Starostin, P. West, M.L. Mecartney, A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions, *J. Nanoparticle Res.* 10 (2008) 89–96. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9435-7>.
- [70] G. Bryant, C. Abeynayake, J.C. Thomas, Improved particle size distribution measurements using multiangle dynamic light scattering. 2. Refinements and applications, *Langmuir*. 12 (1996) 6224–6228. <https://doi.org/10.1021/la960224o>.
- [71] A.S. Lawrie, A. Albanyan, R.A. Cardigan, I.J. MacKie, P. Harrison, Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma, *Vox Sang.* 96 (2009) 206–212. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2008.01151.x>.
- [72] C. Gercel-Taylor, S. Atay, R.H. Tullis, M. Kesimer, D.D. Taylor, Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients, *Anal. Biochem.* 428 (2012) 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.004>.
- [73] M.D. Graham, The Coulter principle: Imaginary origins, *Cytom. Part A.* 83 (2013) 1057–1061. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22398>.
- [74] R.E. Lane, D. Korbie, W. Anderson, R. Vaidyanathan, M. Trau, Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep07639>.
- [75] S.L.N. Maas, J. De Vrij, M.L.D. Broekman, Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing, *J. Vis. Exp.* (2014) 1–7. <https://doi.org/10.3791/51623>.
- [76] W. Anderson, R. Lane, D. Korbie, M. Trau, Observations of Tunable Resistive Pulse Sensing for Exosome Analysis: Improving System Sensitivity and Stability, *Langmuir*. 31 (2015) 6577–6587. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01402>.
- [77] Y. Yuana, T.H. Oosterkamp, S. Bahatyrova, B. Ashcroft, P. Garcia Rodriguez, R.M.

## Referencias

---

- Bertina, S. Osanto, Atomic force microscopy: A novel approach to the detection of nanosized blood microparticles, *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 315–323. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03654.x>.
- [78] R.J. Lobb, M. Becker, S.W. Wen, C.S.F. Wong, A.P. Wiegman, A. Leimgruber, A. Möller, Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma, *J. Extracell. Vesicles.* 4 (2015). <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031>.
- [79] G. Skogberg, J. Gudmundsdottir, S. van der Post, K. Sandström, S. Bruhn, M. Benson, L. Mincheva-Nilsson, V. Baranov, E. Telemo, O. Ekwall, Characterization of Human Thymic Exosomes, *PLoS One.* 8 (2013) 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067554>.
- [80] Y. Yuana, R.I. Koning, M.E. Kuil, P.C.N. Rensen, A.J. Koster, R.M. Bertina, S. Osanto, Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma, *J. Extracell. Vesicles.* 2 (2013) 21494. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.21494>.
- [81] S. Schachermeyer, J. Ashby, W. Zhong, Advances in field-flow fractionation for the analysis of biomolecules: Instrument design and hyphenation, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 1151–1158. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6069-5>.
- [82] D. Kang, S. Oh, S.M. Ahn, B.H. Lee, M.H. Moon, Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 3475–3480. <https://doi.org/10.1021/pr800225z>.
- [83] V. Pospichalova, J. Svoboda, Z. Dave, A. Kotrbova, K. Kaiser, D. Klemova, L. Ilkovic, A. Hampl, I. Crha, E. Jandakova, L. Minar, V. Weinberger, V. Bryja, Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer, *J. Extracell. Vesicles.* 4 (2015) 1–15. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.25530>.
- [84] E.N.M.N. t. Hoen, E.J. van der Vlist, M. Aalberts, H.C.H. Mertens, B.J. Bosch, W. Bartelink, E. Mastrobattista, E.V.B. van Gaal, W. Stoorvogel, G.J.A. Arkesteijn, M.H.M. Wauben, Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 8 (2012) 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.09.006>.
- [85] Z.J. Smith, C. Lee, T. Rojalin, R.P. Carney, S. Hazari, A. Knudson, K. Lam, H. Saari, E.L. Ibañez, T. Viitala, T. Laaksonen, M. Yliperttula, S. Wachsmann-Hogiu, Single exosome study reveals subpopulations distributed among cell lines with variability related to membrane content, *J. Extracell. Vesicles.* 4 (2015). <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28533>.
- [86] M. Smolarz, M. Pietrowska, N. Matysiak, Ł. Mielańczyk, P. Widłak, Proteome profiling of exosomes purified from a small amount of human serum: The problem of co-purified serum components, *Proteomes.* 7 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.3390/proteomes7020018>.

- [87] A.J. Abusamra, Z. Zhong, X. Zheng, M. Li, T.E. Ichim, J.L. Chin, W.P. Min, Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8<sup>+</sup> T-cell apoptosis, *Blood Cells, Mol. Dis.* 35 (2005) 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.07.001>.
- [88] J.C. Contreras-Naranjo, H.J. Wu, V.M. Ugaz, Microfluidics for exosome isolation and analysis: Enabling liquid biopsy for personalized medicine, *Lab Chip.* 17 (2017) 3558–3577. <https://doi.org/10.1039/c7lc00592j>.
- [89] M. He, J. Crow, M. Roth, Y. Zeng, A.K. Godwin, Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology, *Lab Chip.* 14 (2014) 3773–3780. <https://doi.org/10.1039/c4lc00662c>.
- [90] S. Álvaro, G. Marín, S. Vincent, Á.G. Marín, W. Van Hoeve, P. García-sánchez, N. Convine, A. Rosser-james, M. Tyler, K. Bando, L. Warncke, A. Lee, V. Vogel, Lab on a Chip Lab on a Chip, *Lab Chip.* 15 (2013) 4491–4498. <https://doi.org/10.1039/c2lc41193h>.
- [91] N. Cheng, D. Du, X. Wang, D. Liu, W. Xu, Y. Luo, Y. Lin, Recent Advances in Biosensors for Detecting Cancer-Derived Exosomes, *Trends Biotechnol.* 37 (2019) 1236–1254. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.04.008>.
- [92] L. Zhu, K. Wang, J. Cui, H. Liu, X. Bu, H. Ma, W. Wang, H. Gong, C. Lausted, L. Hood, G. Yang, Z. Hu, Label-free quantitative detection of tumor-derived exosomes through surface plasmon resonance imaging, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8857–8864. <https://doi.org/10.1021/ac5023056>.
- [93] W. Liu, J. Li, Y. Wu, S. Xing, Y. Lai, G. Zhang, Target-induced proximity ligation triggers recombinase polymerase amplification and transcription-mediated amplification to detect tumor-derived exosomes in nasopharyngeal carcinoma with high sensitivity, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.033>.
- [94] F. He, H. Liu, X. Guo, B.C. Yin, B.C. Ye, Direct Exosome Quantification via Bivalent-Cholesterol-Labeled DNA Anchor for Signal Amplification, *Anal. Chem.* 89 (2017) 12968–12975. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03919>.
- [95] P. Zhang, M. He, Y. Zeng, Ultrasensitive microfluidic analysis of circulating exosomes using a nanostructured graphene oxide/polydopamine coating, *Lab Chip.* 16 (2016) 3033–3042. <https://doi.org/10.1039/c6lc00279j>.
- [96] Q. Tian, C. He, G. Liu, Y. Zhao, L. Hui, Y. Mu, R. Tang, Y. Luo, S. Zheng, B. Wang, Nanoparticle Counting by Microscopic Digital Detection: Selective Quantitative Analysis of Exosomes via Surface-Anchored Nucleic Acid Amplification, *Anal. Chem.* 90 (2018) 6556–6562. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00189>.
- [97] F. He, J. Wang, B.C. Yin, B.C. Ye, Quantification of Exosome Based on a Copper-Mediated Signal Amplification Strategy, *Anal. Chem.* 90 (2018) 8072–8079. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01187>.
- [98] H. Wang, H. Chen, Z. Huang, T. Li, A. Deng, J. Kong, DNase I enzyme-aided fluorescence

## Referencias

---

- signal amplification based on graphene oxide-DNA aptamer interactions for colorectal cancer exosome detection, *Talanta*. 184 (2018) 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.083>.
- [99] Y. Jiang, M. Shi, Y. Liu, S. Wan, C. Cui, L. Zhang, W. Tan, Aptamer/AuNP Biosensor for Colorimetric Profiling of Exosomal Proteins, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 56 (2017) 11916–11920. <https://doi.org/10.1002/anie.201703807>.
- [100] Y. Xia, M. Liu, L. Wang, A. Yan, W. He, M. Chen, J. Lan, J. Xu, L. Guan, J. Chen, A visible and colorimetric aptasensor based on DNA-capped single-walled carbon nanotubes for detection of exosomes, *Biosens. Bioelectron.* 92 (2017) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.063>.
- [101] Y.M. Wang, J.W. Liu, G.B. Adkins, W. Shen, M.P. Trinh, L.Y. Duan, J.H. Jiang, W. Zhong, Enhancement of the Intrinsic Peroxidase-Like Activity of Graphitic Carbon Nitride Nanosheets by ssDNAs and Its Application for Detection of Exosomes, *Anal. Chem.* 89 (2017) 12327–12333. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03335>.
- [102] C. Lee, R. Carney, K. Lam, J.W. Chan, SERS analysis of selectively captured exosomes using an integrin-specific peptide ligand, *J. Raman Spectrosc.* 48 (2017) 1771–1776. <https://doi.org/10.1002/jrs.5234>.
- [103] S. López-Cobo, C. Campos-Silva, A. Moyano, M. Oliveira-Rodríguez, A. Paschen, M. Yáñez-Mó, M.C. Blanco-López, M. Valés-Gómez, Immunoassays for scarce tumour-antigens in exosomes: Detection of the human NKG2D-Ligand, MICA, in tetraspanin-containing nanovesicles from melanoma, *J. Nanobiotechnology*. 16 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0372-z>.
- [104] M. Oliveira-Rodríguez, E. Serrano-Pertierra, A.C. García, S.L. Martín, M.Y. Mo, E. Cernuda-Morollón, M.C. Blanco-López, Point-of-care detection of extracellular vesicles: Sensitivity optimization and multiple-target detection, *Biosens. Bioelectron.* 87 (2017) 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.001>.
- [105] M. Oliveira-Rodríguez, S. López-Cobo, H.T. Reyburn, A. Costa-García, S. López-Martín, M. Yáñez-Mó, E. Cernuda-Morollón, A. Paschen, M. Valés-Gómez, M.C. Blanco-López, Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids, *J. Extracell. Vesicles*. 5 (2016). <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31803>.
- [106] X. Chen, J. Lan, Y. Liu, L. Li, L. Yan, Y. Xia, F. Wu, C. Li, S. Li, J. Chen, A paper-supported aptasensor based on upconversion luminescence resonance energy transfer for the accessible determination of exosomes, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 582–588. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.012>.
- [107] L. Wang, Y. Yang, Y. Liu, L. Ning, Y. Xiang, G. Li, Bridging exosome and liposome through zirconium-phosphate coordination chemistry: A new method for exosome detection,

- Chem. Commun. 55 (2019) 2708–2711. <https://doi.org/10.1039/c9cc00220k>.
- [108] A.A.I. Sina, R. Vaidyanathan, A. Wuethrich, L.G. Carrascosa, M. Trau, Label-free detection of exosomes using a surface plasmon resonance biosensor, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 1311–1318. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01608-5>.
- [109] S. Picciolini, A. Gualerzi, R. Vanna, A. Sguassero, F. Gramatica, M. Bedoni, M. Masserini, C. Morasso, Detection and Characterization of Different Brain-Derived Subpopulations of Plasma Exosomes by Surface Plasmon Resonance Imaging, *Anal. Chem.* 90 (2018) 8873–8880. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00941>.
- [110] A. Thakur, G. Qiu, S.P. NG, J. Guan, J. Yue, Y. Lee, C.M.L. Wu, Direct detection of two different tumor-derived extracellular vesicles by SAM-AuNIs LSPR biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 94 (2017) 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.036>.
- [111] H. Im, H. Shao, Y. Il Park, V.M. Peterson, C.M. Castro, R. Weissleder, H. Lee, Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 490–495. <https://doi.org/10.1038/nbt.2886>.
- [112] T. Da Li, R. Zhang, H. Chen, Z.P. Huang, X. Ye, H. Wang, A.M. Deng, J.L. Kong, An ultrasensitive polydopamine bi-functionalized SERS immunoassay for exosome-based diagnosis and classification of pancreatic cancer, *Chem. Sci.* 9 (2018) 5372–5382. <https://doi.org/10.1039/c8sc01611a>.
- [113] E.A. Kwizera, R. O'Connor, V. Vinduska, M. Williams, E.R. Butch, S.E. Snyder, X. Chen, X. Huang, Molecular detection and analysis of exosomes using surface-enhanced Raman scattering gold nanorods and a miniaturized device, *Theranostics.* 8 (2018) 2722–2738. <https://doi.org/10.7150/thno.21358>.
- [114] Z. Weng, S. Zong, Y. Wang, N. Li, L. Li, J. Lu, Z. Wang, B. Chen, Y. Cui, Screening and multiple detection of cancer exosomes using an SERS-based method, *Nanoscale.* 10 (2018) 9053–9062. <https://doi.org/10.1039/c7nr09162a>.
- [115] S. Zong, L. Wang, C. Chen, J. Lu, D. Zhu, Y. Zhang, Z. Wang, Y. Cui, Facile detection of tumor-derived exosomes using magnetic nanobeads and SERS nanoprobe, *Anal. Methods.* 8 (2016) 5001–5008. <https://doi.org/10.1039/c6ay00406g>.
- [116] S. Yadav, K. Boriachek, M.N. Islam, R. Lobb, A. Möller, M.M. Hill, M.S. Al Hossain, N.T. Nguyen, M.J.A. Shiddiky, An Electrochemical Method for the Detection of Disease-Specific Exosomes, *ChemElectroChem.* 4 (2017) 967–971. <https://doi.org/10.1002/celec.201600391>.
- [117] S. Wang, L. Zhang, S. Wan, S. Cansiz, C. Cui, Y. Liu, R. Cai, C. Hong, I.T. Teng, M. Shi, Y. Wu, Y. Dong, W. Tan, Aptasensor with Expanded Nucleotide Using DNA Nanotetrahedra for Electrochemical Detection of Cancerous Exosomes, *ACS Nano.* 11 (2017) 3943–3949. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00373>.
- [118] Q. Zhou, A. Rahimian, K. Son, D.S. Shin, T. Patel, A. Revzin, Development of an

## Referencias

---

- aptasensor for electrochemical detection of exosomes, *Methods*. 97 (2016) 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.10.012>.
- [119] Q. Li, G.K. Tofaris, J.J. Davis, Concentration-Normalized Electroanalytical Assaying of Exosomal Markers, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3184–3190. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b05037>.
- [120] H. Zhang, Z. Wang, Q. Zhang, F. Wang, Y. Liu, Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>MXenes nanosheets catalyzed highly efficient electrogenerated chemiluminescence biosensor for the detection of exosomes, *Biosens. Bioelectron.* 124–125 (2019) 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.016>.
- [121] S. Jeong, J. Park, D. Pathania, C.M. Castro, R. Weissleder, H. Lee, Integrated Magneto-Electrochemical Sensor for Exosome Analysis, *ACS Nano*. 10 (2016) 1802–1809. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b07584>.
- [122] J. Park, H.Y. Lin, J.P. Assaker, S. Jeong, C.H. Huang, A. Kurdi, K. Lee, K. Fraser, C. Min, S. Eskandari, S. Routray, B. Tannous, R. Abdi, L. Riella, A. Chandraker, C.M. Castro, R. Weissleder, H. Lee, J.R. Azzi, Integrated Kidney Exosome Analysis for the Detection of Kidney Transplant Rejection, *ACS Nano*. 11 (2017) 11041–11046. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.7b05083>.
- [123] X. Doldán, P. Fagúndez, A. Cayota, J. Laíz, J.P. Tosar, Electrochemical Sandwich Immunosensor for Determination of Exosomes Based on Surface Marker-Mediated Signal Amplification, *Anal. Chem.* 88 (2016) 10466–10473. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02421>.
- [124] M. Arnold, M.S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality, *Gut*. 66 (2017) 683–691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.
- [125] M.H. Silla Santos, Biogenic amines: Their importance in foods, *Int. J. Food Microbiol.* 29 (1996) 213–231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1).
- [126] A. Halász, Á. Baráth, L. Simon-Sarkadi, W. Holzapfel, Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends Food Sci. Technol.* 5 (1994) 42–49. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90070-1).
- [127] M.E. Arena, J.M. Landete, M.C. Manca De Nadra, I. Pardo, S. Ferrer, Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X1B isolated from wine, *J. Appl. Microbiol.* 105 (2008) 158–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03725.x>.
- [128] J.W. Burnett, Histamine poisoning, *Cutis*. 46 (1990) 388.
- [129] M. Fernández, D.M. Linares, B. Del Río, V. Ladero, M.A. Alvarez, HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: Correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms, *J. Dairy Res.* 74 (2007) 276–282.

- <https://doi.org/10.1017/S0022029907002488>.
- [130] S. Wöhrl, W. Hemmer, M. Focke, K. Rappersberger, R. Jarisch, Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine, *Allergy Asthma Proc.* 25 (2004) 305–311.
- [131] F. Wantke, M. Gotz, R. Jarisch, Histamine-free diet: Treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches, *Clin. Exp. Allergy.* 23 (1993) 982–985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1993.tb00287.x>.
- [132] FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, Fourth Edition, Chapter 7. April 2011; 113, (n.d.).
- [133] EU Directive, Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007. Official Journal of European Union. 2007, (n.d.).
- [134] M. Caruso, C. Fiore, M. Contursi, G. Salzano, A. Paparella, P. Romano, Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (2002) 159–163. <https://doi.org/10.1023/A:1014451728868>.
- [135] A. Lonvaud-Funel, Biogenic amines in wines: Role of lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* 199 (2001) 9–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00157-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00157-4).
- [136] P. Hernández-Orte, A.C. Lapeña, A. Peña-Gallego, J. Astrain, C. Baron, I. Pardo, L. Polo, S. Ferrer, J. Cacho, V. Ferreira, Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation, *Food Res. Int.* 41 (2008) 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.05.002>.
- [137] A. Peña-Gallego, P. Hernández-Orte, J. Cacho, V. Ferreira, High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Amines in Must and Wine: A Review, *Food Rev. Int.* 28 (2012) 71–96. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.594973>.
- [138] J.M. Landete, S. Ferrer, L. Polo, I. Pardo, Biogenic amines in wines from three Spanish regions, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1119–1124. <https://doi.org/10.1021/jf049340k>.
- [139] A. Önal, S.E.K. Tekkeli, C. Önal, A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chem.* 138 (2013) 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.056>.
- [140] Gobierno de España. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, (n.d.). <http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/laboratorios/subdetalle/Histamina.htm>.
- [141] E.H. Soufleros, E. Bouloumpasi, A. Zotou, Z. Loukou, Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration, *Food Chem.* 101 (2007) 704–716. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.028>.
- [142] M.T. Kelly, A. Blaise, M. Larroque, Rapid automated high performance liquid



## Referencias

---

- chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7385–7392. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.047>.
- [143] S.C. Cunha, M.A. Faria, J.O. Fernandes, Gas chromatography-mass spectrometry assessment of amines in port wine and grape juice after fast chloroformate extraction/derivatization, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 8742–8753. <https://doi.org/10.1021/jf201379x>.
- [144] D. Daniel, V.B. dos Santos, D.T.R. Vidal, C.L. do Lago, Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1416 (2015) 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.065>.
- [145] P. Ginterová, J. Marák, A. Staňová, V. Maier, J. Ševčík, D.Š. Kaniansky, Determination of selected biogenic amines in red wines by automated on-line combination of capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 904 (2012) 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.018>.
- [146] S. Lata, S. Yadav, R. Bhardwaj, C.S. Pundir, Amperometric determination of tyramine in sauce and beer by epoxy resin biocomposite membrane bound tyramine oxidase, *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.* 5 (2011) 104–110. <https://doi.org/10.1007/s11694-011-9117-5>.
- [147] B. Bóka, N. Adányi, J. Szamos, D. Virág, A. Kiss, Putrescine biosensor based on putrescine oxidase from *Kocuria rosea*, *Enzyme Microb. Technol.* 51 (2012) 258–262. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.07.006>.
- [148] B. Batra, S. Lata, R. Devi, S. Yadav, C.S. Pundir, Fabrication of an amperometric tyramine biosensor based on immobilization of tyramine oxidase on AgNPs/L-Cys-modified Au electrode, *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 3869–3876. <https://doi.org/10.1007/s10008-012-1828-y>.
- [149] M. Di Fusco, R. Federico, A. Boffi, A. Macone, G. Favero, F. Mazzei, Characterization and application of a diamine oxidase from *Lathyrus sativus* as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer, (2011) 707–716. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5131-z>.
- [150] W. Henao-Escobar, L. Del Torno-De Román, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Dual enzymatic biosensor for simultaneous amperometric determination of histamine and putrescine, *Food Chem.* 190 (2016) 818–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.035>.
- [151] I. Basozabal, A. Guerreiro, A. Gomez-Caballero, M. Aranzazu Goicolea, R.J. Barrio, Direct potentiometric quantification of histamine using solid-phase imprinted nanoparticles as recognition elements, *Biosens. Bioelectron.* 58 (2014) 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.054>.
- [152] T. Ramon-Marquez, A.L. Medina-Castillo, A. Fernandez-Gutierrez, J.F. Fernandez-

- Sanchez, Novel optical sensing film based on a functional nonwoven nanofibre mat for an easy, fast and highly selective and sensitive detection of tryptamine in beer, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.091>.
- [153] J.L. Ordóñez, A.M. Troncoso, M.D.C. García-Parrilla, R.M. Callejón, Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review, *Anal. Chim. Acta.* 939 (2016) 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.045>.
- [154] A. Marcobal, M.C. Polo, P.J. Martín-Álvarez, M. V. Moreno-Arribas, Biogenic amine content of red Spanish wines: Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines, *Food Res. Int.* 38 (2005) 387–394. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.008>.
- [155] R.C. Alves, M.F. Barroso, M.B. González-García, M.B.P.P. Oliveira, C. Delerue-Matos, New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56 (2016) 2304–2319. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.831026>.
- [156] L. Luo, Z.L. Xu, J.Y. Yang, Z.L. Xiao, Y.J. Li, R.C. Beier, Y.M. Sun, H.T. Lei, H. Wang, Y.D. Shen, Synthesis of novel haptens and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of histamine in foods, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 12299–12308. <https://doi.org/10.1021/jf504689x>.
- [157] S. Hernández-Cassou, J. Saurina, Determination of Histamine in Wine Samples by Flow-Injection Analysis and Multivariate Calibration, *Anal. Lett.* 46 (2013) 1758–1768. <https://doi.org/10.1080/00032719.2012.679642>.
- [158] J. Hu, S.Q. Wang, L. Wang, F. Li, B. Pingguan-Murphy, T.J. Lu, F. Xu, Advances in paper-based point-of-care diagnostics, *Biosens. Bioelectron.* 54 (2014) 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.075>.
- [159] D. Quesada-González, A. Merkoçi, Nanoparticle-based lateral flow biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 73 (2015) 47–63. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.050>.
- [160] M. Sajid, A.N. Kawde, M. Daud, Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review, *J. Saudi Chem. Soc.* 19 (2015) 689–705. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.09.001>.
- [161] E.B. Bahadır, M.K. Sezgintürk, Lateral flow assays: Principles, designs and labels, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 286–306. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.006>.
- [162] K.M. Koczula, A. Gallotta, Lateral flow assays, *Essays Biochem.* 60 (2016) 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>.
- [163] Lateral Flow Tests, (n.d.) 1–6.
- [164] J. Singh, S. Sharma, S. Nara, Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water, *Food Chem.* 170 (2015) 470–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.092>.

## Referencias

---

- [165] Merck Millipore, Design Considerations for Lateral Flow Test Strips, EMD Millipore. (2015) 1–32. [https://www.emdmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site-/Merck/en\\_US/Freestyle/DIV-Divisional/Events/pdfs/lateral-flow-presentations/design-considerations-for-lateral-flow-test-strips.pdf](https://www.emdmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site-/Merck/en_US/Freestyle/DIV-Divisional/Events/pdfs/lateral-flow-presentations/design-considerations-for-lateral-flow-test-strips.pdf).
- [166] R. Pelton, Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 925–942. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.05.005>.
- [167] Merck Millipore, Rapid Lateral Flow Test Strips Considerations for Product Development Hi-Flow Rapid Lateral Flow OEM Guide Cover.indd 2 2/27/14 4:17 PM, (n.d.).
- [168] J.Y. Lee, Y.A. Kim, M.Y. Kim, Y.T. Lee, B.D. Hammock, H.S. Lee, Importance of membrane selection in the development of immunochromatographic assays for low-molecular weight compounds, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.052>.
- [169] T. Mahmoudi, M. de la Guardia, B. Baradaran, Lateral flow assays towards point-of-care cancer detection: A review of current progress and future trends, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 125 (2020) 115842. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115842>.
- [170] N. Ariffin, N.A. Yusof, J. Abdullah, S.F. Abd Rahman, N.H. Ahmad Raston, N. Kusnin, S. Suraiya, Lateral Flow Immunoassay for Naked Eye Detection of Mycobacterium tuberculosis, *J. Sensors.* 2020 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/1365983>.
- [171] Z. Wu, Simultaneous Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* by a SERS-Based Lateral Flow Immunochromatographic Assay, *Food Anal. Methods.* 12 (2019) 1086–1091. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01444-4>.
- [172] L. Zeng, S. Song, Q. Zheng, P. Luo, X. Wu, H. Kuang, Development of a sandwich ELISA and immunochromatographic strip for the detection of shrimp tropomyosin, *Food Agric. Immunol.* 30 (2019) 606–619. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1609912>.
- [173] G.W. Pratt, A. Fan, B. Melakeberhan, C.M. Klapperich, A competitive lateral flow assay for the detection of tenofovir, *Anal. Chim. Acta.* 1017 (2018) 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.039>.
- [174] H.W. Wen, W. Borejsza-Wysocki, T.R. Decory, R.A. Durst, Development of a competitive liposome-based lateral flow assay for the rapid detection of the allergenic peanut protein Ara h1, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1217–1226. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3292-3>.
- [175] X. Huang, Z.P. Aguilar, H. Xu, W. Lai, Y. Xiong, Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2015) 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.032>.
- [176] L. Anfossi, F. Di Nardo, S. Cavallera, C. Giovannoli, C. Baggiani, Multiplex lateral flow immunoassay: An overview of strategies towards high-throughput point-of-need testing, *Biosensors.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3390/bios9010002>.

- [177] S. Song, N. Liu, Z. Zhao, E. Njumbe Ediage, S. Wu, C. Sun, S. De Saeger, A. Wu, Multiplex lateral flow immunoassay for mycotoxin determination, *Anal. Chem.* 86 (2014) 4995–5001. <https://doi.org/10.1021/ac500540z>.
- [178] Y. Chen, Q. Chen, M. Han, J. Zhou, L. Gong, Y. Niu, Y. Zhang, L. He, L. Zhang, Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut, *Food Chem.* 213 (2016) 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.116>.
- [179] Y. Sun, J. Yang, S. Yang, Q. Sang, M. Teng, Q. Li, R. Deng, L. Feng, X. Hu, G. Zhang, Development of an immunochromatographic lateral flow strip for the simultaneous detection of aminoglycoside residues in milk, *RSC Adv.* 8 (2018) 9580–9586. <https://doi.org/10.1039/c8ra01116h>.
- [180] C. Xing, L. Liu, S. Song, M. Feng, H. Kuang, C. Xu, Ultrasensitive immunochromatographic assay for the simultaneous detection of five chemicals in drinking water, *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.004>.
- [181] J. Gantelius, C. Hamsten, M. Neiman, J.M. Schwenk, A. Persson, H. Andersson-Svahn, A lateral flow protein microarray for rapid determination of contagious bovine pleuropneumonia status in bovine serum, *J. Microbiol. Methods.* 82 (2010) 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.007>.
- [182] N.A. Taranova, N.A. Byzova, V. V. Zaiko, T.A. Starovoitova, Y.Y. Vengerov, A. V. Zherdev, B.B. Dzantiev, Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: Application to the determination of drugs of abuse, *Microchim. Acta.* 180 (2013) 1165–1172. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1043-2>.
- [183] A. Carrio, C. Sampedro, J.L. Sanchez-Lopez, M. Pimienta, P. Campoy, Automated low-cost smartphone-based lateral flow saliva test reader for drugs-of-abuse detection, *Sensors (Switzerland).* 15 (2015) 29569–29593. <https://doi.org/10.3390/s151129569>.
- [184] E.M. Fenton, M.R. Mascarenas, G.P. López, S.S. Sibbett, Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 1 (2009) 124–129. <https://doi.org/10.1021/am800043z>.
- [185] C.Z. Li, K. Vandenberg, S. Prabhulkar, X. Zhu, L. Schneper, K. Methee, C.J. Rosser, E. Almeida, Paper based point-of-care testing disc for multiplex whole cell bacteria analysis, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4342–4348. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.04.035>.
- [186] Y. Zhao, H. Wang, P. Zhang, C. Sun, X. Wang, X. Wang, R. Yang, C. Wang, L. Zhou, Rapid multiplex detection of 10 foodborne pathogens with an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep21342>.
- [187] W. Hong, L. Huang, H. Wang, J. Qu, Z. Guo, C. Xie, Z. Zhu, Y. Zhang, Z. Du, Y. Yan, Y.

## Referencias

---

- Zheng, H. Huang, R. Yang, L. Zhou, Development of an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay for profiling antibodies against *Yersinia pestis*, *J. Microbiol. Methods.* 83 (2010) 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.005>.
- [188] The Multi-Drug Test, (n.d.). <https://www.medicaexpo.com/prod/prima-lab-sa/product-99429-706870.html>.
- [189] Alfa's Instant-View Multi-Drug Urine Test, (n.d.). <https://www.alfascientific.com/products/multi-drug-urine-tests/>.
- [190] M. Zhang, L. Yan, Q. Huang, T. Bu, S. Yu, X. Zhao, J. Wang, D. Zhang, Highly sensitive simultaneous detection of major ochratoxins by an immunochromatographic assay, *Food Control.* 84 (2018) 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.035>.
- [191] Z. Xie, D. Kong, L. Liu, S. Song, H. Kuang, Development of ic-ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the simultaneous detection of avermectin and ivermectin, *Food Agric. Immunol.* 28 (2017) 439–451. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1293016>.
- [192] C. Wang, F. Hou, Y. Ma, Simultaneous quantitative detection of multiple tumor markers with a rapid and sensitive multicolor quantum dots based immunochromatographic test strip, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.051>.
- [193] C.W. Yen, H. De Puig, J.O. Tam, J. Gómez-Márquez, I. Bosch, K. Hamad-Schifferli, L. Gehrke, Multicolored silver nanoparticles for multiplexed disease diagnostics: Distinguishing dengue, yellow fever, and Ebola viruses, *Lab Chip.* 15 (2015) 1638–1641. <https://doi.org/10.1039/c5lc00055f>.
- [194] F. Di Nardo, E. Alladio, C. Baggiani, S. Cavalera, C. Giovannoli, G. Spano, L. Anfossi, Colour-encoded lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and type-B fumonisins in a single Test line, *Talanta.* 192 (2019) 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.037>.
- [195] G.A. Posthuma-Trumpie, J. Korf, A. Van Amerongen, Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 569–582. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2287-2>.
- [196] M. Koets, I. Sander, J. Bogdanovic, G. Doekes, A. Van Amerongen, A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal alpha-amylase at the workplace, *J. Environ. Monit.* 8 (2006) 942–946. <https://doi.org/10.1039/b605389k>.
- [197] A.Y. Kolosova, S. De Saeger, L. Sibanda, R. Verheijen, C. Van Peteghem, Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 2103–2107. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1642-z>.

- [198] B.S. Delmulle, S.M.D.G. De Saeger, L. Sibanda, I. Barna-Vetro, C.H. Van Peteghem, Development of an immunoassay-based lateral flow dipstick for the rapid detection of aflatoxin B1 in pig feed, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3364–3368. <https://doi.org/10.1021/jf0404804>.
- [199] A.Y. Kolosova, L. Sibanda, F. Dumoulin, J. Lewis, E. Duveiller, C. Van Peteghem, S. De Saeger, Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges, *Anal. Chim. Acta.* 616 (2008) 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.029>.
- [200] M.J. Day, Introduction to Antigen and Antibody Assays, *Top. Companion Anim. Med.* 30 (2015) 128–131. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2015.12.001>.
- [201] A.J.T. George, C.E. Urch, M.A. Ritter, Polyclonal and Monoclonal Antibodies, *Diagnostic Ther. Antibodies.* 40 (2003) 23–34. <https://doi.org/10.1385/1-59259-076-4:23>.
- [202] N.S. Lipman, L.R. Jackson, L.J. Trudel, F. Weis-Garcia, Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources, *ILAR J.* 46 (2005) 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>.
- [203] R. Wong, H. Tse, Lateral Flow Immunoassay (Google eBook), (2008) 236. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3>.
- [204] G. Fassina, M. Ruvo, G. Palombo, A. Verdoliva, M. Marino, Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 49 (2001) 481–490. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00215-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00215-9).
- [205] B.V. Ayyar, S. Arora, C. Murphy, R. O’Kennedy, Affinity chromatography as a tool for antibody purification, *Methods.* 56 (2012) 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.10.007>.
- [206] G. Kim, J. Lim, C. Mo, A Review on Lateral Flow Test Strip for Food Safety, *J. Biosyst. Eng.* 40 (2015) 277–283. <https://doi.org/10.5307/jbe.2015.40.3.277>.
- [207] A. Chen, S. Yang, Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay, *Biosens. Bioelectron.* 71 (2015) 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.041>.
- [208] B. Ngom, Y. Guo, X. Wang, D. Bi, Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: A review, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1113–1135. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3661-4>.
- [209] A. V. Ivanov, I. V. Safenkova, A. V. Zherdev, B.B. Dzantiev, Nucleic acid lateral flow assay with recombinase polymerase amplification: Solutions for highly sensitive detection of RNA virus, *Talanta.* 210 (2020) 120616. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120616>.
- [210] Ö. Akineden, T. Wittwer, K. Geister, M. Plötz, E. Usleber, Nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) with integrated DNA probe degradation for the rapid detection of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* in powdered infant formula, *Food*

## Referencias

---

- Control. 109 (2020) 106952. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106952>.
- [211] Y. Zhao, F. Chen, Q. Li, L. Wang, C. Fan, Isothermal Amplification of Nucleic Acids, *Chem. Rev.* 115 (2015) 12491–12545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>.
- [212] X. Zuo, F. Xia, Y. Xiao, K.W. Plaxco, Sensitive and selective amplified fluorescence DNA detection based on exonuclease III-aided target recycling, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 1816–1818. <https://doi.org/10.1021/ja909551b>.
- [213] J.S. Hartig, I. Grüne, S.H. Najafi-Shoushtari, M. Famulok, Sequence-Specific Detection of MicroRNAs by Signal-Amplifying Ribozymes, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 722–723. <https://doi.org/10.1021/ja038822u>.
- [214] C.C. Chang, C.C. Chen, S.C. Wei, H.H. Lu, Y.H. Liang, C.W. Lin, Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification, *Sensors (Switzerland)*. 12 (2012) 8319–8337. <https://doi.org/10.3390/s120608319>.
- [215] B. Schweitzer, S. Wiltshire, J. Lambert, S. O'Malley, K. Kukanskis, Z. Zhu, S.F. Kingsmore, P.M. Lizardi, D.C. Ward, Immunoassays with rolling circle DNA amplification: A versatile platform for ultrasensitive antigen detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 10113–10119. <https://doi.org/10.1073/pnas.170237197>.
- [216] X. Zhang, K. Xiao, L. Cheng, H. Chen, B. Liu, S. Zhang, J. Kong, Visual and highly sensitive detection of cancer cells by a colorimetric aptasensor based on cell-triggered cyclic enzymatic signal amplification, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5567–5572. <https://doi.org/10.1021/ac501068k>.
- [217] E.J. Cho, L. Yang, M. Lew, A.D. Ellington, Using a deoxyribozyme ligase and rolling circle amplification to detect a non-nucleic acid analyte, ATP, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 2022–2023. <https://doi.org/10.1021/ja043490u>.
- [218] J. Elbaz, B. Shlyahovsky, I. Willner, A DNAzyme cascade for the amplified detection of Pb<sup>2+</sup> ions or L-histidine, *Chem. Commun.* (2008) 1569–1571. <https://doi.org/10.1039/b716774a>.
- [219] P. Lü, Y. He, F. Lin, Y. Pan, Q. Yu, Z. Guo, C. Li, H. Wang, Q. Yao, Y. Fu, K. Chen, Rapid detection of *Bombyx mori* bidensovirus by loop-mediated isothermal amplification based lateral flow dipstick assay for field applications, *J. Invertebr. Pathol.* 163 (2019) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.03.003>.
- [220] Y. Jiang, S. Chen, Y. Zhao, X. Yang, S. Fu, J.L. McKillip, E.M. Fox, C. Man, Multiplex loop-mediated isothermal amplification-based lateral flow dipstick for simultaneous detection of 3 food-borne pathogens in powdered infant formula, *J. Dairy Sci.* 103 (2020) 4002–4012. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17538>.
- [221] Z. Xunhui, K. Qingming, T. Qunbo, D. Haojie, Z. Lesheng, L. Di, D. Jianzu, Z. Bin, C. Rui, W. Tianping, L. Shaohong, DNA detection of *Paragonimus westermani*: Diagnostic validity of a new assay based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with a

- lateral flow dipstick, *Acta Trop.* 200 (2019) 105185. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105185>.
- [222] R. Reid, B. Chatterjee, S.J. Das, S. Ghosh, T.K. Sharma, Application of aptamers as molecular recognition elements in lateral flow assays, *Anal. Biochem.* 593 (2020) 113574. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113574>.
- [223] V. Ranganathan, S. Srinivasan, A. Singh, M.C. DeRosa, An aptamer-based colorimetric lateral flow assay for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), *Anal. Biochem.* 588 (2020) 113471. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113471>.
- [224] Q. Yu, Q. Zhao, S. Wang, S. Zhao, S. Zhang, Y. Yin, Y. Dong, Development of a lateral flow aptamer assay strip for facile identification of theranostic exosomes isolated from human lung carcinoma cells, *Anal. Biochem.* 594 (2020) 113591. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113591>.
- [225] S. Dalirirad, A.J. Steckl, Lateral flow assay using aptamer-based sensing for on-site detection of dopamine in urine, *Anal. Biochem.* 596 (2020) 113637. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113637>.
- [226] V. Gubala, L.F. Harris, A.J. Ricco, M.X. Tan, D.E. Williams, Point of care diagnostics: Status and future, *Anal. Chem.* 84 (2012) 487–515. <https://doi.org/10.1021/ac2030199>.
- [227] S. Thobhani, S. Attree, R. Boyd, N. Kumarswami, J. Noble, M. Szymanski, R.A. Porter, Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins, *J. Immunol. Methods.* 356 (2010) 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.02.007>.
- [228] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, Q. Huo, Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 58 (2007) 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>.
- [229] L.C. Waters, R.W. Counts, A. Palausky, R.A. Jenkins, Colorimetric strip tests: a comparison of visual and reflectometric measurements for quantitative applications, *J. Hazard. Mater.* 43 (1995) 1–12. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(95\)00022-M](https://doi.org/10.1016/0304-3894(95)00022-M).
- [230] A.E. Urusov, A. V. Zherdev, B.B. Dzantiev, Towards lateral flow quantitative assays: Detection approaches, *Biosensors.* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/bios9030089>.
- [231] D. Tang, J.C. Saucedo, Z. Lin, S. Ott, E. Basova, I. Goryacheva, S. Biselli, J. Lin, R. Niessner, D. Knopp, Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2009) 514–518. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.07.030>.
- [232] H. Xu, J. Chen, J. Birrenkott, J.X. Zhao, S. Takalkar, K. Baryeh, G. Liu, Gold-nanoparticle-decorated silica nanorods for sensitive visual detection of proteins, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7351–7359. <https://doi.org/10.1021/ac502249f>.
- [233] Y. Ji, M. Ren, Y. Li, Z. Huang, M. Shu, H. Yang, Y. Xiong, Y. Xu, Detection of aflatoxin B1



## Referencias

---

- with immunochromatographic test strips: Enhanced signal sensitivity using gold nanoflowers, *Talanta*. 142 (2015) 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.048>.
- [234] M.O. Rodríguez, L.B. Covián, A.C. García, M.C. Blanco-López, Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays, *Talanta*. 148 (2016) 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.068>.
- [235] Y. Shen, G. Shen, Signal-Enhanced Lateral Flow Immunoassay with Dual Gold Nanoparticle Conjugates for the Detection of Hepatitis B Surface Antigen, *ACS Omega*. 4 (2019) 5083–5087. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03593>.
- [236] J. Zhu, N. Zou, D. Zhu, J. Wang, Q. Jin, J. Zhao, H. Mao, Simultaneous detection of high-sensitivity cardiac troponin I and myoglobin by modified sandwich lateral flow immunoassay: Proof of principle, *Clin. Chem.* 57 (2011) 1732–1738. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.171694>.
- [237] Y. Zhong, Y. Chen, L. Yao, D. Zhao, L. Zheng, G. Liu, Y. Ye, W. Chen, Gold nanoparticles based lateral flow immunoassay with largely amplified sensitivity for rapid melamine screening, *Microchim. Acta*. 183 (2016) 1989–1994. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1812-9>.
- [238] H. Kuang, C. Xing, C. Hao, L. Liu, L. Wang, C. Xu, Rapid and highly sensitive detection of lead ions in drinking water based on a strip immunosensor, *Sensors (Switzerland)*. 13 (2013) 4214–4224. <https://doi.org/10.3390/s130404214>.
- [239] D.H. Choi, S.K. Lee, Y.K. Oh, B.W. Bae, S.D. Lee, S. Kim, Y.B. Shin, M.G. Kim, A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1999–2002. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.01.019>.
- [240] G. Shen, H. Xu, A.S. Gurung, Y. Yang, G. Liu, Lateral flow immunoassay with the signal enhanced by gold nanoparticle aggregates based on polyamidoamine dendrimer, *Anal. Sci.* 29 (2013) 799–804. <https://doi.org/10.2116/analsci.29.799>.
- [241] A. Ambrosi, F. Airò, A. Merkoçi, Enhanced gold nanoparticle based ELISA for a breast cancer biomarker, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1151–1156. <https://doi.org/10.1021/ac902492c>.
- [242] Y. He, S. Zhang, X. Zhang, M. Baloda, A.S. Gurung, H. Xu, X. Zhang, G. Liu, Ultrasensitive nucleic acid biosensor based on enzyme-gold nanoparticle dual label and lateral flow strip biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2018–2024. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.079>.
- [243] C. Parolo, A. de la Escosura-Muñiz, A. Merkoçi, Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes, *Biosens. Bioelectron.* 40 (2013) 412–416. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.049>.
- [244] Z. Wang, J. Jing, Y. Ren, Y. Guo, N. Tao, Q. Zhou, H. Zhang, Y. Ma, Y. Wang, Preparation and application of selenium nanoparticles in a lateral flow immunoassay for clenbuterol

- detection, *Mater. Lett.* 234 (2019) 212–215. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.09.056>.
- [245] Z. Wang, D. Zhi, Y. Zhao, H. Zhang, X. Wang, Y. Ru, H. Li, Lateral flow test strip based on colloidal selenium immunoassay for rapid detection of melamine in milk, milk powder, and animal feed, *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 1699–1707. <https://doi.org/10.2147/IJN.S58942>.
- [246] E.M. Linares, L.T. Kubota, J. Michaelis, S. Thalhammer, Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: Evaluation and comparison of bioconjugates, *J. Immunol. Methods.* 375 (2012) 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.11.003>.
- [247] M. Blažková, P. Rauch, L. Fukal, Strip-based immunoassay for rapid detection of thiabendazole, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2122–2128. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.02.011>.
- [248] G.A. Posthuma-Trumpie, J.H. Wichers, M. Koets, L.B.J.M. Berendsen, A. Van Amerongen, Amorphous carbon nanoparticles: A versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 593–600. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5340-5>.
- [249] N. Wiriyaichaiorn, H. Sirikett, W. Maneeprakorn, T. Dharakul, Carbon nanotag based visual detection of influenza A virus by a lateral flow immunoassay, *Microchim. Acta.* 184 (2017) 1827–1835. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2191-6>.
- [250] P. Noguera, G.A. Posthuma-Trumpie, M. Van Tuil, F.J. Van Der Wal, A. De Boer, A.P.H.A. Moers, A. Van Amerongen, Carbon nanoparticles in lateral flow methods to detect genes encoding virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 831–838. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4334-z>.
- [251] C. Suárez-Pantaleón, J. Wichers, A. Abad-Somovilla, A. Van Amerongen, A. Abad-Fuentes, Development of an immunochromatographic assay based on carbon nanoparticles for the determination of the phytoestrogen forchlorfenuron, *Biosens. Bioelectron.* 42 (2013) 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.11.001>.
- [252] B. Holubová-Mičková, M. Blažková, L. Fukal, P. Rauch, Development of colloidal carbon-based immunochromatographic strip for rapid detection of carbaryl in fruit juices, *Eur. Food Res. Technol.* 231 (2010) 467–473. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1301-z>.
- [253] X. Gong, J. Cai, B. Zhang, Q. Zhao, J. Piao, W. Peng, W. Gao, D. Zhou, M. Zhao, J. Chang, A review of fluorescent signal-based lateral flow immunochromatographic strips, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 5079–5091. <https://doi.org/10.1039/c7tb01049d>.
- [254] N.A. Taranova, A.N. Berlina, A. V. Zherdev, B.B. Dzantiev, “Traffic light” immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk, *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.049>.
- [255] Y. Wang, Z. Li, H. Lin, P.N. Siddanakoppalu, J. Zhou, G. Chen, Z. Yu, Quantum-dot-based

## Referencias

---

- lateral flow immunoassay for the rapid detection of crustacean major allergen tropomyosin, *Food Control*. 106 (2019) 106714. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106714>.
- [256] R. Li, C. Meng, Y. Wen, W. Fu, P. He, Fluorometric lateral flow immunoassay for simultaneous determination of three mycotoxins (aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol) using quantum dot microbeads, *Microchim. Acta*. 186 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3879-6>.
- [257] F. Wu, H. Yuan, C. Zhou, M. Mao, Q. Liu, H. Shen, Y. Cen, Z. Qin, L. Ma, L. Song Li, Multiplexed detection of influenza A virus subtype H5 and H9 via quantum dot-based immunoassay, *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.002>.
- [258] J.G. Bruno, Application of DNA aptamers and quantum dots to lateral flow test strips for detection of foodborne pathogens with improved sensitivity versus colloidal gold, *Pathogens*. 3 (2014) 341–355. <https://doi.org/10.3390/pathogens3020341>.
- [259] X. Yan, K. Wang, W. Lu, W. Qin, D. Cui, J. He, CdSe/ZnS Quantum Dot-Labeled Lateral Flow Strips for Rapid and Quantitative Detection of Gastric Cancer Carbohydrate Antigen 72-4, *Nanoscale Res. Lett.* 11 (2016). <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1355-3>.
- [260] Z. Li, Y. Wang, J. Wang, Z. Tang, J.G. Pounds, Y. Lin, Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7008–7014. <https://doi.org/10.1021/ac101405a>.
- [261] A. Foubert, N. V. Beloglazova, S. De Saeger, Comparative study of colloidal gold and quantum dots as labels for multiplex screening tests for multi-mycotoxin detection, *Anal. Chim. Acta*. 955 (2017) 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.042>.
- [262] X. Li, W. Li, Q. Yang, X. Gong, W. Guo, C. Dong, J. Liu, L. Xuan, J. Chang, Rapid and quantitative detection of prostate specific antigen with a quantum dot nanobeads-based immunochromatography test strip, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 6 (2014) 6406–6414. <https://doi.org/10.1021/am5012782>.
- [263] H. Duan, X. Chen, W. Xu, J. Fu, Y. Xiong, A. Wang, Quantum-DoT submicrobead-based immunochromatographic assay for quantitative and sensitive detection of zearalenone, *Talanta*. 132 (2015) 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.076>.
- [264] M. Ren, H. Xu, X. Huang, M. Kuang, Y. Xiong, H. Xu, Y. Xu, H. Chen, A. Wang, Immunochromatographic assay for ultrasensitive detection of aflatoxin B1 in maize by highly luminescent quantum dot beads, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 6 (2014) 14215–14222. <https://doi.org/10.1021/am503517s>.
- [265] Q.Q. Fu, Y. Tang, C.Y. Shi, X.L. Zhang, J.J. Xiang, X. Liu, A novel fluorescence-quenching immunochromatographic sensor for detection of the heavy metal chromium, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 399–402. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.048>.

- [266] X. Chen, Y. Xu, J. Yu, J. Li, X. Zhou, C. Wu, Q. Ji, Y. Ren, L. Wang, Z. Huang, H. Zhuang, L. Piao, R. Head, Y. Wang, J. Lou, Antigen detection based on background fluorescence quenching immunochromatographic assay, *Anal. Chim. Acta.* 841 (2014) 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.025>.
- [267] Y. Chen, Q. Fu, J. Xie, H. Wang, Y. Tang, Development of a high sensitivity quantum dot-based fluorescent quenching lateral flow assay for the detection of zearalenone, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 2169–2175. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01652-1>.
- [268] H. Jiang, X. Li, Y. Xiong, K. Pei, L. Nie, Y. Xiong, Silver nanoparticle-based fluorescence-quenching lateral flow immunoassay for sensitive detection of Ochratoxin A in grape juice and wine, *Toxins (Basel)*. 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/toxins9030083>.
- [269] L. Anfossi, F. Di Nardo, S. Cavallera, C. Giovannoli, G. Spano, E.S. Speranskaya, I.Y. Goryacheva, C. Baggiani, A lateral flow immunoassay for straightforward determination of fumonisin mycotoxins based on the quenching of the fluorescence of CdSe/ZnS quantum dots by gold and silver nanoparticles, *Microchim. Acta.* 185 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2642-0>.
- [270] F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu, X. Chen, X. Liu, Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy, *Analyst.* 135 (2010) 1839–1854. <https://doi.org/10.1039/c0an00144a>.
- [271] P. Zhao, Y. Wu, Y. Zhu, X. Yang, X. Jiang, J. Xiao, Y. Zhang, C. Li, Upconversion fluorescent strip sensor for rapid determination of *Vibrio anguillarum*, *Nanoscale.* 6 (2014) 3804–3809. <https://doi.org/10.1039/c3nr06549a>.
- [272] R.S. Niedbala, T.L. Vail, H. Feindt, S. Li, J.L. Burton, *Multiphoton up-converting phosphors for use in rapid immunoassays*, *In-Vitro Diagnostic Instrum.* 3913 (2000) 193–203. <https://doi.org/10.1117/12.382032>.
- [273] Y. Gong, Y. Zheng, B. Jin, M. You, J. Wang, X.J. Li, M. Lin, F. Xu, F. Li, A portable and universal upconversion nanoparticle-based lateral flow assay platform for point-of-care testing, *Talanta.* 201 (2019) 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.105>.
- [274] R.L. Liang, X.P. Xu, T.C. Liu, J.W. Zhou, X.G. Wang, Z.Q. Ren, F. Hao, Y.S. Wu, Rapid and sensitive lateral flow immunoassay method for determining alpha fetoprotein in serum using europium (III) chelate microparticles-based lateral flow test strips, *Anal. Chim. Acta.* 891 (2015) 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.053>.
- [275] J. Liu, H. Shi, G. Cong, J. Chen, X. Zhang, D. Shi, L. Cao, X. Wang, J. Zhang, Z. Ji, Z. Jing, L. Feng, Development of a rapid and sensitive europium (III) chelate microparticle-based lateral flow test strip for the detection and epidemiological surveillance of porcine epidemic diarrhea virus, *Arch. Virol.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04566-x>.
- [276] P. Preechakasedkit, K. Osada, Y. Katayama, N. Ruecha, K. Suzuki, O. Chailapakul, D. Citterio, Gold nanoparticle core-europium(iii) chelate fluorophore-doped silica shell hybrid

## Referencias

---

- nanocomposites for the lateral flow immunoassay of human thyroid stimulating hormone with a dual signal readout, *Analyst*. 143 (2018) 564–570. <https://doi.org/10.1039/c7an01799e>.
- [277] K.K. Fung, C.P.Y. Chan, R. Renneberg, Development of enzyme-based bar code-style lateral-flow assay for hydrogen peroxide determination, *Anal. Chim. Acta*. 634 (2009) 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.064>.
- [278] J. Zhang, Q. Yu, W. Qiu, K. Li, L. Qian, X. Zhang, G. Liu, Gold-platinum nanoflowers as a label and as an enzyme mimic for use in highly sensitive lateral flow immunoassays: application to detection of rabbit IgG, *Microchim. Acta*. 186 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3464-z>.
- [279] W. He, W. Wamer, Q. Xia, J.J. Yin, P.P. Fu, Enzyme-like activity of nanomaterials, *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 32 (2014) 186–211. <https://doi.org/10.1080/10590501.2014.907462>.
- [280] Q. Wang, H. Wei, Z. Zhang, E. Wang, S. Dong, Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 105 (2018) 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.012>.
- [281] D. Duan, K. Fan, D. Zhang, S. Tan, M. Liang, Y. Liu, J. Zhang, P. Zhang, W. Liu, X. Qiu, G.P. Kobinger, G. Fu Gao, X. Yan, Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.025>.
- [282] N. Khreich, P. Lamourette, H. Boutal, K. Devilliers, C. Créminon, H. Volland, Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing, *Anal. Biochem.* 377 (2008) 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.032>.
- [283] K.A. Edwards, A.J. Baeumner, Optimization of DNA-tagged dye-encapsulating liposomes for lateral-flow assays based on sandwich hybridization, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1335–1343. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0705-x>.
- [284] B. Zhang, W. Gao, J. Piao, Y. Xiao, B. Wang, W. Peng, X. Gong, Z. Wang, H. Yang, J. Chang, Effective Bioactivity Retention of Low-Concentration Antibodies on HFBI-Modified Fluorescence ICTS for Sensitive and Rapid Detection of PSA, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10 (2018) 14549–14558. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b02945>.
- [285] D. Lou, L. Fan, Y. Cui, Y. Zhu, N. Gu, Y. Zhang, Fluorescent Nanoprobes with Oriented Modified Antibodies to Improve Lateral Flow Immunoassay of Cardiac Troponin i, *Anal. Chem.* 90 (2018) 6502–6508. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05410>.
- [286] Q. Zeng, X. Mao, H. Xu, S. Wang, G. Liu, Quantitative Immunochromatographic Strip Biosensor for the Detection of Carcinoembryonic Antigen Tumor Biomarker in Human Plasma, *Am. J. Biomed. Sci.* 1 (2009) 70–79. <https://doi.org/10.5099/aj090100070>.
- [287] Q.F. Xu, H. Xu, H. Gu, J.B. Li, Y. Wang, M. Wei, Development of lateral flow immunoassay

- system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I, *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 702–707. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.009>.
- [288] W. Lu, K. Wang, K. Xiao, W. Qin, Y. Hou, H. Xu, X. Yan, Y. Chen, D. Cui, J. He, Dual Immunomagnetic Nanobeads-Based Lateral Flow Test Strip for Simultaneous Quantitative Detection of Carcinoembryonic Antigen and Neuron Specific Enolase, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep42414>.
- [289] Y. Wang, H. Xu, M. Wei, H. Gu, Q. Xu, W. Zhu, Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay, *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 714–718. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.011>.
- [290] D.S. Kim, Y.T. Kim, S.B. Hong, J. Kim, N.S. Huh, M.K. Lee, S.J. Lee, B. Il Kim, I.S. Kim, Y.S. Huh, B.G. Choi, Development of lateral flow assay based on size-controlled gold nanoparticles for detection of hepatitis B surface antigen, *Sensors (Switzerland)*. 16 (2016). <https://doi.org/10.3390/s16122154>.
- [291] Y. Chen, K. Wang, Z. Liu, R. Sun, D. Cui, J. He, Rapid detection and quantification of tumor marker carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4) using a superparamagnetic immunochromatographic strip, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 2319–2327. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9328-z>.
- [292] C. Zheng, X. Wang, Y. Lu, Y. Liu, Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay, *Food Control*. 26 (2012) 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.040>.
- [293] A.M. Claudio Paroloa, Mariana Medina-Sánchez, Alfredo de la Escosura-Muñiza, Simple paper architecture modifications lead to enhanced sensitivity in nanoparticle based lateral flow immunoassay, *Lab Chip*. 13 (2013) 386–390.
- [294] I.N. Katis, P.J.W. He, R.W. Eason, C.L. Sones, Improved sensitivity and limit-of-detection of lateral flow devices using spatial constrictions of the flow-path, *Biosens. Bioelectron.* 113 (2018) 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.001>.
- [295] S. Kumar, P. Bhushan, V. Krishna, S. Bhattacharya, Tapered lateral flow immunoassay based point-of-care diagnostic device for ultrasensitive colorimetric detection of dengue NS1, *Biomicrofluidics*. 12 (2018). <https://doi.org/10.1063/1.5035113>.
- [296] R. Tang, H. Yang, Y. Gong, Z. Liu, X.J. Li, T. Wen, Z.G. Qu, S. Zhang, Q. Mei, F. Xu, Improved Analytical Sensitivity of Lateral Flow Assay using Sponge for HBV Nucleic Acid Detection, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01558-x>.
- [297] J.R. Choi, K.W. Yong, R. Tang, Y. Gong, T. Wen, H. Yang, A. Li, Y.C. Chia, B. Pingguan-Murphy, F. Xu, Lateral Flow Assay Based on Paper–Hydrogel Hybrid Material for Sensitive Point-of-Care Detection of Dengue Virus, *Adv. Healthc. Mater.* 6 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600920>.

## Referencias

---

- [298] F. Paquin, J. Rivnay, A. Salleo, N. Stingelin, C. Silva, Multi-phase semicrystalline microstructures drive exciton dissociation in neat plastic semiconductors, *J. Mater. Chem. C*. 3 (2015) 10715–10722. <https://doi.org/10.1039/b000000x>.
- [299] J. Yang, K. Wang, H. Xu, W. Yan, Q. Jin, D. Cui, Detection platforms for point-of-care testing based on colorimetric, luminescent and magnetic assays: A review, *Talanta*. 202 (2019) 96–110. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.054>.
- [300] K. Faulstich, R. Gruler, M. Eberhard, D. Lentzsch, K. Haberstroh, Lateral flow immunoassay, *Japanese J. Med. Mycol.* 57 (2016) J 125. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3>.
- [301] D. Pyo, J. Yoo, New trends in fluorescence immunochromatography, *J. Immunoass. Immunochem.* 33 (2012) 203–222. <https://doi.org/10.1080/15321819.2011.618863>.
- [302] A.N. Berlina, N.A. Taranova, A. V. Zherdev, Y.Y. Vengerov, B.B. Dzantiev, Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 4997–5000. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6876-3>.
- [303] H. Yang, D. Li, R. He, Q. Guo, K. Wang, X. Zhang, P. Huang, D. Cui, A novel quantum dots-based point of care test for syphilis, *Nanoscale Res. Lett.* 5 (2010) 875–881. <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9578-1>.
- [304] J. Liu, Z. Geng, Z. Fan, J. Liu, H. Chen, Point-of-care testing based on smartphone: The current state-of-the-art (2017–2018), *Biosens. Bioelectron.* 132 (2019) 17–37. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.068>.
- [305] I. Chip, Nano Biomed Eng Smartphone-Based Fluorescent Diagnostic System for, 9 (2017) 21–26. <https://doi.org/10.5101/nbe.v9i1.p21-26.Abstract>.
- [306] O. Mudanyali, S. Dimitrov, U. Sikora, S. Padmanabhan, I. Navruz, A. Ozcan, Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone, *Lab Chip*. 12 (2012) 2678–2686. <https://doi.org/10.1039/c2lc40235a>.
- [307] X. Li, F. Yang, J.X.H. Wong, H.Z. Yu, Integrated Smartphone-App-Chip System for On-Site Parts-Per-Billion-Level Colorimetric Quantitation of Aflatoxins, *Anal. Chem.* 89 (2017) 8908–8916. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01379>.
- [308] W. Xiao, C. Huang, F. Xu, J. Yan, H. Bian, Q. Fu, K. Xie, L. Wang, Y. Tang, A simple and compact smartphone-based device for the quantitative readout of colloidal gold lateral flow immunoassay strips, *Sensors Actuators, B Chem.* 266 (2018) 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.110>.
- [309] Y. Hou, K. Wang, K. Xiao, W. Qin, W. Lu, W. Tao, D. Cui, Smartphone-Based Dual-Modality Imaging System for Quantitative Detection of Color or Fluorescent Lateral Flow Immunochromatographic Strips, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017). <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2078-9>.

- [310] S.J. Yeo, K. Choi, B.T. Cuc, N.N. Hong, D.T. Bao, N.M. Ngoc, M.Q. Le, N.L.K. Hang, N.C. Thach, S.K. Mallik, H.S. Kim, C.K. Chong, H.S. Choi, H.W. Sung, K. Yu, H. Park, Smartphone-based fluorescent diagnostic system for highly pathogenic H5N1 viruses, *Theranostics*. 6 (2016) 231–242. <https://doi.org/10.7150/thno.14023>.
- [311] M. You, M. Lin, Y. Gong, S. Wang, A. Li, L. Ji, H. Zhao, K. Ling, T. Wen, Y. Huang, D. Gao, Q. Ma, T. Wang, A. Ma, X. Li, F. Xu, Household Fluorescent Lateral Flow Strip Platform for Sensitive and Quantitative Prognosis of Heart Failure Using Dual-Color Upconversion Nanoparticles, *ACS Nano*. 11 (2017) 6261–6270. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02466>.
- [312] S. Feng, R. Caire, B. Cortazar, M. Turan, A. Wong, A. Ozcan, Immunochromatographic diagnostic test analysis using google glass, *ACS Nano*. 8 (2014) 3069–3079. <https://doi.org/10.1021/nn500614k>.
- [313] X. Zhu, P. Shah, S. Stoff, H. Liu, C.Z. Li, A paper electrode integrated lateral flow immunosensor for quantitative analysis of oxidative stress induced DNA damage, *Analyst*. 139 (2014) 2850–2857. <https://doi.org/10.1039/c4an00313f>.
- [314] F. Lu, K.H. Wang, Y. Lin, Rapid, quantitative and sensitive immunochromatographic assay based on stripping voltammetric detection of a metal ion label, *Analyst*. 130 (2005) 1513–1517. <https://doi.org/10.1039/b507682j>.
- [315] G. Liu, Y.Y. Lin, J. Wang, H. Wu, C.M. Wai, Y. Lin, Disposable electrochemical immunosensor diagnosis device based on nanoparticle probe and immunochromatographic strip, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7644–7653. <https://doi.org/10.1021/ac070691i>.
- [316] K. Inoue, P. Ferrante, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, A competitive immunochromatographic assay for testosterone based on electrochemical detection, *Talanta*. 73 (2007) 886–892. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.05.008>.
- [317] D. Du, J. Wang, L. Wang, D. Lu, Y. Lin, Integrated lateral flow test strip with electrochemical sensor for quantification of phosphorylated cholinesterase: Biomarker of exposure to organophosphorus agents, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1380–1385. <https://doi.org/10.1021/ac202391w>.
- [318] Z.X. Zou, J. Wang, H. Wang, Y.Q. Li, Y. Lin, An integrated electrochemical device based on immunochromatographic test strip and enzyme labels for sensitive detection of disease-related biomarkers, *Talanta*. 94 (2012) 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.046>.
- [319] Y. Xiang, Y. Lu, An invasive DNA approach toward a general method for portable quantification of metal ions using a personal glucose meter, *Chem. Commun.* 49 (2013) 585–587. <https://doi.org/10.1039/c2cc37156a>.
- [320] J. Su, J. Xu, Y. Chen, Y. Xiang, R. Yuan, Y. Chai, Personal glucose sensor for point-of-



## Referencias

---

- care early cancer diagnosis, *Chem. Commun.* 48 (2012) 6909–6911. <https://doi.org/10.1039/c2cc32729e>.
- [321] S. Chen, N. Gan, H. Zhang, F. Hu, T. Li, H. Cui, Y. Cao, Q. Jiang, A portable and antibody-free sandwich assay for determination of chloramphenicol in food based on a personal glucose meter, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2499–2507. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8478-8>.
- [322] Y. Xiang, Y. Lu, Using personal glucose meters and functional DNA sensors to quantify a variety of analytical targets, *Nat. Chem.* 3 (2011) 697–703. <https://doi.org/10.1038/nchem.1092>.
- [323] X. Zhu, M. Sarwar, Q. Yue, C. Chen, C.Z. Li, Biosensing of DNA oxidative damage: A model of using glucose meter for non-glucose biomarker detection, *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 979–987. <https://doi.org/10.2147/IJN.S125437>.
- [324] J. Zhang, Z. Shen, Y. Xiang, Y. Lu, Integration of Solution-Based Assays onto Lateral Flow Device for One-Step Quantitative Point-of-Care Diagnostics Using Personal Glucose Meter, *ACS Sensors.* 1 (2016) 1091–1096. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00270>.
- [325] H. Huang, G. Zhao, W. Dou, Portable and quantitative point-of-care monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 using a personal glucose meter based on immunochromatographic assay, *Biosens. Bioelectron.* 107 (2018) 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.027>.
- [326] X. Zhu, M. Sarwar, J.J. Zhu, C. Zhang, A. Kaushik, C.Z. Li, Using a glucose meter to quantitatively detect disease biomarkers through a universal nanozyme integrated lateral fluidic sensing platform, *Biosens. Bioelectron.* 126 (2019) 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.033>.
- [327] Y. Zhao, X. Chen, S. Lin, D. Du, Y. Lin, Integrated immunochromatographic strip with glucometer readout for rapid quantification of phosphorylated proteins, *Anal. Chim. Acta.* 964 (2017) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.011>.
- [328] L. Blanco-Covián, V. Montes-García, A. Girard, M.T. Fernández-Abedul, J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, K. Faulds, D. Graham, M.C. Blanco-López, Au@Ag SERRS tags coupled to a lateral flow immunoassay for the sensitive detection of pneumolysin, *Nanoscale.* 9 (2017) 2051–2058. <https://doi.org/10.1039/c6nr08432j>.
- [329] V. Tran, B. Walkenfort, M. König, M. Salehi, S. Schlücker, Rapid, Quantitative, and Ultrasensitive Point-of-Care Testing: A Portable SERS Reader for Lateral Flow Assays in Clinical Chemistry, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 58 (2019) 442–446. <https://doi.org/10.1002/anie.201810917>.
- [330] X. Fu, Z. Cheng, J. Yu, P. Choo, L. Chen, J. Choo, A SERS-based lateral flow assay biosensor for highly sensitive detection of HIV-1 DNA, *Biosens. Bioelectron.* 78 (2016) 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.099>.

- [331] X. Wang, N. Choi, Z. Cheng, J. Ko, L. Chen, J. Choo, Simultaneous detection of dual nucleic acids using a SERS-based lateral flow assay biosensor, *Anal. Chem.* 89 (2017) 1163–1169. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03536>.
- [332] D. Zhang, L. Huang, B. Liu, H. Ni, L. Sun, E. Su, H. Chen, Z. Gu, X. Zhao, Quantitative and ultrasensitive detection of multiplex cardiac biomarkers in lateral flow assay with core-shell SERS nanotags, *Biosens. Bioelectron.* 106 (2018) 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.062>.
- [333] Y. Ryu, Z. Jin, M.S. Kang, H.S. Kim, Increase in the detection sensitivity of a lateral flow assay for a cardiac marker by oriented immobilization of antibody, *Biochip J.* 5 (2011) 193–198. <https://doi.org/10.1007/s13206-011-5301-2>.
- [334] M. Gao, Detection by Using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticle Aggregates as Color Reagents, *Anal. Chem.* (2011) 6778–6784.
- [335] Y.M. Huang, D.F. Liu, W.H. Lai, Y.H. Xiong, W.C. Yang, K. Liu, S.Y. Wang, Rapid detection of aflatoxin M1 by immunochromatography combined with enrichment based on immunomagnetic nanobead, *Fenxi Huaxue/ Chinese J. Anal. Chem.* 42 (2014) 654–659. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60731-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60731-8).
- [336] F. Li, F. Li, D. Luo, W. Lai, Y. Xiong, H. Xu, Biotin-exposure-based immunomagnetic separation coupled with nucleic acid lateral flow biosensor for visibly detecting viable *Listeria monocytogenes*, *Anal. Chim. Acta.* 1017 (2018) 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.009>.
- [337] Q. Li, S. Zhang, Y. Cai, Y. Yang, F. Hu, X. Liu, X. He, Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using fluorescence immunochromatographic assay combined with immunomagnetic separation technique, *Int. J. Food Sci. Technol.* 52 (2017) 1559–1566. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13428>.
- [338] M.J. Jacinto, J.R.C. Trabuco, B. V. Vu, G. Garvey, M. Khodadady, A.M. Azevedo, M.R. Aires-Barros, L. Chang, K. Kourentzi, D. Litvinov, R.C. Willson, Enhancement of lateral flow assay performance by electromagnetic relocation of reporter particles, *PLoS One.* 13 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186782>.
- [339] R.F. Butler, S.K. Banerjee, Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite, *J. Geophys. Res.* 80 (1975) 4049–4058. <https://doi.org/10.1029/jb080i029p04049>.
- [340] W.F. Brown, Thermal fluctuations of a single-domain particle, *Phys. Rev.* 130 (1963) 1677–1686.
- [341] X. Battle, A. Labarta, Finite-size effects in fine particles: Magnetic and transport properties, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 35 (2002). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/35/6/201>.
- [342] W. Xie, Z. Guo, F. Gao, Q. Gao, D. Wang, B.S. Liaw, Q. Cai, X. Sun, X. Wang, L. Zhao, Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide

## Referencias

---

- nanoparticles for magnetic theranostics, *Theranostics*. 8 (2018) 3284–3307. <https://doi.org/10.7150/thno.25220>.
- [343] L. Khanna, N.K. Verma, S.K. Tripathi, Burgeoning tool of biomedical applications - Superparamagnetic nanoparticles, *J. Alloys Compd.* 752 (2018) 332–353. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.04.093>.
- [344] J. Dulińska-Litewka, A. Łazarczyk, P. Halubiec, O. Szafranski, K. Karnas, A. Karewicz, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles-current and prospective medical applications, *Materials (Basel)*. 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12040617>.
- [345] S. Xia, Z. Yu, D. Liu, C. Xu, W. Lai, Developing a novel immunochromatographic test strip with gold magnetic bifunctional nanobeads (GMBN) for efficient detection of *Salmonella choleraesuis* in milk, *Food Control*. 59 (2016) 507–512. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.028>.
- [346] J. Hwang, D. Kwon, S. Lee, S. Jeon, Detection of: *Salmonella* bacteria in milk using gold-coated magnetic nanoparticle clusters and lateral flow filters, *RSC Adv.* 6 (2016) 48445–48448. <https://doi.org/10.1039/c6ra05446c>.
- [347] J. Huang, Z. Xie, L. Xie, Z. Xie, S. Luo, X. Deng, L. Huang, T. Zeng, Y. Zhang, S. Wang, M. Zhang, Au/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core-shell nanoparticles are an efficient immunochromatography test strip performance enhancer - A comparative study with Au and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles, *RSC Adv.* 8 (2018) 14064–14071. <https://doi.org/10.1039/c8ra00185e>.
- [348] Z. Wu, D. He, E. Xu, A. Jiao, M.F.J. Chughtai, Z. Jin, Rapid detection of  $\beta$ -conglutinin with a novel lateral flow aptasensor assisted by immunomagnetic enrichment and enzyme signal amplification, *Food Chem.* 269 (2018) 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.011>.
- [349] L. Guo, Y. Shao, H. Duan, W. Ma, Y. Leng, X. Huang, Y. Xiong, Magnetic Quantum Dot Nanobead-Based Fluorescent Immunochromatographic Assay for the Highly Sensitive Detection of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Dark Soy Sauce, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4727–4734. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00223>.
- [350] J. Hu, Y.Z. Jiang, M. Tang, L.L. Wu, H.Y. Xie, Z.L. Zhang, D.W. Pang, Colorimetric-Fluorescent-Magnetic Nanosphere-Based Multimodal Assay Platform for *Salmonella* Detection, *Anal. Chem.* 91 (2019) 1178–1184. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05154>.
- [351] V.I. Shubayev, T.R. Pisanic, S. Jin, Magnetic nanoparticles for theragnostics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 467–477. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.007>.
- [352] S.I.C.J. Palma, M. Marciello, A. Carvalho, S. Veintemillas-Verdaguer, M. del P. Morales, A.C.A. Roque, Effects of phase transfer ligands on monodisperse iron oxide magnetic nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 437 (2015) 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.09.019>.

- [353] M. Osial, P. Rybicka, M. Pękała, G. Cichowicz, M.K. Cyrański, P. Krysiński, Easy synthesis and characterization of holmium-doped SPIONs, *Nanomaterials*. 8 (2018). <https://doi.org/10.3390/nano8060430>.
- [354] R. Bhandari, P. Gupta, T. Dziubla, J.Z. Hilt, Single step synthesis, characterization and applications of curcumin functionalized iron oxide magnetic nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C*. 67 (2016) 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.093>.
- [355] A. Lassoued, B. Dkhil, A. Gadri, S. Ammar, Control of the shape and size of iron oxide ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles synthesized through the chemical precipitation method, *Results Phys*. 7 (2017) 3007–3015. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.07.066>.
- [356] K. Petcharoen, A. Sirivat, Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol*. 177 (2012) 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2012.01.003>.
- [357] D. Farrell, S.A. Majetich, J.P. Wilcoxon, Preparation and characterization of monodisperse Fe nanoparticles, *J. Phys. Chem. B*. 107 (2003) 11022–11030. <https://doi.org/10.1021/jp0351831>.
- [358] Y. Li, M. Afzaal, P. O'Brien, The synthesis of amine-capped magnetic (Fe, Mn, Co, Ni) oxide nanocrystals and their surface modification for aqueous dispersibility, *J. Mater. Chem*. 16 (2006) 2175–2180. <https://doi.org/10.1039/b517351e>.
- [359] N. Jović Orsini, B. Babić-Stojić, V. Spasojević, M.P. Calatayud, N. Cvjetičanin, G.F. Goya, Magnetic and power absorption measurements on iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition of Fe(acac)<sub>3</sub>, *J. Magn. Magn. Mater*. 449 (2018) 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2017.10.053>.
- [360] C. Grüttner, K. Müller, J. Teller, F. Westphal, Synthesis and functionalisation of magnetic nanoparticles for hyperthermia applications, *Int. J. Hyperth*. 29 (2013) 777–789. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.835876>.
- [361] R.G. López, M.G. Pineda, G. Hurtado, R.D. de León, S. Fernández, H. Saade, D. Bueno, Chitosan-coated magnetic nanoparticles prepared in one step by reverse microemulsion precipitation, *Int. J. Mol. Sci*. 14 (2013) 19636–19650. <https://doi.org/10.3390/ijms141019636>.
- [362] D.A. Starr, 乳鼠心肌提取 HHS Public Access, *Physiol. Behav*. 176 (2011) 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- [363] X. Liu, G. Qiu, A. Yan, Z. Wang, X. Li, Hydrothermal synthesis and characterization of  $\alpha$ -FeOOH and  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> uniform nanocrystallines, *J. Alloys Compd*. 433 (2007) 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2006.06.029>.
- [364] S. Gyergyek, D. Makovec, M. Jagodič, M. Drogenik, K. Schenk, O. Jordan, J. Kovač, G. Dražič, H. Hofmann, Hydrothermal growth of iron oxide NPs with a uniform size distribution

## Referencias

---

- for magnetically induced hyperthermia: Structural, colloidal and magnetic properties, *J. Alloys Compd.* 694 (2017) 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.09.238>.
- [365] J.-H. Park, S.-H. Shin, S.-H. Kim, J.-K. Park, J.-W. Lee, J.-H. Shin, J.-H. Park, S.-W. Kim, H.-J. Choi, K.-S. Lee, J.-C. Ro, C. Park, S.-J. Suh, Effect of Synthesis Time and Composition on Magnetic Properties of FeCo Nanoparticles by Polyol Method, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 18 (2018) 7115–7119. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15477>.
- [366] G. Hemery, A.C. Keyes, E. Garaio, I. Rodrigo, J.A. Garcia, F. Plazaola, E. Garanger, O. Sandre, Tuning Sizes, Morphologies, and Magnetic Properties of Monocore Versus Multicore Iron Oxide Nanoparticles through the Controlled Addition of Water in the Polyol Synthesis, *Inorg. Chem.* 56 (2017) 8232–8243. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00956>.
- [367] S. Pandey, S.B. Mishra, Sol-gel derived organic-inorganic hybrid materials: Synthesis, characterizations and applications, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 59 (2011) 73–94. <https://doi.org/10.1007/s10971-011-2465-0>.
- [368] H. Xu, B.W. Zeiger, K.S. Suslick, Sonochemical synthesis of nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 2555–2567. <https://doi.org/10.1039/c2cs35282f>.
- [369] X. Hu, J.C. Yu, J. Gong, Q. Li, G. Li,  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanorings prepared by a microwave-assisted hydrothermal process and their sensing properties, *Adv. Mater.* 19 (2007) 2324–2329. <https://doi.org/10.1002/adma.200602176>.
- [370] P.A. Kotelnikova, V.O. Shipunova, U.F. Aghayeva, O.A. Stremovskiy, M.P. Nikitin, I.A. Novikov, A.A. Schulga, S.M. Deyev, R. V. Petrov, Synthesis of Magnetic Nanoparticles Stabilized by Magnetite-Binding Protein for Targeted Delivery to Cancer Cells, *Dokl. Biochem. Biophys.* 481 (2018) 198–200. <https://doi.org/10.1134/S1607672918040051>.
- [371] L.R. Khanal, T. Williams, Y. Qiang, High-temperature investigation on morphology, phase and size of iron/iron-oxide core-shell nanoclusters for radiation nanodetector, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 51 (2018). <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aac47e>.
- [372] E. Amstad, M. Textor, E. Reimhult, Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Nanoscale.* 3 (2011) 2819–2843. <https://doi.org/10.1039/c1nr10173k>.
- [373] Z. Chen, C. Wu, Z. Zhang, W. Wu, X. Wang, Z. Yu, Synthesis, functionalization, and nanomedical applications of functional magnetic nanoparticles, *Chinese Chem. Lett.* 29 (2018) 1601–1608. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.08.007>.
- [374] J.R. McCarthy, R. Weissleder, Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1241–1251. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.014>.
- [375] N. Li, W.H. Binder, Click-chemistry for nanoparticle-modification, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 16717–16734. <https://doi.org/10.1039/c1jm11558h>.

- [376] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, X. Yan, Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 577–583. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.260>.
- [377] D. Mahl, J. Diendorf, W. Meyer-Zaika, M. Epple, Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 377 (2011) 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.01.031>.
- [378] A. Albanese, W.C.W. Chan, Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity, *ACS Nano.* 5 (2011) 5478–5489. <https://doi.org/10.1021/nn2007496>.
- [379] STOYANOV PA, *Transmission Electron Microscopes*, 1968.
- [380] W.Z.L. Wang, ed., *Scanning Microscopy for Nanotechnology*, Springer, New York, NY, 2007. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0>.
- [381] L.M. Cursaru, R.M. Piticescu, D.V. Dragut, I.A. Tudor, V. Kuncser, N. Iacob, F. Stoiciu, The influence of synthesis parameters on structural and magnetic properties of iron oxide nanomaterials, *Nanomaterials.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/nano10010085>.
- [382] L. Jitkang, Y.S. Pin, C.H. Xin, L.S. Chun, Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 308–381. [www.nanoscalereslett.com/content/8/1/381](http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/381).
- [383] S.E. Sandler, B. Fellows, O. Thompson Mefford, Best Practices for Characterization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications, *Anal. Chem.* 91 (2019) 14159–14169. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03518>.
- [384] S. Mourdikoudis, R.M. Pallares, N.T.K. Thanh, Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties, *Nanoscale.* 10 (2018) 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>.
- [385] H. Borchert, E. V. Shevchenko, A. Robert, I. Mekis, A. Kornowski, G. Grübel, H. Weller, Determination of nanocrystal sizes: A comparison of TEM, SAXS, and XRD studies of highly monodisperse CoPt<sub>3</sub> particles, *Langmuir.* 21 (2005) 1931–1936. <https://doi.org/10.1021/la0477183>.
- [386] T. Tatarchuk, M. Bououdina, W. Macyk, O. Shyichuk, N. Paliychuk, I. Yaremiy, B. Al-Najar, M. Pacia, Structural, Optical, and Magnetic Properties of Zn-Doped CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017). <https://doi.org/10.1186/s11671-017-1899-x>.
- [387] K. Yang, H. Peng, Y. Wen, N. Li, Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 3093–3097. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.11.079>.
- [388] K. Davis, B. Qi, M. Witmer, C.L. Kitchens, B.A. Powell, O.T. Mefford, Quantitative

## **Referencias**

---

- measurement of ligand exchange on iron oxides via radiolabeled oleic acid, *Langmuir*. 30 (2014) 10918–10925. <https://doi.org/10.1021/la502204g>.
- [389] T.A. Gr̃newald, A. Lassenberger, P.D.J. Van Oostrum, H. Rennhofer, R. Zirbs, B. Capone, I. Vonderhaid, H. Amenitsch, H.C. Lichtenegger, E. Reimhult, Core-Shell Structure of Monodisperse Poly(ethylene glycol)-Grafted Iron Oxide Nanoparticles Studied by Small-Angle X-ray Scattering, *Chem. Mater.* 27 (2015) 4763–4771. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b01488>.