

NANOPARTÍCULAS, NANOVESÍCULAS Y BIOANÁLISIS

A. Moyano-Artime¹, P. Manrique García², E. Serrano-Pertierra¹, M. Matos², G. Gutiérrez²,
M.C. Blanco-López¹

1. Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Química, 33006 Oviedo

2. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medioambiente, 33006 Oviedo
Instituto de Biotecnología de Asturias

El grupo de Nanopartículas, membranas y bioanálisis (NanoBioMem) de la Universidad de Oviedo, liderado por la Dra. M^a Carmen Blanco López, está compuesto por miembros de diferentes departamentos (Química Física y Analítica e Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente).

En el campo de la Química Analítica, el grupo se centra en el desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral (LFIA, por sus siglas en inglés). El objetivo de esta línea de investigación es dar respuesta y solución a problemas analíticos en diferentes campos de aplicación con el uso de herramientas de análisis que permita obtener resultados descentralizado cuasi-inmediato con un procedimiento sencillo. Para mejora de la sensibilidad se utilizan nanopartículas y composites, y se estudia su acoplamiento a diferentes transductores. Las Dras. Gemma Gutiérrez y María Matos, por su parte, son expertas en emulsiones y nanovesículas, como plataformas para la síntesis de nanopartículas, formulación de alimentos funcionales y liberación controlada de fármacos y biocompuestos en general.

INMUNOENSAYOS DE FLUJO LATERAL

Tras los brotes infecciosos, crisis de seguridad alimentaria y necesidades de control medioambiental de las últimas décadas, la sociedad demanda sistemas de bio-detección rápidos. Las técnicas comúnmente más utilizadas y consolidadas para la detección y cuantificación de biomoléculas presentan ciertas limitaciones, como son su elevado coste, personal específicamente cualificado para manejo de instrumentación compleja y, particularmente en situaciones de crisis, son lentas. Con el objetivo de superar este tipo de limitaciones y atender a la demanda creciente de análisis rápidos y simples, una línea de este grupo de investigación se centra en el desarrollo de LFIA que permiten obtener información rápida en el punto de aplicación para facilitar decisiones inmediatas. Una característica principal de este tipo de 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.

El LFIA integra las técnicas de cromatografía e inmunoensayos en una simple membrana de nitrocelulosa. El elemento fundamental es la membrana que se trata químicamente de manera que se favorezca el flujo capilar de la muestra líquida. Para controlar y facilitar el flujo, el test 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 1 se muestra un ejemplo de este tipo de ensayos. Se pueden diseñar tanto en formato sándwich como competitivo.

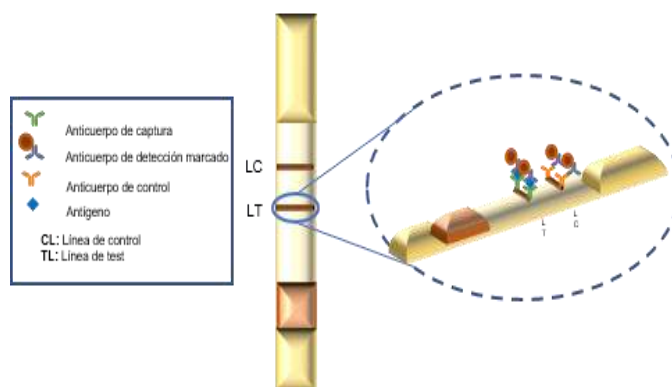


Figura 1. Esquema de un test inmunocromatográfico (Lateral Flow Immunoassay, LFIA).

La señal de color se suele obtener mediante la bioconjugación del reactivo de detección a nanopartículas de oro o látex. El grupo explora otras nanopartículas y/o nanovesículas como marcas de detección, con el objetivo mejorar la sensibilidad de estos ensayos y acoplar transductores. Así se han investigado las siguientes estrategias: (a) deposición catalítica de iones plata sobre nanopartículas de oro para mejora de la señal visual [1], (b) uso de nanopartículas core-shell Au@Ag para la cuantificación de la señal por espectroscopia Raman, en colaboración con los Dres. Pastoriza y Pérez-Juste de la Universidad de Vigo y el grupo del profesor D. Graham de la Universidad de Strathclyde, Glasgow [2] (c) uso de nanopartículas superparamagnéticas que permiten la cuantificación de la señal en los inmunoensayos de flujo lateral mediante un sensor inductivo desarrollado por los Dres. Rivas y Martínez, del Departamento de Física de la Universidad de Oviedo [3] y (d) encapsulación de nanopartículas superparamagnéticas en liposomas para amplificar la señal [4].

En los últimos años la investigación del grupo se ha centrado en la detección de analitos en diferentes campos de aplicación como son la seguridad alimentaria (determinación de histamina), y en el campo biosanitario, donde hemos sido pioneros en la

cuantificación de vesículas extracelulares con dispositivos de punto de atención.

TEST PARA DETERMINACIÓN DE HISTAMINA

La **histamina** es una amina biógena (AB) producida por descarboxilación de aminoácidos, muy relacionada con intoxicaciones e intolerancias. Existe además una población de individuos con una susceptibilidad especial en los que una cantidad mucho más baja de histamina puede provocar efectos alérgicos. Por estos motivos, el control de los niveles de histamina en alimentación es procedimiento imprescindible. La histamina se produce de forma natural en alimentos fermentados. Actualmente, no existe legislación que regule los niveles de histamina en vino, pero sí en pescado, donde la presencia de histamina indica descomposición. Varios países europeos han establecido unos límites recomendables para la exportación e importación de vinos con el objetivo, por una parte, garantizar la seguridad alimentaria de esta bebida, así como asegurar su calidad puesto que la presencia de histamina y otras ABs puede contribuir a cambios en las propiedades organolépticas del vino. La producción de la histamina tiene lugar en diferentes puntos durante el proceso de fabricación del vino, e influyen además factores como las condiciones de almacenamiento (temperatura y pH), la calidad de la materia prima y la existencia de contaminantes durante el proceso.

Se han descrito diferentes técnicas para la detección y cuantificación de histamina, tanto cromatográficas como no cromatográficas, pero todas ellas son muy sofisticadas para implementar en bodegas pequeñas, donde se requiere realizar análisis para el control y calidad de los vinos durante su fabricación y tomar decisiones *in-situ*, y carecen de recursos para instalar un laboratorio y emplear personal cualificado. De forma análoga, en ocasiones las personas con especial sensibilidad a la histamina les gustaría tener control sobre el vino que desean tomar, y poder analizar los contenidos de histamina para garantizar su seguridad. En estos casos concretos, las técnicas disponibles en el mercado no son apropiadas para bodegas pequeñas ni para consumidores de vino.

Con el fin de dar respuesta esta demanda, en este grupo de investigación se ha desarrollado un inmunoensayo de flujo lateral para la detección y cuantificación de histamina en vinos tintos que cumple estos requisitos y permitiría que cualquier consumidor tenga al alcance un test para analizar la histamina de su vino de una forma rápida en cualquier lugar. El método se validó mediante comparación con los resultados con HPLC, y ha sido publicado en la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [3].

TEST PARA CUANTIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

En los últimos años se ha reconocido el papel de las vesículas extracelulares (VE) en la comunicación intercelular. Se trata de estructuras membranosas

liberadas por las células, que contienen moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos...) que pueden transferirse a otras células, y tener una influencia en su función. Por tanto, pueden ser consideradas nanomateriales biológicos con un papel importante tanto en procesos fisiológicos como patológicos.

Existen grandes expectativas en estudios en este campo, que nos permitirán disponer de nuevos vehículos terapéuticos y biomarcadores no invasivos que permitirían desarrollar protocolos de diagnóstico basados en biopsia líquida. Al igual que ocurre en todos los procesos de la vida, la comunicación es la clave del éxito. Y las vesículas extracelulares son los principales agentes para lograr esta comunicación en nuevas vías de terapia y diagnóstico.

En nuestro grupo de investigación estamos trabajando en el estudio y cuantificación de estas vesículas extracelulares, para contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico. Estos trabajos también tienen aplicación para nuevas terapias basadas en medicina personalizada, con vesículas extracelulares o nanovesículas miméticas de ellas. Algunas de estas aplicaciones médicas se recogen en el volumen especial de la revista *Bioengineering* que hemos editado [5].

El primer reto en investigación en este campo es el aislamiento de EVs desde los medios celulares y fluidos biológicos. Se necesitan métodos estandarizados y sencillos. El método más establecido es la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Sin embargo, requiere mucho tiempo e instrumentación especial, por lo que esta etapa ralentiza en gran medida el progreso en el campo. Hemos abordado este problema realizando una comparación entre la ultracentrifugación y dos métodos de precipitación disponibles comercialmente para discernir en qué condiciones se puede prescindir de las etapas tediosas [6].

Se sabe que la producción de EVs en algunos procesos patológicos como tumores, es exagerada por encima de los valores fisiológicos. Con el fin de establecer el umbral entre unos y otros, es necesario disponer de métodos de cuantificación. Los métodos actuales utilizan se basan en tecnología NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*), un método basado en pulsos resistivos a través de una membrana (qNano), o inmunoensayos ELISA en placas de pocillos. En estos tres casos se requiere instrumentación costosa y personal entrenado. En los últimos años hemos estado investigando para diseñar inmunoensayos de flujo lateral aplicados a la cuantificación de vesículas extracelulares. El test utiliza anticuerpos antitetraspanina, proteínas de membrana de EVs, y es compatible con otras formas rápidas de aislar vesículas, como columnas de exclusión de tamaños o los kits de precipitación estudiados en la referencia 6. Para maximizar la sensibilidad y obtener bajos límites de detección se han investigado varios nanomateriales: nanopartículas de oro, de carbono, y magnéticas [7-8]. En un trabajo reciente hemos analizado las ventajas de estos tests en comparación con las otras técnicas disponibles

[9]. Estos trabajos forman parte de la tesis doctoral de Myriam Oliveira [10].

Hemos realizado un estudio piloto buscando la utilidad en diagnóstico clínico de enfermedades que no tienen un biomarcador, como la fatiga crónica [11]. Este estudio ha servido para ver identificar una correlación entre el tamaño y cantidad de partículas en pacientes afectados, y fue realizado en colaboración con los Dres. Castro y Alegre del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona).

Por otro lado, cuando se conoce un biomarcador específico de una patología, se puede sustituir uno de los anticuerpos del inmunoensayo por otro específico de ese biomarcador para utilidad en diagnóstico clínico o pronóstico. El melanoma es un ejemplo de enfermedad tumoral para la que ya existen métodos de diagnóstico adecuados (técnicas de imagen). Sin embargo, no existe ningún biomarcador para monitorizar una terapia. Los dermatólogos han reconocido que se pierde mucho tiempo hasta poder apreciar si una terapia es efectiva o no mediante técnicas de imagen. El ligando MICA ha sido identificado como un biomarcador de estos tumores y en nuestro laboratorio hemos adaptado el test inmunocromatográfico a la identificación de MICA en EVs [12]. Hemos comprobado también su utilidad en plasma de pacientes. Este trabajo fue avalado por una ayuda de movilidad de investigadores de la Sociedad Española de Vesículas Extracelulares, Geivex, y en colaboración con la Dra. Mar Valés (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid).

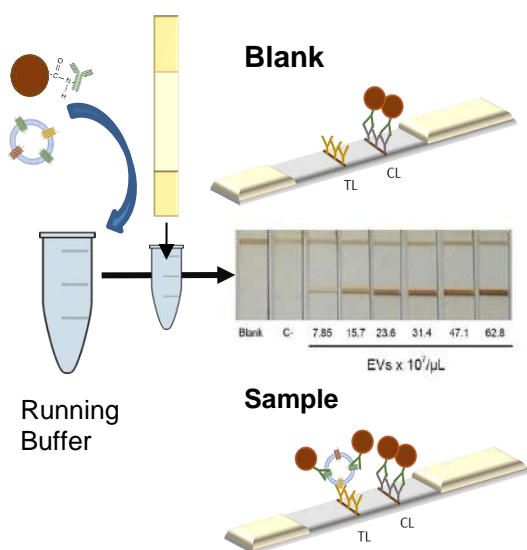


Figura 2. Test inmunocromatográfico para vesículas extracelulares.

En estos momentos continuamos desarrollando esta plataforma para plasma de pacientes de cáncer de colon (Figura 2), con el proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia, Biosensor basado en nanopartículas superparamagneticas para el diagnóstico precoz y no

invasivo de cancer colorrectal (ONCOSENS 2018-2021). En la Tesis Doctoral de Amanda Moyano [13] y las publicaciones derivadas [14-15], se han optimizado los test de flujo lateral magnéticos para poder realizar inmunopreconcentraciones y así mejorar los límites de detección (Figura 2). En esta tesis y un trabajo fin de master reciente, hemos desarrollado un test para un biomarcador de vesículas extracelulares identificado en líneas tumorales de cáncer de colon [4]. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con los Dres. Duque, Sánchez y Ramos, del Hospital San Agustín (Avilés) y Dr. Flórez (Hospital Universitario Central de Asturias).

USOS BIOTECNOLÓGICOS DE NANOVESÍCULAS

La ausencia de un método de referencia para el aislamiento de EVs a partir de muestras biológicas, animó a la comunidad científica a buscar alternativas basadas en la biología sintética, con herramientas como la bio-nanotecnología como aliada indiscutible, para establecer nuevos modelos de estándares analíticos que permitan desarrollar, optimizar e incluso comparar metodologías de aislamiento/enriquecimiento de EVs. Nuestro grupo trabaja en esta línea centrándose en el diseño y desarrollo de EVs artificiales, con propiedades físico-químicas y funcionales miméticas de las naturales.

Con el fin de establecer una nomenclatura estándar, hemos publicado revisiones bibliográficas sobre el concepto de EVs artificiales, su clasificación según la ruta de preparación, así como un análisis crítico de los métodos desarrollados hasta la fecha para su preparación, tanto partiendo de elementos naturales (cultivos celulares, o EVs naturales modificadas física o químicamente), como de su creación a partir de materias primas (reactivos de laboratorio) desde cero [16]. Estas aproximaciones son conocidas en el ámbito de la nanotecnología como *Top-Down* y *Bottom-up* respectivamente. La revista *Trends in Biotechnology* nos invitó a dar una visión sobre las líneas para producción de EVs totalmente artificiales y las posibles limitaciones en este campo [17].

Por otro lado, hemos desarrollado un modelo de exosoma artificial [18] partiendo de vesículas sintéticas (niosomas, sistemas vesiculares preparados con surfactantes no iónicos y aditivos de membrana, tales como colesterol y derivados químicos del mismo), que posteriormente fueron funcionalizadas con cadenas miméticas de los bucles extracelulares miméticos de las tetraspaninas (Figura 3). Estos bucles fueron producidos mediante tecnología de proteína recombinante. Previamente en el grupo, se habían puesto a punto estrategias de producción de este tipo de vesículas artificiales (liposomas, niosomas, transfersomas, etc) que permiten su producción con un rango de tamaño de partícula similar al de las EVs naturales [19].

Nuestro modelo de exosoma artificial se ha estudiado como una alternativa a las EVs naturales en su papel de patrón analítico en el desarrollo de inmunoensayos para la detección y cuantificación de EVs. Este trabajo se ha

desarrollado en colaboración con el grupo que dirige la Dra. María Yáñez-Mó, del centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), y en el contexto de una estancia pre-doctoral financiada por el Grupo Español de Innovación e Investigación en Vesículas Extracelulares (GEIVEX), del que varios miembros del grupo son socios activos.

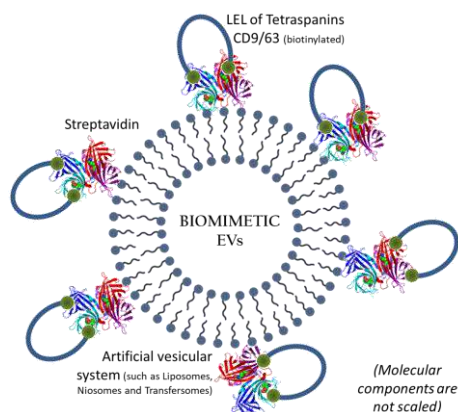


Figura 3. Modelo sintético de vesícula extracelular.

El enorme interés que están suscitando las EVs, no sólo se debe a su potencial analítico como nuevos biomarcadores, si no a su rol fisiológico como vehículos de comunicación celular, que inspira el diseño de nuevos agentes de tratamiento. Estos “biofármacos” permitirían estrategias de distribución y liberación controlada de moléculas bioactivas. En este sentido las EVs son un verdadero agente terapéutico, ya que pueden ser empleadas tanto en diagnóstico como en terapia.

Nuestro grupo también trabaja activamente en el campo del *drug delivery*, con gran experiencia en la encapsulación de compuestos bioactivos de diversa naturaleza en este tipo de nanomateriales orgánicos [20,21,22]. Sin duda, estas investigaciones son necesarias a la hora de plantear nuevas estrategias basándose en EVs artificiales como vehículos de distribución y liberación.

En concreto, cuando se requiere encapsular ácidos nucleicos o biomoléculas cuyo acceso o estabilidad físico-química es limitada, o se desea formular nanopartículas a partir de materias primas de elevado coste, el empleo de procesos miniaturizados se vuelve esencial. Además, estas técnicas han de ser versátiles y permitir explorar de manera rápida diferentes variables metodológicas que puedan afectar a las características finales del producto, y por ende, de sus potenciales aplicaciones. El grupo de investigación ha desarrollado trabajos en los que plataformas basadas en microfluídica permiten producir este tipo de bionanomateriales. El microchip fue diseñado mediante impresión 3D [23,24]. Este trabajo es fruto de una colaboración con el Dr. Xunli

Zhang, del grupo *Bionengineering Science* de la Universidad de Southampton (Reino Unido), a través de estancias de investigación financiadas por el Campus de Excelencia de Universidad de Oviedo y el Banco Santander, que tiene por objeto establecer colaboraciones entre organismos científicos de primer orden mundial, pertenecientes a los primeros puestos del prestigioso Ranking de Shanghai.

NANOMATERIALES PARA DETECCIÓN, DESTRUCCIÓN E INHIBICIÓN DE BIOFILMS

En estos momentos el grupo de investigación coordina el proyecto de red europea MSCA-ITN Break Biofilms. Los biofilms, o biopelículas, son comunidades de bacterias que crecen sobre distintas superficies, causando más del 80% de las infecciones bacterianas en hospitales, graves intoxicaciones debido a contaminación de superficies dedicadas al procesamiento o conservación de alimentos, agua potable, o depósitos de fuel. Cuando se forma el biofilm, son más difíciles de eliminar, ya que se ha formado una matriz extracelular que protege las bacterias de los agentes biocidas convencionales. Esto genera además resistencia antimicrobiana.

El objetivo general de este proyecto multidisciplinar es desarrollar herramientas de detección, destrucción e inhibición del crecimiento de biofilms. Para ello se han seleccionado 15 estudiantes que desarrollaran su tesis en 6 universidades europeas, un centro de investigación del CSIC, y un centro tecnológico, colaborando con 8 empresas, y un centro de formación empresarial. Las actividades del proyecto se pueden seguir en la web: www.breakbiofilms.com

REFERENCIAS

1. 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>.
2. 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>.
3. 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>.
4. Trabajo Fin de Master, “Estudio y desarrollo de un biosensor para el análisis de biomarcadores de cáncer de colon”, Paula Rosa Suárez Vaquero, Septiembre 2020. Tutoras: M. Matos, M. Carmen Blanco-López.
5. E. Serrano-Pertierra, M. C. Blanco-López, Editorial of the Special Issue on “Extracellular Vesicles: from Biology

- to Biomedical Applications” *Bioengineering* 2019, 6, 79; doi:10.3390/bioengineering6030079.
6. E. Serrano-Pertierra, M. Oliveira-Rodríguez, M. Rivas, P. Oliva, J. Villafañi, A. Navarro, M.C. Blanco-López, E. Cernuda-Morrollón, Characterization of Plasma-Derived Extracellular Vesicles Isolated by Different Methods: A Comparison Study, *Bioengineering* 2019 Jan 17;6(1):8. doi: 10.3390/bioengineering6010008.
7. Myriam Oliveira-Rodríguez, Sheila López-Cobo, Hugh T. Reyburn, Soraya López Martín, María Yáñez Mo, Eva Cernuda-Morollón, Annette Paschen, Mar Valés-Gómez, M.C. Blanco-López “Development of a Rapid Lateral Flow Immunoassay Test for Detection of Exosomes” *Journal of Extracellular Vesicles* 2016, 5: 31803 – 31812. <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v5.31803>.
8. Myriam Oliveira-Rodríguez, Esther Serrano-Pertierra, Agustín Costa García, Soraya López Martín, María Yáñez Mo, Eva Cernuda-Morollón, M.C. Blanco-López, “Point-of-care detection of extracellular vesicles: sensitivity optimization and multiple-target detection” *Biosensors and Bioelectronics* 87(2017)38–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.001>.
9. 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* 2020, 10, 824; doi:10.3390/biom10060824.
10. Tesis doctoral: Desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral cuantitativos. Aplicación a la determinación de vesículas extracelulares. Myriam Oliveira Rodríguez. Noviembre 2016.
11. Castro-Marrero, E. Serrano-Pertierra, M. Oliveira-Rodríguez, M.C. Zaragoza, A. Martínez-Martínez, M.C. Blanco-López and J. Alegre. Circulating Extracellular Vesicles in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis: an exploratory pilot study, 2018, 7, Número de artículo: 1453730, DOI: 10.1080/20013078.2018.1453730.
12. S. López-Cobo, C. Campos-Silva, A. Moyano, M. Oliveira-Rodríguez, A. Paschen, M. Yáñez-Mó, M.C. Blanco-López, M. Valés-Gómez, Improved immunoassays of scarce tumour-antigens in exosomes: detection of the human NKG2D-Ligand, MICA, in tetraspanin-containing nanovesicles from melanoma, *Journal of Nanobiotechnology* 2018, 16, 47. DOI: 10.1186/s12951-018-0372-z.
13. Tesis doctoral “Cuantificación de histamina y vesículas extracelulares mediante inmunoensayos magnéticos de flujo lateral”, Amanda Moyano Artime, Octubre 2020, Univ. Oviedo. Directoras: M. Rivas, M. Carmen Blanco-López. (Repositorio Univ. de Oviedo).
14. A. Moyano, E. Serrano, M. Salvador, J.C. Martínez-García, M. Rivas, M.C. Blanco-López, Magnetic lateral flow immunoassays, *Diagnostics* 2020, 10, 288; doi:10.3390/diagnostics10050288.
15. A. Moyano, E. Serrano, M. Salvador, J.C. Martínez-García, Y. Piñeiro, S. Yáñez-Villar, M. González-Gómez, J. Riva, M. Rivas, M.C. Blanco-López, Carbon coated superparamagnetic nanoflowers for biosensors based on lateral flow immunoassays, *Biosensors* 2020, 10, 80; doi:10.3390/bios10080080.
16. P. García-Manrique, M. Matos, G. Gutiérrez, C. Pazos, M.C. Blanco-López, Therapeutic biomaterials based on extracellular vesicles: classification of bio-engineering and mimetic preparation routes, *Journal of extracellular vesicles*, 2018, 7 (1), 1422676; doi: 10.1080/20013078.2017.1422676.
17. P. García-Manrique, G. Gutiérrez, M.C. Blanco-López, Fully artificial exosomes: towards new theranostic biomaterials, *Trends in biotechnology*, 2018, 36 (1), 10-14. doi:10.1016/j.tibtech.2017.10.005.
18. 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*, 2020, 10 (5), 971. doi:10.3390/nano10050971.
19. 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, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2016, 55 (34), 9164-9175; doi:10.1021/acs.iecr.6b01552.
20. O.R. Estupiñán, P. García-Manrique, M.C. Blanco-López, M. Matos, G. Gutiérrez, Vitamin D3 Loaded Niosomes and Transfersomes Produced by Ethanol Injection Method: Identification of the Critical Preparation Step for Size Control. *Foods*, 2020, 9(10), 1367; doi:10.3390/foods9101367.
21. P. García-Manrique, N.D. Machado, M.A. Fernández, M.C. Blanco-López, M. Matos, G. Gutiérrez, Effect of drug molecular weight on niosomes size and encapsulation efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 186, 110711; doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110711
22. F. Hasibi, A. Nasirpour, J. Varshosaz, P. García-Manrique, M.C. Blanco-López, G. Gutiérrez, M. Matos, Formulation and characterization of taxifolin-loaded lipid nanovesicles (liposomes, niosomes, and transfersomes) for beverage fortification, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2019, 1900105; doi:10.1002/ejlt.201900105.
23. N.D. Machado, P. García-Manrique, M.A. Fernández, M.C. Blanco-López, G. Gutiérrez, Cholesterol free niosome production by microfluidics: comparative with other conventional methods, *Chemical Engineering Research and Design*, 2020, 162, 162-171; doi:10.1016/j.cherd.2020.08.002.
24. P. García-Manrique, G. Gutiérrez, M. Matos, D.A. Cristaldi, A. Mosayyebi, D. Carugo, X. Zhang, M.C. Blanco-López. Continuous flow production of size-controllable niosomes using a thermostatic microreactor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 128, 110378; doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110378.