

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS



Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de  
Sistemas

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y caracterización de  
nanosistemas magnéticos con potencial  
biotecnológico**

Ylenia María Jabalera Ruz

Granada, 2021

# Desarrollo y caracterización de nanosistemas magnéticos con potencial biotecnológico

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

**Ylenia María Jabalera Ruz**

Para aspirar al título de Doctor con Mención

Internacional por la

Universidad de Granada

Vº Bº DE LA DIRECTORA DE LA TESIS

**Dra. Concepción Jiménez López**

Catedrática del Departamento de Microbiología

Universidad de Granada

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Ylenia María Jabalera Ruz  
ISBN: 978-84-1117-601-9  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/78893>

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Granada durante los años 2017-2021 dentro del grupo de investigación RNM-938.

Para realizar esta Tesis Doctoral, la doctoranda ha disfrutado de:

- Un contrato de “Ayudas para la formación de profesorado universitario FPU”, con referencia FPU16\_04580 financiada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Dicha ayuda se disfrutó encuadrada en el proyecto CGL2016-76723 del Ministerio de Economía y Competitividad, cuya investigadora principal fue la Dra. Concepción Jiménez López, Catedrática del Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada.
- Dos ayudas para la realización de Estancias Breves (EEBB) en centros extranjeros con referencias: EST19/00646 (60 días) y EST18/00653 (90 días), también financiadas por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.
- Una ayuda para la realización de una estancia de investigación en centros europeos con referencia *Research and Training Grant* (Ref. FEMS-GO-2020-201) financiada por la *Federation European Microbiological Societies* (FEMS).
- Un proyecto de investigación con referencia PPJIB2019-01, financiado por la Universidad de Granada, cuya investigadora principal fue la propia doctoranda.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han mantenido colaboraciones internacionales, colaboraciones consolidadas durante la realización de las estancias de investigación, con grupos de investigación de la Università del Piemonte Orientale A. Avogadro (Novara, Italia), Università di Verona (Verona, Italia), INRAE Val de Loire Center (Nouzilly, Francia), Ames Laboratory (Ames, Iowa, USA) y University of Alabama (Tuscaloosa, Alabama, USA).

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido incluidos en la patente titulada “Biomimetic magnetic nanoparticles comprising MamC”, P201831064, con extensión internacional PCT/ES2019/070747. Además, dichos resultados se han publicado o enviado a revistas indexadas en JCR y se han presentado en diferentes congresos nacionales e internacionales:

**Artículos científicos publicados o enviados con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral:**

1. **Jabalera, Y.\***; Contreras-Montoya, R.\*; Blanco, V.; Cuerva, J.M.; Jimenez-Lopez, C.; Alvarez de Cienfuegos, L. Lysine as Size-Control Additive in a Bioinspired Synthesis of Pure Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* **2020**, *20*, 533–542, doi:10.1021/acs.cgd.9b00169. *\*Estos autores han contribuido a partes iguales en este trabajo.*
2. **Jabalera, Y.**; Casares Atienza, S.; Fernández-Vivas, A.; Peigneux, A.; Azuaga Fortes, A.I.; Jimenez-Lopez, C. Protein Conservation Method Affects MamC-Mediated Biomineralization of Magnetic Nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 1064–1071, doi:10.1021/acs.cgd.8b01590.
3. **Jabalera, Y.\***; Sola-Leyva, A.\*; Peigneux, A.; Vurro, F.; Iglesias, G.R.; Vilchez-Garcia, J.; Pérez-Prieto, I.; Aguilar-Troyano, F.J.; López-Cara, L.C.; Carrasco-Jiménez, M.P.; Jimenez-Lopez, C. Biomimetic magnetic nanocarriers drive choline kinase alpha inhibitor inside cancer cells for combined chemohyperthermia therapy. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 408, doi:10.3390/pharmaceutics11080408. *\*Estos autores han contribuido a partes iguales en este trabajo.*
4. **Jabalera, Y.\***; Montalban-Lopez, M.\*; Vinuesa-Rodriguez, J.J.; Iglesias, G.R.; Maqueda, M.; Jimenez-Lopez, C. Antibacterial directed chemotherapy using AS-48 peptide immobilized on biomimetic magnetic nanoparticles combined with

- magnetic hyperthermia. *International Journal of Biological Macromolecules*. (En evaluación). \*Estos autores han contribuido a partes iguales en este trabajo.
- Iglesias, G.R.; **Jabalera, Y.**; Peigneux, A.; Checa Fernández, B.L.; Delgado, Á. V.; Jimenez-Lopez, C. Enhancement of Magnetic Hyperthermia by Mixing Synthetic Inorganic and Biomimetic Magnetic Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 273, doi:10.3390/pharmaceutics11060273.
  - Jabalera, Y.\***; Oltolina, F.\*; Peigneux, A.; Sola-Leyva, A.; Carrasco-Jiménez, M.P.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C.; Iglesias, G.R. Nanoformulation Design Including MamC-Mediated Biomimetic Nanoparticles Allows the Simultaneous Application of Targeted Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia. *Polymers*. **2020**, *12*, 1832, doi:10.3390/polym12081832. \*Estos autores han contribuido a partes iguales en este trabajo.
  - Jabalera, Y.**; Fernández-Vivas, A.; Iglesias, G.R.; Delgado, Á. V.; Jimenez-Lopez, C. Magnetoliposomes of mixed biomimetic and inorganic magnetic nanoparticles as enhanced hyperthermia agents. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *183*, 110435, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110435.
  - Pérez-Huerta, A.; Prozorov, T.; Jimenez-Lopez, C.; Cappelli, C.; **Jabalera, Y.**; Londono-Calderon, A.; Laiginhas, F.; Bazylinski, A. Huella biogeoquímica de la magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) procedente de las bacterias magnetotácticas. (En preparación).

**Artículos científicos publicados en temas afines no objeto de la presente Tesis Doctoral:**

- Jabalera, Y.\***; Sola-Leyva, A.\*; Carrasco-Jiménez, M.P.; Iglesias, G.R.; Jimenez-Lopez, C. Synergistic Photothermal-Chemotherapy Based on the Use of Biomimetic Magnetic Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 625, doi:10.3390/pharmaceutics13050625. \*Estos autores han contribuido a partes iguales en este trabajo.
- Vurro, F.; **Jabalera, Y.**; Mannucci, S.; Glorani, G.; Sola-Leyva, A.; Gerosa, M.; Romeo, A.; Romanelli, M.G.; Malatesta, M.; Calderan, L.; Iglesias, G.R.; Carrasco-Jiménez, M.P.; Jimenez-Lopez, C.; Perduca, M. Improving the Cellular Uptake of Biomimetic Magnetic Nanoparticles. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 766, doi:10.3390/nano11030766.

3. Salem, K.; **Jabalera, Y.**; Puentes-Pardo, J.D.; Vilchez-Garcia, J.; Sayari, A.; Hmida-Sayari, A.; Jimenez-Lopez, C.; Perduca, M. Enzyme Storage and Recycling: Nanoassemblies of  $\alpha$ -Amylase and Xylanase Immobilized on Biomimetic Magnetic Nanoparticles. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 4054–4063, doi:10.1021/acssuschemeng.0c08300.
4. **Jabalera, Y.\***; Sola-Leyva, A.\*; Chico-Lozano, M.A.; Carrasco-Jiménez, M.P.; Iglesias, G.R.; Jimenez-Lopez, C. Reactive oxygen species (ROS) production in HepG2 cancer cell line through the application of localized alternating magnetic field. *J. Mater. Chem. B* **2020**, doi:10.1039/d0tb01306d. *\*Estos autores han contribuido a partes iguales en este trabajo.*
5. **Jabalera, Y.\***; Garcia-Pinel, B.\*; Ortiz, R.; Cabeza, L.; Jimenez-Lopez, C.; Melguizo, C.; Prados, J. Biomimetic Magnetoliposomes as Oxaliplatin Nanocarriers: In Vitro Study for Potential Application in Colon Cancer. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 589, doi:10.3390/pharmaceutics12060589. *\*Estos autores han contribuido a partes iguales en este trabajo.*
6. **Jabalera, Y.**; Oltolina, F.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C.; Fernández-Sánchez, J.F.; Choquesillo-Lazarte, D.; Gómez-Morales, J. Eu-Doped Citrate-Coated Carbonated Apatite Luminescent Nanoprobes for Drug Delivery. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 199, doi:10.3390/nano10020199.
7. **Jabalera, Y.\***; Garcia-Pinel, B.\*; Ortiz, R.; Iglesias, G.; Cabeza, L.; Prados, J.; Jimenez-Lopez, C.; Melguizo, C. Oxaliplatin–Biomimetic Magnetic Nanoparticle Assemblies for Colon Cancer-Targeted Chemotherapy: An In Vitro Study. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 395, doi:10.3390/pharmaceutics11080395. *\*Estos autores han contribuido a partes iguales en este trabajo.*
8. Peigneux, A.; **Jabalera, Y.**; Vivas, M.A.F.; Casares, S.; Azuaga, A.I.; Jimenez-Lopez, C. Tuning properties of biomimetic magnetic nanoparticles by combining magnetosome associated proteins. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8804, doi:10.1038/s41598-019-45219-7.
9. Ubago-Rodríguez, A.; Casares Atienza, S.; Fernández-Vivas, A.; Peigneux, A.; **Jabalera, Y.**; De La Cuesta-Rivero, M.; Jimenez-Lopez, C.; Azuaga Fortes, A.I. Structure-Function of MamC Loop and Its Effect on the in Vitro Precipitation of Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 2927–2935, doi:10.1021/acs.cgd.9b00150.

10. García Rubia, G.; Peigneux, A.; **Jabalera, Y.**; Puerma, J.; Oltolina, F.; Elert, K.; Colangelo, D.; Gómez Morales, J.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C. PH-Dependent Adsorption Release of Doxorubicin on MamC-Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Langmuir* **2018**, *34*, 13713–13724, doi:10.1021/acs.langmuir.8b03109.

### **Resultados presentados en congresos nacionales e internacionales:**

1. Póster: **Jabalera, Y.**; Montalban-Lopez, M.; Vinuesa-Rodriguez, J.J.; Iglesias, G.R.; Maqueda, M.; Jimenez-Lopez, C. *Quimioterapia dirigida combinada con hipertermia magnética mediada por el nanoensamblaje AS-48-BMNPs como nueva estrategia para el tratamiento local de enfermedades infecciosas*. XXVIII Congreso Sociedad Española de Microbiología, 28 Junio – 02 Julio 2021. Online, España.
2. Comunicación Oral: **Jabalera, Y.** *BioMIMETIC*. MEDINBIO, 20-21 Mayo 2021. Granada, España.
3. Keynote: **Jabalera, Y.**; Fernández-Vivas, A.; Iglesias, G.R.; Jimenez-Lopez, C. *Learning from magnetotactic bacteria to produce smart magnetic nanocarriers*. MISCA2019, 04-08 Septiembre 2019. Nápoles, Italia.
4. Comunicación oral: **Jabalera, Y.**; Montalban-Lopez, M.; Valdera, J.; Valdivia, E.; Martínez-Bueno, M.; Jimenez-Lopez, C; Maqueda, M. *Nuevas vías de aplicación de AS-48: funcionalización de bionanopartículas magnéticas*. RedBAL, 17-18 Junio 2019. Madrid, España.
5. Póster: García Díaz, A.; **Jabalera, Y.**; Fernández-Vivas, A.; Iglesias, G.R.; Delgado, Á. V.; Jimenez-Lopez, C. *Uso de magnetoliposomas como agentes de hipertermia en tratamiento contra el cáncer*. V Congreso de Estudiantes de Investigación Biosanitaria, 13-16 Marzo 2019. Granada, España.
6. Póster: García Díaz, A.; **Jabalera, Y.**; Fernández-Vivas, A.; Iglesias, G.R.; Delgado, Á. V.; Jimenez-Lopez, C. *Towards the production of biomimetic magnetoliposomes and their use in hyperthermia*. I Congreso de Investigadores del PTS, 13-15 Febrero 2019. Granada, España.
7. Póster: **Jabalera, Y.**; Peigneux, A.; Iglesias, G.R.; Montalban-Lopez, M.; Sola-Leyva, A.; López-Cara, L.C.; Fernández-Vivas, A; Delgado, A.V.; Carrasco-



- Jiménez, M.P.; Maqueda, M.; Jimenez-Lopez, C. *Biomimetic magnetic nanoparticles: a useful tool in nanotechnology*. International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology, 26-28 Septiembre 2018. Roma, Italia.
8. Póster: **Jabalera, Y.**; Fernández-Vivas, A.; Iglesias, G.R.; Delgado, Á. V.; Jimenez-Lopez, C. *Nano-production of biomimetic magnetoliposomes for their application as hyperthermia agents*. 41 Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, 10-13 de Septiembre 2018. Santander, España.
  9. Comunicación oral: **Jabalera, Y.**; Fernández-Vivas, A.; Iglesias, G.R.; Delgado, Á. V.; Jimenez-Lopez, C. *Magnetoliposomas biomiméticos: una alternativa para la hipertermia magnética*. 1er Congreso sobre Materiales Multifuncionales para Jóvenes, 03-04 Septiembre 2018. Granada, España.
  10. Comunicación Oral: **Jabalera, Y.** #UGRTALK: *Bionanotransportadores magnéticos inteligentes*. Evento Alhambra Venture, 10 Julio 2018. Granada, España.
  11. Póster: **Jabalera, Y.**; Fernández-Vivas, A.; Iglesias, G.R.; Delgado, Á. V.; Jimenez-Lopez, C. *Desarrollo de magnetoliposomas biomiméticos para su uso como agentes de hipertermia*. VII Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana, 06-08 Junio 2018. Cádiz, España.
  12. Comunicación Oral: Peigneux, A.; Oltolina, F.; Masante, I.; **Jabalera, Y.**; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C. *Biomimetic functionalized magnetic nanoparticles as potential new selective drug carriers for targetable diseases*. 5th Granada-Münster Discussion Meeting, 30 Noviembre - 01 Diciembre 2017. Granada, España.

**Estancias realizadas en centros extranjeros durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral:**

1. **INRAE Val de Loire Center**, Nouzilly, Francia. Duración: 30 días (30/08/2021-30/09/2021). Financiación: Proyectos de I+D+i, del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (P20\_00208).
2. **Università di Verona**, Verona, Italia. Duración: 90 días (25/11/2020-25/02/2021). Financiación: *Federation European Microbiological Societies* (FEMS).

3. **Università del Piemonte Orientale A. Avogadro**, Novara, Italia. Duración: 90 días (27/04/2019-26/07/2019). Financiación: Ayudas complementarias de movilidad destinadas a beneficiarios del programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU), Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

*Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender*

*Marie Curie*



*A mi padre, madre y hermana*

*A Ñoño*



## Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi directora de tesis, la Dra. Conchi Jiménez, por la oportunidad que me ofreció hace ya 5 años de trabajar con ella, especialmente, por el apoyo y confianza depositada en mí durante todos estos años. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado, tus consejos, tu apoyo y ayuda que me han permitido formarme a nivel personal y profesional. Mil gracias por ayudarme siempre y por tu confianza mostrada desde el primer momento, sin tu ayuda no lo habría conseguido.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a todas las personas que han participado activamente en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Gracias al grupo Pocoyó (Dra. Conchi Jiménez, Dra. MariPaz Carrasco, Dr. Guillermo Iglesias y Alberto Sola-Leyva) y al Dr. Ángel Delgado por su ayuda y colaboración en los análisis de hipertermia magnética y evaluación de la actividad *in vitro* de las nanopartículas. Al grupo BIO160, por darme la oportunidad de participar en esta nueva línea de investigación con AS-48. Al Dr. Alejandro Rodríguez Navarro por su ayuda en los análisis mineralógicos de los cristales. A la Dra. Antonia Fernández Vivas por su ayuda en la producción de la proteína MamC y a la Dra. Ana Isabel Azuaga y al Dr. Salvador Casares por su ayuda en la caracterización de la proteína MamC. Al Dr. Luís Álvarez de Cienfuegos y Dr. Rafael Contreras por su trabajo y colaboración en la producción de partículas con nuevos aditivos biológicos. Por último, al Dr. Pérez-Huerta por permitir mi participación en el estudio multidisciplinar de astrobiología.

Además, me gustaría dar las gracias a los todos profesores del departamento, por estar siempre ahí cuando se les necesita.

Por supuesto, agradecer a todos mis compañeros y amigos del departamento por todos los momentos compartidos y por haber sido la mejor compañía durante todos estos años. Siempre quedarán en el recuerdo las míticas tardes de Sonora en las que nos abstraíamos del tiempo, los miércoles de pizza, las tapas de los viernes, las cenas de departamento, los cafés con churros o los descansitos visuales para hacer la fotosíntesis. Gracias a Vicky y Josemaría por todas las risas, las enseñanzas y vivencias compartidas y las conversaciones interminables, que se iniciaron en aquel viaje a Cádiz. Gracias por seguir manteniendo vivo nuestro Velero Vergantil, el cual, a pesar de estar cada uno en un lugar, seguirá surcando los mares. También me gustaría dar las gracias a mis bioquímicos, que siempre

están ahí independientemente del paso de los años y de la distancia existente entre nosotros.

También me gustaría agradecer al Dr. Massimiliano Perduca, la Dra. Sophie Réhault-Godbert y la Dra. María Prat, por acogerme durante las diferentes estancias de investigación realizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, estancias que me han permitido crecer profesionalmente. Gracias a la Dra. Francesca Oltolina y a Salvatore Gaglio por su acogida y por hacerme sentir como en casa.

Gracias a ti Ñoño, gracias por estar siempre a mi lado en cada etapa nueva de mi vida y por apoyarme y animarme con cada sobresalto nuevo. Por supuesto, agradecer a mis padres (Antonio y Mari) y a mi hermana Paula por estar siempre ahí, por educarme, por enseñarme, por apoyarme... sin vosotros no habría llegado a ser la persona que soy, muchas gracias por todo.

A todos MUCHAS GRACIAS.



# **RESUMEN**



Las nanopartículas magnéticas, principalmente las nanopartículas magnéticas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), se han posicionado como una plataforma tecnológica muy versátil en el campo de la nanotecnología condicionadas por sus propiedades magnéticas, físicas, químicas y biológicas. Dado el creciente interés que dichas nanopartículas han generado en la última década, toda la investigación realizada en presente Tesis Doctoral se encuentra enmarcada en el desarrollo y la caracterización de nanosistemas magnéticos y la evaluación de su aplicación en nanotecnología, especialmente, en el campo de la nanomedicina y la astrobiología. Los resultados experimentales obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se exponen en esta memoria divididos en un total de 4 capítulos.

En el **Capítulo I**, se aborda el desafío del estudio y diseño de un protocolo de síntesis de nanopartículas de magnetita potencialmente escalable que permita la obtención de nanopartículas magnéticas con un tamaño y morfología determinados (factores condicionantes de las propiedades magnéticas de las nanopartículas), así como la dotación a estas nanopartículas de grupos funcionales en su superficie, características todas ellas indispensables para su posible aplicación en el campo de la nanotecnología. Además, dicha metodología debe cumplir los parámetros de rentabilidad, sostenibilidad y no presentar un impacto significativo en el medio ambiente. Para ello, se plantean dos enfoques diferentes que implican el uso de la aproximación de la química sintética biomimética utilizando el método de síntesis de coprecipitación para la obtención de estas nanopartículas. En el primero de ellos, una vez optimizada la expresión heteróloga y la purificación de la proteína MamC del magnetosoma de la bacteria magnetotáctica (MTB) *Magnetococcus marinus* MC-1, se expone el estudio de diferentes metodologías de conservación como primer paso hacia el escalado de la síntesis de nanopartículas magnéticas biomiméticas de magnetita mediadas por dicha proteína (BMNPs), las cuales han demostrado tener un gran potencial para su aplicación en nanotecnología. Para ello, se ha evaluado la eficacia de diferentes metodologías de conservación (crioconservación, liofilización y refrigeración) a través del estudio de la conformación y el estado de oligomerización de la proteína conservada mediante el uso de cada una de ellas, así como analizando los cristales obtenidos cuando MamC conservada de manera diferente se introducía en la mezcla de reacción para obtener BMNPs. En este estudio, se ha podido comprobar que, de las diferentes metodologías analizadas, solamente la crioconservación es efectiva para la correcta conservación de la estructura funcional de la proteína y la

preservación del estado monomérico activo de la misma. En relación al segundo enfoque abordado, éste se basa en el uso de aminoácidos simples (Lisina y Arginina) como aditivos biológicos para la síntesis química biomimética de nuevos cristales de magnetita. Así, se ha podido comprobar que el aminoácido lisina es capaz de controlar el tamaño de los cristales obtenidos, a diferencia de otros aminoácidos como la arginina que no ejercen efecto sobre el tamaño. Los cristales Lys-MNP obtenidos presentan un tamaño promedio de 30 nm, comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente, un gran momento magnético por partícula y una alta saturación de magnetización. Además, dichas nanopartículas exponen carga superficial negativa a pH fisiológico como consecuencia del recubrimiento con lisina, facilitando ésto su posible funcionalización con diferentes moléculas mediante interacciones electrostáticas. De esta manera, en dicho estudio, se ha desarrollado un protocolo rentable y potencialmente escalable para la obtención de nanopartículas híbridas que reúnen las características necesarias para su aplicación en nanotecnología.

En el **Capítulo II** nos centramos en la evaluación y el análisis del uso de las nanopartículas BMNPs, nanopartículas ampliamente caracterizadas por nuestro grupo de investigación, como potenciales nanotransportadores de fármacos en combinación con la aplicación de un tratamiento de hipertermia magnética (agentes de hipertermia). Para ello, se plantean dos pruebas de concepto utilizando dos tipos (modelo) de enfermedades localizadas: cáncer y enfermedades infecciosas. En dichos estudios, se diseña, caracteriza, optimiza y se discute el nanosistema formado por la unión de la molécula a transportar unida a las BMNPs, así como también se evalúa su efecto citotóxico o antibacteriano, el mecanismo de acción y la especificidad *in vitro* del nanosistema en combinación o no con la aplicación de un campo magnético alterno (AMF). En la primera de ellas, se ha realizado la unión del inhibidor del enzima colina quinasa  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ), el compuesto Ff35, a las nanopartículas mediante unión electrostática de tipo cooperativo. Por otro lado, los análisis de citotoxicidad y especificidad *in vitro*, realizados utilizando la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2, han probado que dicha unión incrementa la selectividad del fármaco facilitando la internalización del mismo y reduciendo de esta manera su interacción con la captación de colina, así como desencadenan un efecto antiproliferativo. Además, se ha demostrado que el uso combinado de la quimioterapia dirigida junto con la hipertermia magnética incrementa el efecto citotóxico del nanosistema. En la segunda prueba de concepto, se ha realizado la unión del péptido AS-

48 a las nanopartículas BMNPs, también mediante unión electrostática de tipo cooperativo y se ha estudiado su efecto antibacteriano, en combinación o no con el tratamiento de hipertermia magnética, frente a cultivos plantónicos de bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*). El nanosistema presenta un fuerte efecto bactericida en bacterias Gram positivas, así como, sorprendentemente, amplía el espectro de acción del fármaco a bacterias Gram negativas, concretamente, *E. coli*. Además, este comportamiento bactericida también se observa cuando el nanosistema se aplica en combinación con el tratamiento de hipertermia magnética en *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Así, los resultados obtenidos han revelado el potencial del nanosistema desarrollado, tanto en combinación o no con el tratamiento de hipertermia magnética, para su posible aplicación en el tratamiento local antibacteriano de infecciones.

En el **Capítulo III**, se aborda el diseño y la caracterización de nuevas nanoformulaciones que comprendan las nanopartículas BMNPs, para explorar su potencial aplicación como sistemas multifuncionales en el tratamiento local de enfermedades localizadas. Para ello, se han realizado un total de tres estudios para el desarrollo de tres nanoformulaciones magnéticas diferentes. En el primero de ellos, se expone el desarrollo y la caracterización de una nanoformulación que combina dos tipos de nanopartículas magnéticas (nanopartículas de magnetita inorgánicas –MNPs- y BMNPs) y se evalúa su posible efecto en la mejora de la respuesta de hipertermia magnética de la nanoformulación. En dicho trabajo, se ha demostrado que la mezcla de los dos tipos de nanopartículas, especialmente, aquella mezcla compuesta por 25% BMNPs + 75% MNPs, da lugar a un incremento en la respuesta de hipertermia magnética en comparación con la respuesta observada en las nanoformulaciones formadas por un solo tipo de nanopartícula. En el segundo estudio, continuación de la investigación iniciada en el primero, se plantea el desarrollo de una nanoformulación que combine MNPs y TBM (BMNPs funcionalizadas con doxorubicina y el anticuerpo monoclonal AR-3) y se evalúa la posible aplicación de este sistema multifuncional como nanotransportador mediante doble guía (anticuerpos monoclonales y orientación magnética) y como agente de hipertermia. Los resultados obtenidos revelan que la nanoformulación compuesta por 25% TBM + 75% MNPs mejora la estabilidad coloidal y la respuesta de hipertermia en comparación con sus contrapartes compuestas por un

## Resumen

solo tipo de nanopartícula. Por otro lado, en términos de su eficacia como nanotransportador, la nanoformulación muestra una unión estable del fármaco a pH fisiológico, unión que se debilita en presencia de pH ácido (microambiente tumoral), más aún en combinación con la aplicación de un campo magnético alterno, lo que demuestra la sinergia que existe entre estas dos terapias para aumentar de manera relevante la liberación del fármaco en el sitio diana e incrementar de esta manera el efecto citotóxico *in vitro* de la nanoformulación en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29. Por lo tanto, dichos resultados han puesto de manifiesto el potencial de las nanoformulaciones diseñadas para ser dirigidas al sitio diana mediante una doble guía (anticuerpo y orientación magnética) y para actuar como un agente antitumoral de manera bimodal: como agente de hipertermia mediante la aplicación de un AMF y como un nanotransportador para la liberación controlada del fármaco en respuesta a estímulos internos (pH) y externos (incremento de temperatura tras la aplicación del AMF). Por último, el tercer estudio se centra en la mejora de la estabilidad coloidal de las nanopartículas magnéticas (tanto BMNPs como MNPs). Para ello, se plantea el desarrollo de un protocolo de recubrimiento de estas nanopartículas (de manera individual o utilizando las combinaciones caracterizadas en el primer estudio) con una envoltura lipídica para la formación de magnetoliposomas y la evaluación del efecto de esta cubierta tanto en la estabilidad coloidal de la nanoformulación, como en las propiedades magnéticas de la misma, en términos de saturación magnética y respuesta a un AMF. Los magnetoliposomas se formaron mediante la metodología de hidratación del *film*. Presentaban un tamaño promedio de 100 nm y contenían un bajo número de nanopartículas por liposoma (< 10). Además, se puso de manifiesto que la cubierta lipídica incrementaba la estabilidad coloidal de las nanopartículas sin apantallar de manera significativa sus propiedades magnéticas. Por otro lado, se comprobó que dicha cubierta desaparecía tras la aplicación del AMF, lo que condujo al importante resultado de poder controlar de modo remoto la apertura del magnetoliposoma en el sitio diana mediante la aplicación de estímulos externos (AMF).

Finalmente, en el **Capítulo IV**, se aborda una temática que ha generado una gran controversia y debate en el seno de la comunidad científica en las últimas décadas. En particular, abordamos la definición de una huella biogeoquímica para la identificación de cristales de magnetita con origen abiótico, específicamente, la diferenciación entre magnetosomas y magnetitas de origen inorgánico o biomimético. Esta definición es de

una especial relevancia debido a que dichos cristales se pueden utilizar como evidencia de actividad microbiana ligada a la existencia de vida en sedimentos terrestres y extraterrestres, a través del análisis e identificación de magnetofósiles. Con dicho objetivo, se plantea un enfoque que implica el análisis a escala atómica de los tres tipos de magnetita antes indicados utilizando la técnica de tomografía con sonda atómica (APT). En el estudio preliminar realizado, se ha demostrado que los magnetosomas muestran una huella biológica única relacionada con una señal atómica carbono que es significativamente más alta en los magnetosomas en comparación con el resto de los cristales de origen químico (inorgánicos o biomiméticos). Además de proponer esta huella biológica como bioindicador de origen biogénico de muestras naturales, en este trabajo demostramos el potencial de esta metodología APT para su aplicación en la identificación de magnetofósiles.





# **SUMMARY**



Magnetic nanoparticles, especially, magnetite magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), have been positioned as a versatile technological platform in nanotechnology field, conditioned by their magnetic, physical, chemical and biological properties. Given the growing interest generated by these nanoparticles over the last decade, the entire research developed in this Doctoral Thesis is framed in the development and characterization of magnetic nanosystems and the evaluation of their application in nanotechnology, especially, in the field of nanomedicine and astrobiology. The experimental obtained results during the development of this Doctoral Thesis are presented in this memorandum divided in 4 chapters.

**Chapter 1** addresses the study and design of a potentially scalable protocol for the synthesis of magnetite nanoparticles with defined morphological and size properties (factors that condition the magnetic properties of the nanoparticles), as well as with novel surface properties derived from the presence of certain functional groups. These properties are indispensable for their potential application in the nanotechnology field. In addition, this methodology must comply with the parameters of profitability, sustainability and green technology. To this end, two different approaches are here proposed. Both of them involve the use of biomimetic synthetic chemistry approach for the production of these nanoparticles by using the coprecipitation synthesis method. In the first one, once the protocol for the heterologous expression and purification of MamC protein from the magnetosome of magnetotactic bacterium (MTB) *Magnetococcus marinus* MC-1 has been optimized in order to be used in the synthesis of biomimetic magnetic nanoparticles (here referred as BMNPs), this Chapter presents the study of different methodologies for MamC conservation, as a first step towards scaling up the synthesis of BMNPs, which have demonstrated to have a huge potential for their application in nanotechnology. For this goal, the efficacy of different protein conservation methodologies (cryoconservation, lyophilization and refrigeration) was evaluate through the study of the conformation and oligomerization state of conserved protein, as well as, through the analysis of the crystals obtained in their presence. The results show that only the cryoconservation method is adequate to preserve the protein functional structure and activity in the monomeric state. Regarding the second approach addressed, it is focused on the use of simple amino acids (Lysine and Arginine) as biological additives for the production of new magnetite crystals by the use of biomimetic synthetic chemistry. Our results show that lysine amino acid is able to exert a control over the size of the obtained

## Summary

crystals, compared with other amino acids, such as arginine, that do not possess this ability. Lys-MNP crystals expose an average size of 30 nm, superparamagnetic character at room temperature, a large magnetic moment per particle and a high magnetic saturation. Indeed, these nanoparticles expose a negative surface charge at physiological pH, conditioned by the presence of Lysine on the surface of crystals, which eases their possible functionalization with different molecules by electrostatic interactions. Thus, in this study, a cost-effective and potentially scalable protocol has been developed for the production of hybrids nanoparticles that display the characteristic needed for their application in nanotechnology.

**Chapter II** is focused on the evaluation of the use of BMNPs that have been extensively characterized by our research group, as potential drug nanocarriers in combination with the application of magnetic hyperthermia (hyperthermia agents). To this end, two different proofs of concept are proposed by the use of two localized disease models: cancer and infections. In these studies, the design and characterization of the cargo (therapeutic agent) to BMNPs is attained, as well as the evaluation of the cytotoxic effect, mechanism of action and the *in vitro* specificity of the nanosystem in combination (or not) with the application of an alternating magnetic field (AMF). In the first approach, the chemotherapeutic molecule Ff35, an inhibitor of the choline kinase  $\alpha 1$  enzyme (ChoK $\alpha 1$ ), was attached to BMNPs by cooperative electrostatic interaction. The cytotoxicity and specificity of this nanosystem was studied in *in vitro* analysis by using the human hepatoblastoma HepG2 cell line. The results demonstrated that this binding increases the inhibitor selectivity by easing its internalization and reducing its interaction with choline uptake, while keeping its antiproliferative effect. In addition, it was proved that the use of this nanosystem combined with magnetic hyperthermia increases its cytotoxic effect. Regarding the second proof of concept, the peptide AS-48 was attached to BMNPs by cooperative electrostatic interaction and the antibacterial effect of the nanosystem in combination (or not) with magnetic hyperthermia treatment was evaluated against planktonic cultures of Gram positive (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus*) and Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*) bacteria. The nanosystem exposed a strong bactericidal effect against Gram positive bacteria and, surprisingly, it amplified the spectrum of peptide action to Gram negative bacteria, in particular, to *E. coli*. By combining with magnetic hyperthermia, the nanosystem also had a fast bactericidal effect

against *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Thus, the obtained results have revealed the potential of the nanosystem, both in combination or not with magnetic hyperthermia treatment, for a potential application in the local antibacterial treatment of infections.

**Chapter III** addresses the design and characterization of new nanoformulations comprising BMNPs, with the goal of exploring their potential application as multifunctional systems for the local treatment of localized diseases. For this purpose, three studies have been carried out for the design of three different magnetic nanoformulations. In the first one, the development and characterization of a nanoformulation that combines two types of magnetic nanoparticles (inorganic magnetic nanoparticles –MNPs- and BMNPs) was presented and its possible effect on the improvement of the magnetic hyperthermia response was evaluated. In this work, it was shown that the mixture of two type of nanoparticles, especially, that mixture composed of 25% BMNPs + 75% MNPs, behave as a better magnetic hyperthermia agent compared to nanoformulations that contain one of the endmembers. In the second study, which is a continuation of the investigation initiated in the first one, the development of a nanoformulation that combined MNPs and TBM (BMNPs functionalized with doxorubicin and the monoclonal antibody AR-3) was addressed and its possible application as drug nanocarrier with dual guidance (monoclonal antibodies and magnetic orientation) and as magnetic hyperthermia agent was evaluated. The obtained results revealed that the nanoformulation composed of 25% TBM + 75% MNPs improved the colloidal stability and the magnetic hyperthermia response of the system in comparison with its counterparts composed by only one type of nanoparticle. On the other hand, in the context of efficiency as drug nanocarrier, the nanoformulation showed a stable drug binding at physiological pH. This binding was weakened at acidic pH (tumor microenvironment) and even further upon combination with an AMF, revealing the existence of a synergy effect between these two therapies to significantly increase the drug release and, thus, the *in vitro* cytotoxic effect on the human colorectal adenocarcinoma HT-29 cell line. Therefore, these results highlighted the potential approach of this multifunctional nanosystem to be directed to the target site by dual guidance (monoclonal antibodies and magnetic orientation) and act as an antitumoral agent in a bimodal manner: acting as hyperthermia agent by AMF application and as a nanocarrier for the controlled drug release in response to internal (pH) and external (temperature increment after AMF application) stimuli. Finally, the third study is focused

## *Summary*

on the magnetic nanoparticles (both BMNPs and MNPs) colloidal stability improvement. To this end, the optimization of a protocol for the encapsulation of these nanoparticles inside a lipid cover for the formation of magnetoliposomes was addressed and the effect of this covering on the colloidal stability and magnetic properties, in terms of magnetic saturation and AMF response, was evaluated. The magnetoliposomes were produced by the thin-film hydration method, they showed an average size of 100 nm and contained a low number ( $< 10$ ) of particles per liposome. Indeed, the lipid coating increased the colloidal stability of the nanoparticles without significantly shielding their magnetic properties. On the other hand, this lipid coating was broken after the AMF application, showing the potential of this nanoformulation for its application as hyperthermia agents, in which the release of the magnetoliposomes content could be controlled externally by the application of external stimuli (AMF).

Finally, **Chapter IV** focuses on a subject that has generated a huge controversy and debate within the scientific community over the last few decades. This subject is related with biogeochemical signatures for the identification and differentiation of magnetosomes from inorganic or biomimetic magnetite crystals. The determination of reliable biosignatures is crucial, since magnetosomes have been used as evidence of microbial activity linked to the existence of life in terrestrial and extraterrestrial sediments through the analysis and identification of magnetofossils. To this goal, a preliminary approach involving the evaluation and definition of a new biogeochemical fingerprinting of magnetosomes by analyzing its chemical composition at atomic scale using atom probe tomography (APT) methodology was addressed. The obtained results showed that magnetosomes exposed a unique biosignature related with a carbon signal that is significantly higher in magnetosomes compared to the other crystals produced chemically (inorganic or biomimetic). Thus, this study revealed the potential of the APT methodology for its application in the identification of a new biogeochemical fingerprinting presented in magnetofossils.

# ÍNDICE





<b>Introducción .....</b>	<b>49</b>
1. Nanopartículas de magnetita: propiedades y síntesis .....	51
1.1. Propiedades .....	51
1.1.1. Mineralogía, composición química y morfología del cristal.....	51
1.1.2. Comportamiento magnético .....	52
1.2. Procesos de formación y síntesis .....	56
1.2.1. Mineralización inorgánica .....	57
1.2.2. Mineralización controlada/inducida biológicamente: Biomineralización	59
1.2.3. Bacterias magnetotácticas (MTB) .....	62
1.3. Biomimética.....	68
1.4. Limitación del escalado de la producción de nanopartículas de magnetita .....	75
1.5. Estabilización de las nanopartículas magnéticas .....	77
2. Nanopartículas de magnetita: una plataforma tecnológica muy versátil.....	79
2.1. Aplicaciones tecnológicas y biotecnológicas .....	79
2.2. Nanopartículas magnéticas en nanomedicina: el reto del tratamiento local de enfermedades localizadas .....	83
2.2.1. Retos y desafíos .....	85
2.2.2. Soluciones actuales.....	95
2.2.3. Alternativa: Nanopartículas magnéticas.....	99
3. Nanopartículas de magnetita como magnetofósiles: en busca de la huella definitiva de las MTB .....	121

**Objetivos..... 127**

**Materiales y Métodos ..... 133**

1. Expresión, purificación, conservación y caracterización de proteínas ..... 135

1.1. Purificación de la proteína MamC ..... 135

1.1.1. Métodos para la conservación de la proteína MamC ..... 136

1.2. Purificación de la bacteriocina AS-48 ..... 137

1.3. Caracterización físico-química ..... 137

1.3.1. Dicroísmo circular (CD)..... 137

1.3.2. Dispersión de luz dinámica (DLS) ..... 138

2. Biomineralización de nanopartículas de magnetita ..... 138

2.1. Síntesis de nanopartículas de magnetita inorgánicas (MNPs) ..... 138

2.2. Síntesis de nanopartículas de magnetita biomimética en presencia de la proteína MamC (BMNPs) ..... 139

2.3. Síntesis de nanopartículas de magnetita en presencia de aminoácidos..... 140

2.3.1. Precipitación a diferentes pHs ..... 140

2.4. Purificación, preparación y conservación de las nanopartículas de magnetita ..... 140

3. Desarrollo y formulación de liposomas y magnetoliposomas..... 141

3.1. Preparación de las nanopartículas de magnetita ..... 141

3.2. Síntesis de liposomas y magnetoliposomas ..... 141

4. Adsorción de diferentes moléculas sobre nanopartículas de magnetita ..... 143

4.1. Adsorción de aminoácidos sobre MNPs ..... 143

4.2.	Adsorción del anticuerpo monoclonal (mAb) AR-3 y el quimioterápico doxorubicina (DOXO) sobre BMNPs .....	143
4.3.	Adsorción de Ff35 sobre BMNPs .....	145
4.3.1.	Estudio del modelo de unión: cinética e isoterma de adsorción .....	145
4.4.	Adsorción de AS-48 sobre BMNPs .....	147
4.4.1.	Estudio del modelo de unión: cinética e isoterma de adsorción .....	147
4.4.2.	Estudio del modelo de desunión: cinética de liberación .....	147
5.	Estudio y caracterización de las formulaciones desarrolladas .....	148
5.1.	Difractometría de rayos X (XRD) .....	148
5.2.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	148
5.2.1.	Preparación de nanopartículas de magnetita .....	148
5.2.2.	Preparación de magnetoliposomas y liposomas .....	149
5.2.3.	Cálculo de distribución de tamaño .....	149
5.2.4.	Microscopio electrónico de alta resolución (HR-TEM): difracción de electrones del área seleccionada (SAED) .....	149
5.3.	Análisis termogravimétrico (TGA) .....	150
5.4.	Carga superficial: potencial- $\zeta$ .....	150
5.5.	Radio hidrodinámico .....	150
5.6.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) .....	151
5.7.	Propiedades magnéticas .....	151
5.7.1.	Enfriamiento de campo cero (ZFC-W) y enfriamiento de campo (FC-C) .....	151
5.7.2.	Ciclo de histéresis .....	152

## Índice

5.8.	Estabilidad coloidal.....	152
5.9.	Hipertermia magnética.....	152
5.9.1.	Efecto de la hipertermia magnética en la cinética de liberación de DOXO.....	154
5.9.2.	Efecto de la hipertermia magnética en el recubrimiento lipídico de las nanopartículas.....	154
5.10.	Tomografía de sonda atómica.....	154
6.	Estudios <i>in vitro</i> : cáncer.....	155
6.1.	Cultivos celulares.....	155
6.1.1.	HepG2.....	155
6.1.2.	HT-29.....	155
6.2.	Citotoxicidad y proliferación celular.....	156
6.2.1.	Ensayo colorimétrico mediante Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difenitetrazol (MTT).....	156
6.2.2.	Medida de la concentración media inhibitoria del crecimiento (GI <sub>50</sub> ) ...	157
6.2.3.	Estudio del efecto de la hipertermia magnética en la viabilidad celular	157
6.3.	Estudio de la interacción celular de las formulaciones: internalización, mecanismo de acción y especificidad.....	158
6.3.1.	Internalización celular.....	158
6.3.2.	Inhibición del enzima colina quinasa $\alpha 1$ (ChoK $\alpha 1$ ).....	158
6.3.3.	Inhibición de la absorción celular de colina.....	159
7.	Estudios <i>in vitro</i> : enfermedades infecciosas.....	160
7.1.	Cepas y condiciones de cultivo.....	160

7.2. Citotoxicidad <i>in vitro</i> en cultivos plantónicos .....	160
7.2.1. Determinación de la actividad antibacteriana a largo plazo .....	160
7.2.2. Determinación del efecto de la hipertermia a corto plazo .....	161
8. Análisis estadísticos.....	162
<b>Capítulo I.....</b>	<b>163</b>
Protein Conservation Method Affects MamC-Mediated Biomineralization of Magnetic Nanoparticles .....	165
Lysine as Size Control Additive in a Bioinspired Synthesis of Pure Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles.....	185
<b>Capítulo II .....</b>	<b>221</b>
Biomimetic Magnetic Nanocarriers Drive Choline Kinase Alpha Inhibitor inside Cancer Cells for Combined Chemo-Hyperthermia Therapy .....	223
Antibacterial directed chemotherapy using AS-48 peptide immobilized on biomimetic magnetic nanoparticles combined with magnetic hyperthermia .....	245
<b>Capítulo III .....</b>	<b>267</b>
Enhancement of Magnetic Hyperthermia by Mixing Synthetic Inorganic and Biomimetic Magnetic Nanoparticles.....	269
Nanoformulation Design Including MamC-Mediated Biomimetic Nanoparticles Allows the Simultaneous Application of Targeted Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia .....	293
Magnetoliposomes of mixed biomimetic and inorganic magnetic nanoparticles as enhanced hyperthermia agents.....	319
<b>Capítulo IV.....</b>	<b>345</b>

*Índice*

Huella biogeoquímica de la magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) procedente de las bacterias magnetotácticas ..... 347

**Discusión..... 359**

**Conclusiones ..... 389**

**Conclusions ..... 395**

**Bibliografía..... 399**

# **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**





## Índice de abreviaturas

<b>AMF:</b>	Campo magnético alterno ( <i>Alternating Magnetic Field</i> )
<b>APT:</b>	Tomografía con sonda atómica ( <i>Atom Probe Tomography</i> )
<b>Arg:</b>	Arginina
<b>BCM:</b>	Mineralización Controlada Biológicamente ( <i>Biologically Controlled Mineralization</i> )
<b>BIM:</b>	Mineralización Inducida Biológicamente ( <i>Biologically Induced Mineralization</i> )
<b>BMNPs:</b>	Nanopartículas magnéticas biomiméticas de magnetita mediadas por la proteína MamC ( <i>Biomimetic Magnetic Nanoparticles</i> )
<b>CD:</b>	Dicroísmo circular ( <i>Circular Dichroism</i> )
<b>ChoK<math>\alpha</math>1:</b>	Enzima colina quinasa $\alpha$ 1
<b>CIC:</b>	Centro de Instrumentación Científica
<b>CSD:</b>	Distribución de tamaño de los cristales ( <i>Crystal Size Distribution</i> )
<b>DF-I</b>	Forma hidrosoluble dimérica I
<b>DF-II</b>	Forma hidrofóbica dimérica II
<b>DLS:</b>	Dispersión de luz dinámica ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO:</b>	Densidad óptica
<b>DOXO:</b>	Doxorrubicina
<b>DR:</b>	Eficiencia de liberación
<b>EDXS:</b>	Espectroscopía de rayos X por dispersión en energía ( <i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> )
<b>EELS:</b>	Espectroscopía de pérdida de energía de electrones ( <i>Electron Energy-Loss Spectroscopy</i> )

## Índice de abreviaturas

<b>EGFR:</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>EMA:</b>	Agencia Europea de Medicamentos ( <i>European Medicines Agency</i> )
<b>EPR:</b>	Efecto de retención y permeabilidad aumentadas ( <i>Enhanced Permeability and Retention effect</i> )
<b>EPS:</b>	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
<b>f:</b>	Frecuencia
<b>FBS:</b>	Suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>FC-C:</b>	Enfriamiento de campo ( <i>Field Cooling</i> )
<b>FDA:</b>	Agencia de Medicamentos y Alimentación ( <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FIB:</b>	Haz de iones focalizados ( <i>Focused Ion Beam</i> )
<b>FMR:</b>	Espectroscopia de resonancia ferromagnética ( <i>Ferromagnetic Resonance Spectroscopy</i> )
<b>FORC:</b>	Curvas de inversión de primer orden ( <i>First-Order Reversal Curves</i> )
<b>FPLC:</b>	Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas ( <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> )
<b>FRs</b>	Receptores de folato
<b>FT-IR:</b>	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)
<b>Ga:</b>	Mil millones de años
<b>GI<sub>50</sub>:</b>	Concentración media inhibitoria del crecimiento
<b>GLP:</b>	Buenas prácticas de laboratorio ( <i>Good Laboratory Practices</i> )
<b>GMP:</b>	Buenas prácticas de fabricación ( <i>Good Manufacturing Practice</i> )
<b>H (o H<sub>0</sub>):</b>	Intensidad del campo magnético
<b>H<sub>c</sub>:</b>	Coercividad
<b>HER2:</b>	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>HR-TEM:</b>	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución ( <i>High Resolution Transmission Electron Microscopy</i> )

<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración media que produce una inhibición del 50%
<b><i>iep</i></b>	Punto isoeléctrico
<b>ILP:</b>	Pérdida de potencia intrínseca ( <i>Intrinsic Loss Power</i> )
<b>IND:</b>	Nuevo Medicamento de Investigación ( <i>Investigational New Drug</i> )
<b>IPTG:</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>LB:</b>	Medio Luria Bertani
<b>LF:</b>	Langmuir-Freundlich
<b>Lys:</b>	Lisina
<b>Ma:</b>	Millón de años
<b>mAb:</b>	Anticuerpo monoclonal ( <i>monoclonal antibody</i> )
<b>MAI:</b>	Isla del magnetosoma ( <i>Magnetosome Island</i> )
<b>MAPs:</b>	Proteínas asociadas al magnetosoma ( <i>Magnetosome Associated Proteins</i> )
<b>MDR:</b>	Resistencia múltiple a fármacos ( <i>Multidrug Resistance</i> )
<b>MEM:</b>	Medio mínimo esencial de <i>Eagle</i> ( <i>Minimum Essential Medium</i> )
<b>MMP:</b>	Metaloproteinasas de matriz
<b>MNPs:</b>	Nanopartículas de magnetita inorgánica ( <i>Magnetic Nanoparticles</i> )
<b>MPS:</b>	Sistema fagocítico mononuclear ( <i>Mononuclear Phagocyte System</i> )
<b>M<sub>r</sub>:</b>	Magnetización remanente
<b>MRI:</b>	Resonancia magnética de imagen ( <i>Magnetic Resonance Imaging</i> )
<b>M<sub>s</sub>:</b>	Magnetización de saturación
<b>MTB:</b>	Bacterias magnetotácticas ( <i>Magnetotactic Bacteria</i> )
<b>MTT:</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NCL:</b>	Laboratorio de Caracterización Nanotecnológica ( <i>Nanotechnology Characterization Lab</i> )

## Índice de abreviaturas

<b>PC:</b>	L- $\alpha$ -fosfatidilcolina ( <i>Phosphatidylcholine</i> )
<b>PEG:</b>	Polietilenglicol
<b>PLGA:</b>	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
<b>PSMA:</b>	Antígeno prostático específico de membrana
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RP-HPLC:</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa ( <i>Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>SAED:</b>	Difracción de electrones del área seleccionada ( <i>Selected Area Electron Diffraction</i> )
<b>SAR:</b>	Tasa de absorción de calor específica ( <i>Specific Absorption Rate</i> )
<b>SDS-PAGE:</b>	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>T<sub>B</sub>:</b>	Temperatura de bloqueo
<b>T<sub>c</sub>:</b>	Temperatura de Curie
<b>TEM:</b>	Microscopía electrónica de transmisión ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
<b>TfR:</b>	Receptor de la transferrina
<b>TGA:</b>	Análisis termogravimétrico
<b>T<sub>irr</sub>:</b>	Temperatura de irreversibilidad
<b>TSA:</b>	Agar Tripticaseína de Soja
<b>TSB:</b>	Caldo Tripticaseína de Soja
<b>VCAM:</b>	Molécula de adhesión celular vascular
<b>VEGF:</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>XRD:</b>	Difractometría de rayos X
<b>ZFC-W:</b>	Enfriamiento de campo cero ( <i>Zero-Field Cooling</i> )

# **INTRODUCCIÓN**

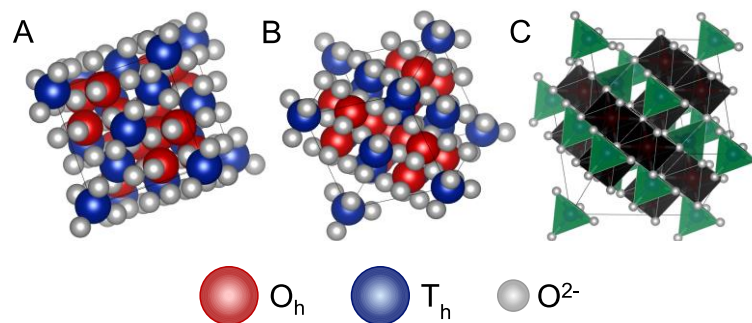


# 1. Nanopartículas de magnetita: propiedades y síntesis

## 1.1. Propiedades

### 1.1.1. Mineralogía, composición química y morfología del cristal

La **magnetita** ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), que constituye el material magnético más antiguo conocido, es un óxido ferroso diférrico que presenta la siguiente fórmula estructural  $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ . La estructura detallada de la magnetita se determinó en 1915 mediante difracción de rayos X (Bragg 1915). A temperatura ambiente, la magnetita cristaliza en una estructura de espinela inversa. Su celda unidad está compuesta por 32 iones de oxígeno que forman una red cúbica compacta, donde los cationes de hierro ocupan los sitios intersticiales. Dichos cationes de hierro pueden ocupar dos sitios diferentes en la red: octaédricos ( $\text{O}_h$ ) y/o tetraédricos ( $\text{T}_d$ ). Cada celda unidad contiene un total de 16 sitios  $\text{T}_d$  y 8 sitios  $\text{O}_h$ , donde los sitios  $\text{T}_d$  y la mitad de los sitios  $\text{O}_h$  están ocupados por iones  $\text{Fe}^{3+}$ , mientras que la otra mitad de los sitios  $\text{O}_h$  está ocupada por iones  $\text{Fe}^{2+}$ . Por lo tanto, la estructura completa está compuesta por capas octaédricas alternadas con capas octaédricas-tetraédricas (Figura 1), las cuales se encuentran apiladas a lo largo de la dirección [111] (Cornell and Schwertmann 2006; Winklhofer 2008).

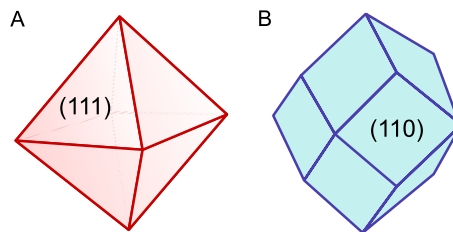


**Figura 1.** (A) y (B) Celda unidad del mineral de magnetita (visualizada con el programa Vesta, (Momma and Izumi 2011)). (C) Modelo poliédrico de la celda unidad que alterna capas octaédricas y capas octaédricas-tetraédricas. Los octaedros están representados en negro y los tetraedros en verde.

Teóricamente, la magnetita presenta una relación estequiométrica  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  igual a 0,5. Sin embargo, la magnetita generalmente no expresa dicha relación condicionada,

principalmente, por una deficiencia en cationes  $\text{Fe}^{3+}$ . Además, el catión divalente  $\text{Fe}^{2+}$  puede ser parcial o totalmente reemplazado por otros cationes divalentes (como el  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  o el  $\text{Zn}^{2+}$ ), como consecuencia de la flexibilidad de la red formada por los átomos de oxígeno, la cual puede expandirse y contraerse para incorporar cationes con tamaños diferentes al catión divalente  $\text{Fe}^{2+}$  (Cornell and Schwertmann 2006).

En relación a la morfología del cristal, la magnetita suele presentar, principalmente, una morfología en forma de **cristales octaédricos** unidos por los planos [111], así como **cristales rombo-dodecaedros** (Figura 2). Sin embargo, se pueden obtener morfologías distintas a las anteriores (esféricas, cúbicas o pseudo-cúbicas) en función de los parámetros utilizados durante el proceso de síntesis (Cornell and Schwertmann 2006).



**Figura 2.** Morfologías del cristal de magnetita. (A) Cristal octaédrico. (B) Cristal rombo-dodecaedro.

### 1.1.2. Comportamiento magnético

En función de la respuesta del dipolo magnético intrínseco del material, así como de la magnetización neta que éste presente en ausencia y presencia de un campo magnético, los materiales se pueden clasificar como diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos y anti-ferromagnéticos (Figura 3) (Jeong et al. 2007; Kolhatkar et al. 2013).

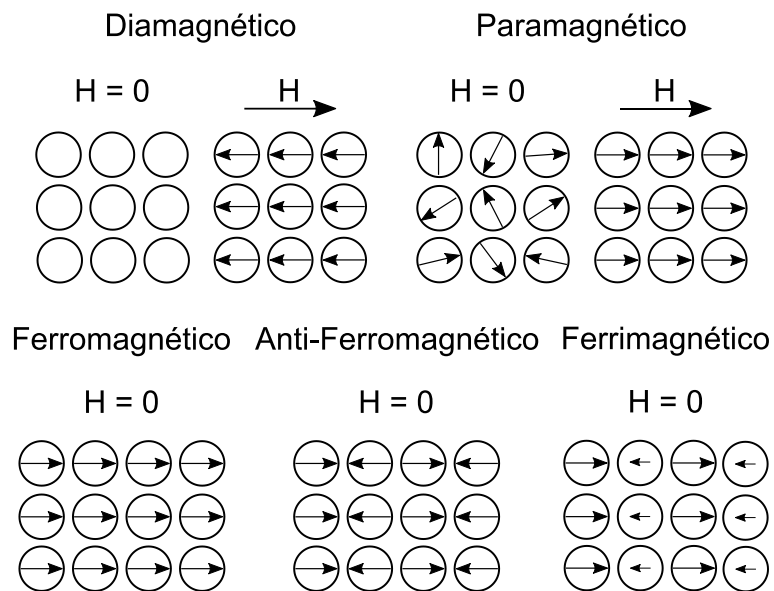
Los **materiales diamagnéticos**, en ausencia de un campo magnético, no presentan dipolos magnéticos. Sin embargo, tras la aplicación de un campo magnético, el material produce un dipolo magnético opuesto al del campo aplicado, por lo que es repelido por éste.

Los **materiales paramagnéticos** presentan dipolos magnéticos en ausencia de campo, pero éstos sólo se alinean (total o parcialmente) tras la aplicación de un campo



magnético alterno, siendo atraídos por éste. Una vez retirado dicho campo, no retienen las propiedades magnéticas.

En el caso de los tres tipos restantes, todos ellos son fuertemente atraídos en presencia de un campo magnético (Cornell and Schwertmann 2006). Por lo tanto, la magnetización que presentan en ausencia de campo magnético aplicado determina el tipo de material. Así, los **materiales ferromagnéticos** presentan momentos dipolares magnéticos netos en ausencia de un campo magnético externo. En el caso de los **materiales anti-ferromagnéticos** y **ferrimagnéticos**, sus momentos dipolares a nivel atómico son similares a los de los materiales ferromagnéticos. Sin embargo, éstos presentan momentos dipolares adyacentes que no están orientados en paralelo cancelando (anti-ferromagnéticos) o reduciendo (ferrimagnéticos) el impacto de los dipolos magnéticos vecinos dentro del material en ausencia de un campo aplicado. En ausencia de campo, en un material ferrimagnético, siempre hay dipolos magnéticos más débiles alineados de manera anti-paralela a los dipolos adyacentes más fuertes, mientras que en un material anti-ferromagnético, los dipolos adyacentes son anti-paralelos cancelándose unos a otros (Jeong et al. 2007).

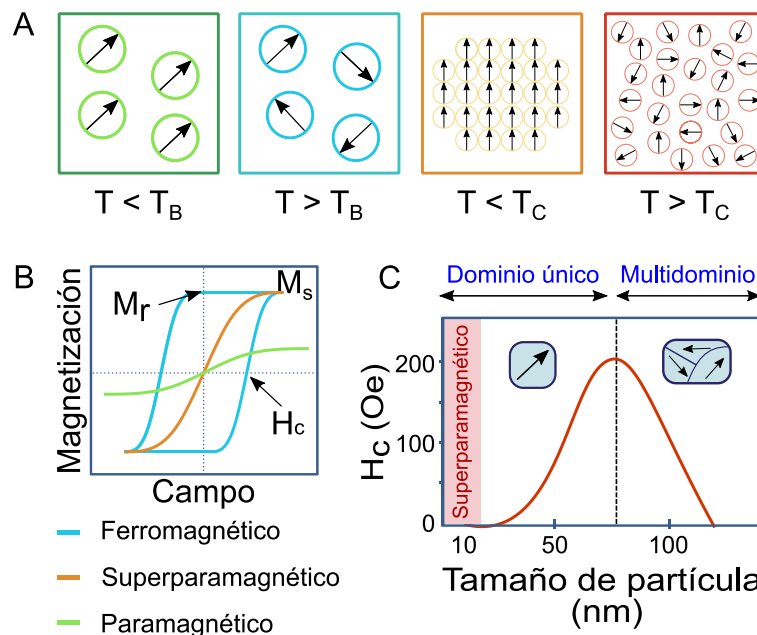


**Figura 3.** Respuesta de los diferentes materiales magnéticos en ausencia y presencia de un campo magnético externo ( $H$ ). De acuerdo al alineamiento y la respuesta de los dipolos magnéticos, dichos materiales se clasifican como diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, anti-ferromagnéticos y ferrimagnéticos.

En relación a nuestro mineral objeto de estudio, la magnetita consiste en un material ferrimagnético. Los momentos magnéticos de los sitios tetraédricos (ocupados por especies férricas) se encuentran alineados ferromagnéticamente, mientras que los momentos magnéticos de los sitios octaédricos (ocupados por especies ferrosas y férricas) son anti-ferromagnéticos, presentando dichos momentos magnéticos diferentes magnitudes dando, por tanto, lugar al comportamiento ferrimagnético (Blaney 2007; Cornell and Schwertmann 2006).

Las **propiedades magnéticas** de un material están condicionadas por diferentes factores, tales como el tamaño o la temperatura. Respecto al tamaño, cuando el tamaño de una nanopartícula ferrimagnética disminuye por debajo de un cierto valor crítico (valor que depende de diferentes parámetros del material), las nanopartículas cambian de un estado con múltiples dominios magnéticos a un estado de dominio único magnético. En dicho estado de dominio único, la energía térmica se vuelve comparable a aquella requerida para la inversión del momento magnético, lo que da lugar a la aleatorización de los dipolos magnéticos en un corto periodo de tiempo. Como consecuencia, estas nanopartículas presentan un momento magnético promedio cero en ausencia de un campo externo. Por el contrario, aumentan rápidamente su momento magnético bajo la aplicación de un campo magnético externo. Estas nanopartículas se clasifican como **superparamagnéticas** (Jeong et al. 2007; Kolhatkar et al. 2013). La temperatura es otro factor que condiciona las propiedades magnéticas de un material. En el caso de materiales ferri/ferromagnéticos, la disposición ordenada de los momentos magnéticos disminuye al aumentar la temperatura, como consecuencia de las fluctuaciones térmicas de los momentos individuales. Cuando se alcanza un valor crítico, se producen aleatorizaciones rápidas de los momentos magnéticos que conducen a un momento magnético neto promedio cero (comportamiento paramagnético). Este valor crítico se denomina temperatura de Curie ( $T_C$ ) para materiales ferri/ferromagnéticos (Figura 4A) (Kolhatkar et al. 2013; Teja and Koh 2009). Así, la magnetita es un material ferrimagnético a temperatura ambiente, ya que presenta una  $T_C = 850$  K (Cornell and Schwertmann 2006). En el caso de los materiales superparamagnéticos (como las nanopartículas de magnetita superparamagnéticas), existe un parámetro similar denominado temperatura de bloqueo ( $T_B$ ), el cual consiste en un punto de transición en el que la energía térmica es comparable a la energía de la anisotropía magnética, es decir, la energía necesaria para reorientar el momento magnético (Figura 4A) (Jeong et al. 2007). Este valor depende del tiempo de

medición, el cual puede variar entre 100 a  $10^{-8}$  segundos. Si el tiempo de medición es mayor al tiempo de relajación (tiempo en el que se reorienta el momento magnético), se considera que las nanopartículas están en régimen superparamagnético. Por el contrario, si el tiempo de medición es menor al tiempo de relajación, las nanopartículas se encuentran “bloqueadas”, pudiendo observar propiedades cuasi-estáticas como en los sistemas magnéticos ordenados (Knobel et al. 2008).



**Figura 4.** Propiedades y comportamientos magnéticos. (A) Comparativa entre la temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) y la temperatura de Curie ( $T_C$ ). (B) Ciclo de histéresis de materiales ferromagnéticos, superparamagnéticos y paramagnéticos, donde  $M_r$  es la magnetización remanente,  $M_s$  la magnetización de saturación y  $H_c$  la coercividad. (C) Relación de dependencia entre la coercividad y el tamaño de las nanopartículas de magnetita. Imagen adaptada y modificada de Kolhatkar et al. 2013, Li et al. 2017 y Majetich et al. 2013.

Por otro lado, el **comportamiento magnético** de un material bajo la influencia de un campo magnético externo va a variar en función del tipo de material (Figura 4B). Para todos los materiales, se define la magnetización de saturación ( $M_s$ ) como aquella magnetización máxima posible, la cual tiene lugar cuando todos los dipolos magnéticos están alineados en un campo magnético externo. En el caso de materiales ferri/ferromagnéticos, la curva de magnetización presenta tanto magnetización remanente ( $M_r$ , magnetización inducida restante tras eliminar el campo aplicado), como

coercitividad ( $H_c$ , la intensidad de un campo magnético que se ha de aplicar para reducir la magnetización del material a cero después de que éste haya sido magnetizado hasta la saturación). En el caso de los materiales superparamagnéticos, se puede observar una curva sigmoidea donde no hay ni coercitividad ni remanencia en el ciclo de histéresis (Kolhatkar et al. 2013).

La coercitividad es un parámetro que depende de diferentes factores como son el tamaño, la morfología de las partículas, el estado de oxidación o su organización. En el caso del tamaño, a medida que se reduce el tamaño de la nanopartícula, la coercitividad aumenta al máximo para luego disminuir hasta cero (Mody et al. 2014). Por debajo de un diámetro crítico, la coercitividad se vuelve cero (Figura 4C). En el caso de las nanopartículas de magnetita, nanopartículas  $< 30$  nm son superparamagnéticas, es decir, no presentan magnetización remanente a temperatura ambiente en ausencia de campo. Las nanopartículas comprendidas entre 30 y 80-100 nm son de dominio único estable, exponiendo un dominio único magnético y la mayor coercitividad estable. Por último, las nanopartículas  $> 100$  nm son multidominio, es decir, presentan más de un dominio magnético y coercitividad reducida en comparación con las de dominio único estable debido a que cada dominio magnético posee direccionalidad independiente, lo que resulta en la disminución de la coercitividad magnética neta (Bennet et al. 2015; Jun et al. 2007; Li et al. 2017). Por otro lado, cuando el tamaño de las nanopartículas de magnetita es similar, la morfología también ejerce su efecto sobre la coercitividad (esferas  $<$  cubos  $<$  octaedros), en relación con el aumento en el número de ejes magnéticos a lo largo de las diferentes formas de la serie. Así, controlando las condiciones de precipitación de las nanopartículas magnetita y, por tanto, las propiedades de tamaño y morfología, se pueden obtener nanopartículas de magnetita con coercitividades que varían entre 2,4 a 20 kA / m (Cornell and Schwertmann 2006; Meisen and Kathrein 2000).

## **1.2. Procesos de formación y síntesis**

La magnetita se puede formar en diferentes ambientes, desde aquéllos donde se encuentran condiciones de altas presiones y temperaturas, hasta ambientes sedimentarios donde tienen lugar formaciones a baja temperatura. Así, se ha encontrado presente en diferentes tipos de rocas y sedimentos. Además, se ha encontrado magnetita en rocas de origen extraterrestre, como es el caso del meteorito ALH84001 procedente de Marte

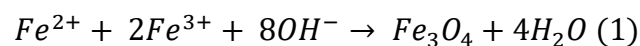
(Thomas-Keprta et al. 2000). Por otro lado, la magnetita también está presente en la mayoría de las formas de vida terrestre (Bazylinski and Frankel 2003; Frankel and Bazylinski 2003). De esta manera, por ejemplo, se ha encontrado la presencia de magnetita en bacterias (Frankel et al. 1979), hongos (Bharde et al. 2006), algas (Torres de Araujo et al. 1986) o en animales presentando diferentes funciones (Kirschvink 1981; Kirschvink and Lowenstam 1979; Walcott et al. 1979). Una de las funciones más importantes es la de dotar a los organismos que la poseen de la capacidad de orientarse con el campo magnético terrestre, función vital en animales migratorios.

Por lo tanto, la magnetita puede presentar un **origen abiótico**, a través de su precipitación inorgánica, o **biótico**, si se produce su precipitación o mineralización en organismos, lo que se conoce como biomineralización.

### 1.2.1. Mineralización inorgánica

En la actualidad, existen una amplia variedad de metodologías para la síntesis de nanopartículas de magnetita inorgánica (MNPs del inglés *Magnetic Nanoparticles*), cada una de las cuales está determinada por las condiciones de reacción y las características de las nanopartículas de magnetita que se desean obtener. Por lo general, el uso de un procedimiento u otro va a estar condicionado por la aplicación de las nanopartículas de magnetita sintetizadas (El-Boubbou 2018; Laurent et al. 2008).

La metodología clásica de **coprecipitación**, introducida en 1981 (Massart 1981), constituye el procedimiento químico más simple y eficiente para obtener MNPs. En el procedimiento, se produce la coprecipitación en agua de los iones  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ , mediante el uso de una relación estequiométrica 2:1 ( $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ ), a pH alcalino comprendido entre 8 y 14, y en un medio no oxidante (libre de oxígeno) (Garrels and Christ 1990; Jolivet et al. 2004). La reacción química para la formación de MNPs sigue la siguiente ecuación:



La principal ventaja de esta metodología es la posibilidad de sintetizar una gran cantidad de nanopartículas de una manera simple y económica, permitiendo su escudo. Sin embargo, presenta el inconveniente de no poder ejercer un gran control sobre la distribución de tamaño de las MNPs, ya que los factores cinéticos controlan el crecimiento del cristal. A pesar de ello, existen numerosas estrategias para controlar tanto

el tamaño como la forma de las MNPs en el proceso de coprecipitación. Tales estrategias incluyen la modificación o el ajuste de parámetros como el pH, la fuerza iónica del medio, la temperatura, la naturaleza de las sales usadas o la relación de las concentraciones  $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$  (Babes et al. 1999; Gribanov et al. 1990). Por otro lado, el uso de aditivos en la coprecipitación como ácidos orgánicos (ácido cítrico o ácido oleico) o polímeros (dextrano o polivinilalcohol), que actúen como quelantes de los iones de hierro también han resultado ser una estrategia eficiente para controlar el tamaño de las nanopartículas, así como sus características superficiales (El-Boubbou 2018; Laurent et al. 2008).

Otro método muy utilizado es la **síntesis hidrotermal**. Esta metodología se utiliza para sintetizar MNPs en medios acuosos en reactores o autoclaves a altas temperaturas ( $> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y altas presiones ( $> 13.790\text{ kPa}$ ) (Chen et al. 2008; Ge et al. 2009; Kholam et al. 2002). Las altas temperaturas dan lugar a una nucleación rápida y a un crecimiento rápido de las nanopartículas recién formadas. Todo ello conduce a la formación de nanopartículas de pequeño tamaño muy uniformes. Existen dos vías para obtener MNPs mediante condiciones hidrotérmicas: (i) hidrólisis y oxidación, donde se utilizan sales ferrosas; y (ii) neutralización de hidróxidos metálicos mixtos (Laurent et al. 2008). En esta metodología es posible controlar la geometría y el tamaño de las MNPs modificando parámetros como el solvente, la temperatura y el tiempo utilizados (Chen and Xu 1998). Sin embargo, a pesar de la capacidad de control sobre el tamaño, esta metodología presenta numerosos inconvenientes asociados con el uso de solventes orgánicos, altas temperaturas y la generación de cantidades significativas de subproductos tóxicos (Kolhatkar et al. 2013; Laurent et al. 2008; Lu et al. 2007).

La metodología **sol-gel** se utiliza para la obtención de óxidos metálicos nanoestructurados (Dai et al. 2005; Ismail 2005). Este proceso se basa en la hidroxilación y condensación de precursores moleculares presentes en la solución, originando un “sol” de nanopartículas. Posteriormente, la condensación y la polimerización inorgánica dan lugar a una red tridimensional de óxido de hierro denominado gel. Al igual que en el caso anterior, esta metodología permite ejercer un buen control sobre el tamaño y la estructura del cristal (Reddy et al. 2012). Sin embargo, a pesar de que las reacciones anteriores se realizan a temperatura ambiente, se necesitan tratamientos térmicos posteriores para adquirir el estado cristalino final, lo que condiciona su uso y aplicación (Kojima 1997; Liu et al. 1997).

Por último, en los últimos años ha despertado el interés en la síntesis de MNPs en **ambientes confinados utilizando “nano-reactores”** en los que se restringe y controla el crecimiento de las MNPs (Abu Bakar et al. 2007; Breulmann et al. 1998; Ortega and Reguera 2019). Esta estrategia implicaría el uso de las metodologías descritas anteriormente, especialmente el método de coprecipitación, adaptadas a estas nuevas condiciones confinadas. Así, se han descrito numerosas aproximaciones de esta metodología para la obtención de MNPs de tamaño definido que implican el uso de “nano-reactores” sintéticos y biológicos como, por ejemplo, la síntesis en surfactantes anfotéricos (Santra et al. 2001), en dendrímeros (Strable et al. 2001), en ciclodextrinas (Hou et al. 2005), en cajas de apoferritina (Uchida et al. 2006), en el interior de membranas de fosfolípidos capaces de formar vesículas (magnetoliposomas) (De Cuyper and Joniau 1991; Sangregorio et al. 1999) o el uso de diferentes tipos de hidrogeles (Laurent et al. 2008; Xiong et al. 2011).

### **1.2.2. Mineralización controlada/inducida biológicamente: Biomineralización**

La magnetita también puede presentar un origen biótico en donde tiene lugar un proceso conocido como biomineralización. La biomineralización es un proceso en el que los organismos, de manera directa o indirecta, producen minerales (Bazylinski et al. 2007). Existen una gran variedad de minerales producidos mediante diferentes vías de biomineralización relacionadas con la filogenia y la actividad metabólica del organismo (o microorganismo) implicado. Además, estos minerales de origen biótico, también conocidos como biominerales, presentan características que difieren claramente de sus equivalentes sintetizados inorgánicamente, tales como la forma, el tamaño o la cristalinidad (Bazylinski et al. 2007; Bazylinski and Frankel 2003; Haferburg and Kothe 2007; Takahashi et al. 2007).

Los procesos de biomineralización se pueden dividir en dos grupos diferentes en función del grado de control que el organismo (o microorganismo) ejerce en el proceso. En 1981, Lowenstam (Lowenstam 1981) calificó a estos dos grupos como “**Mineralización Inducida Biológicamente**” (BIM del inglés *Biologically Induced Mineralization*) y “Mineralización mediada por matriz orgánica”. Posteriormente, en 1983, Mann (Mann 2001), renombró el último grupo como “**Mineralización Controlada Biológicamente**” (BCM del inglés *Biologically Controlled Mineralization*).

1.2.2.1. Mineralización inducida biológicamente (BIM)

En la BIM, la nucleación y crecimiento de los biominerales tiene lugar a través de procesos extracelulares derivados de la actividad metabólica del microorganismo y/o del aporte de núcleos de crecimiento, actuando como tales las propias estructuras celulares, pero no existe una maquinaria celular especializada para realizar este proceso. La biomineralización tiene lugar como consecuencia de cambios en el equilibrio químico del entorno circundante (mecanismos pasivos) y por los cambios cinéticos inducidos por el aporte de superficies (mecanismo activos) (Fortin and Beveridge 2000; Heim 2011; Southam 2014). Ejemplos de mecanismos pasivos son la conversión rédox de iones metálicos específicos que se encuentran unidos a la superficie bacteria o la excreción de iones producidos metabólicamente, lo que da lugar a una sobresaturación del sistema con respecto a la fase mineral concreta. Los mecanismos activos tienen lugar cuando el microorganismo ofrece sus propios componentes celulares tales como paredes, membranas y/o restos celulares, en los que tiene lugar una unión inespecífica de cationes, los cuales, junto con la participación de aniones circundantes, dan lugar a la nucleación y posterior crecimiento del mineral. Este mecanismo activo puede incluso estar mediado por células muertas como consecuencia de la exposición de superficies cargadas negativamente que actúan como sitios de nucleación para cationes metálicos. Entre los elementos celulares implicados que participan en la BIM, destacan las sustancias poliméricas extracelulares (EPS del inglés *Extracellular Polymeric Substances*) (Chan et al. 2009).

En el caso de la magnetita, ésta puede formarse mediante BIM a través de la actividad de los microorganismos desasimiladores reductores del hierro. Los microorganismos más estudiados capaces de producir magnetita mediante BIM son las bacterias reductoras de hierro de los géneros *Geobacter* y *Shewanella*. En ambientes anóxicos, estos microorganismos respiran utilizando  $Fe^{3+}$  (en forma de oxihidróxido férrico amorfo o a partir de la disolución de óxidos de hierro cristalinos) como aceptor final de la cadena de transporte de electrones, el cual es reducido a  $Fe^{2+}$  y liberado al exterior. Posteriormente, este  $Fe^{2+}$  junto con los iones  $Fe^{3+}$  presentes en el medio, se concentran en las superficies celulares, dando lugar a la sobresaturación del medio con respecto a la magnetita y, por tanto, provocando la precipitación de este mineral (Bazylynski et al. 2007; Frankel and Bazylynski 2003; Ghazlan et al. 2018; Lovley 1991).



Los biominerales resultantes del BIM, incluida la magnetita, presentan una composición y propiedades que dependen de las condiciones ambientales (tales como pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $E_h$  o temperatura) y son muy parecidos a los minerales formados inorgánicamente bajo las mismas condiciones químicas, aunque presentan ciertas características diferenciales, como pueden ser la acumulación de materia orgánica en el interior del cristal (Perez-Gonzalez et al. 2010). Por lo general, dichos biominerales exponen una baja cristalinidad, amplia distribución de tamaño, composición química heterogénea, falta de morfologías cristalinas específicas y, en la mayoría de los casos, están estrechamente relacionados con la pared celular (Bazylinski et al. 2007; Frankel and Bazylinski 2003; Heim 2011).

#### 1.2.2.2. Mineralización controlada biológicamente (BCM)

En la BCM, a diferencia de la BIM, el proceso de mineralización está controlado genéticamente y el organismo controla activamente el sitio de nucleación, el crecimiento, la morfología y la ubicación final del biomineral. En consecuencia, los biominerales producidos por BCM se caracterizan por ser cristales bien ordenados, con distribuciones de tamaño estrechas y morfologías específicas y consistentes (Bazylinski and Frankel 2003). Por lo general, los biominerales sintetizados a través de esta vía son productos sofisticados y específicos que otorgan al organismo que los sintetiza funciones biológicas especializadas (Weiner and Dove 2003).

Los mecanismos de control cristalino-químicos en este tipo de biomineralización varían en función del organismo, aunque todos ellos presentan la característica común de realizar la formación del mineral en un entorno cerrado y aislado (Heim 2011). Así, se ha establecido una clasificación para dichos mecanismos: “mineralización mediada por matriz orgánica” (mineralización extracelular) y “mineralización organizada por límites” (mineralización inter e intracelular) (Mann 2001). La BCM extracelular implica la producción por parte de la célula de una matriz macromolecular en el exterior celular. Dicha matriz, cuya composición y estructura está controlada genéticamente, está compuesta generalmente por proteínas, polisacáridos o glicoproteínas, que forman un entramado tridimensional, en el cual la célula suministra activamente cationes para que tenga lugar una nucleación y crecimiento *in situ* del biomineral (Weiner and Dove 2003). En el caso de la BCM intercelular, ésta ocurre principalmente en organismos unicelulares que existen como una comunidad. Así, por ejemplo, este tipo de mineralización no es

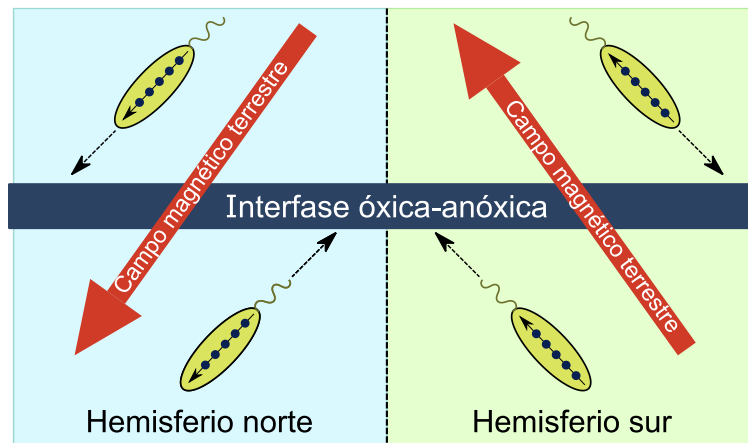
común en bacterias, pero se encuentra comúnmente en algas calcáreas, como *Halimeda* (Borowitzka 1982). Este mecanismo constituye una variación de la BCM extracelular donde la epidermis de los organismos individuales actúa de matriz para el aislamiento del sitio de mineralización (Mann 2001; Weiner and Dove 2003). Por último, la BCM intracelular se lleva a cabo en el interior de compartimentos específicos dentro de la célula como, por ejemplo, vesículas o vacuolas, aunque la mineralización también puede ocurrir en el interior de láminas semipermeables compuestas por macromoléculas insolubles como proteínas o polisacáridos. De esta manera, el organismo puede regular de manera exacta la composición química, la estructura morfológica y el tamaño de la partícula del biomineral (Bazylinski and Frankel 2003). Existen numerosos ejemplos de BCM intracelular en organismos eucariotas superiores, como es el caso de la formación de los huesos y dientes en mamíferos (Kirschvink and Hagadorn 2000). En el caso de organismos procariotas, el ejemplo más conocido y caracterizado hasta la fecha es el del grupo las bacterias magnetotácticas, las cuales llevan a cabo la cristalización de biominerales magnéticos en el interior de vesículas conocidas como magnetosomas. Este ejemplo de BCM intracelular se explicará detalladamente en el siguiente apartado.

### 1.2.3. Bacterias magnetotácticas (MTB)

Las **bacterias magnetotácticas** (MTB del inglés *Magnetotactic Bacteria*) constituyen un grupo ubicuo y heterogéneo de microorganismos procariotas caracterizados por la presencia de un orgánulo específico, el **magnetosoma**. Este orgánulo está compuesto por cristales de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) rodeados por una bicapa lipídica (Balkwill et al. 1980; Gorby et al. 1988; Komeili et al. 2004). Los cristales se encuentran alineados formando una o varias cadenas en el interior celular (Bazylinski et al. 1995). Los magnetosomas permiten que las bacterias se alineen pasivamente en las líneas del campo magnético terrestre para, posteriormente, nadar activamente hasta situarse, dentro de la columna de agua, en la zona de transición óxica-anóxica que presente la cantidad de oxígeno necesaria para su supervivencia (Figura 5). Esta capacidad se denomina **magneto-aerotaxis** (Balkwill et al. 1980; Bazylinski and Schübbe 2007; Gorby et al. 1988; Lower and Bazylinski 2013).

A pesar de no constituir un grupo taxonómico, las MTB comparten numerosas características (Bazylinski and Frankel 2004): (i) todos los miembros descritos hasta la fecha son procariotas Gram-negativos, (ii) todos son organismos móviles, generalmente,

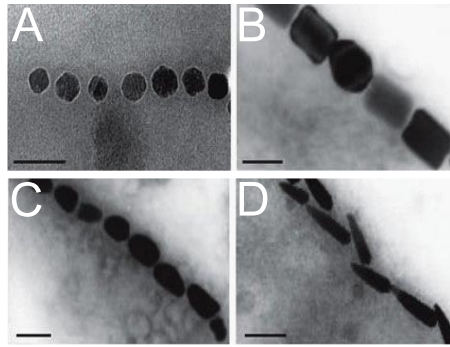
por flagelos; (iii) crecen únicamente en condiciones microaerófilas y/o anaerobias; (iv) salvo con alguna excepción, presentan un metabolismo respiratorio; (v) tienen actividad nitrogenasa; (vi) son mesófilos; y (vii) todos presentan magnetosomas.



**Figura 5.** Esquema del proceso de magneto-aerotaxis. Las bacterias magnetotácticas se alinean dentro de las líneas del campo magnético terrestre y, a continuación, nadan activamente hasta alcanzar la zona óptima de oxígeno para su crecimiento. Imagen adaptada y modificada de Bazylinski and Frankel 2004.

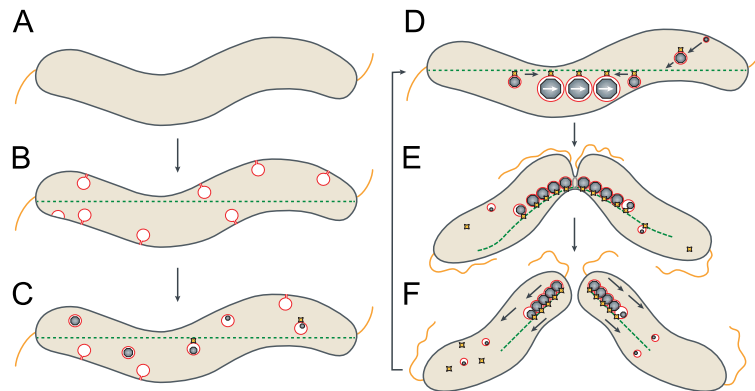
#### 1.2.3.1. Formación del magnetosoma

La formación del magnetosoma es un proceso sometido a un alto control genético. Los genes implicados se encuentran localizados en una región específica del genoma de las MTB denominada **isla del magnetosoma** (MAI del inglés *Magnetosome Island*) (Schübbe et al. 2003). En esta región se localizan los genes codificantes de las proteínas asociadas al magnetosoma (MAPs del inglés *Magnetosome Associated Proteins*) responsables del proceso de biomineralización de la magnetita (Nudelman and Zarivach 2014), así como otras proteínas implicadas en el proceso de formación del magnetosoma. Debido a ello, los cristales de magnetita presentan una morfología que varía en función de la especie o de la cepa (Figura 6) (Bazylinski et al. 1994).



**Figura 6.** Diversidad morfológica de los cristales de magnetita presentes en las MTB. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de cristales presentes en las MTB con forma cubo-octaédrica (A), prismas elongados (B, C) y forma de diente (D). Imagen adaptada y modificada de Uebe and Schüler 2016.

El estudio de la formación del magnetosoma constituye un gran área multidisciplinar de investigación que abarca campos muy diversos tales como la microbiología, la geobiología, la biofísica, la biotecnología o la nanotecnología. Desde el descubrimiento de las MTB, se han realizado numerosos estudios para comprender y examinar la fisiología, ecología y filogenia de estos organismos, así como las propiedades magnéticas y minerales de los magnetosomas (Bazylinski et al. 1994; Uebe and Schüler 2016). Para la realización de dichos estudios, se han utilizado los organismos modelo *Magnetospirillum magneticum* (AMB) y *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (MSR) debido a su relativa facilidad de cultivo en el laboratorio. Los estudios realizados sobre estas MTB han puesto de manifiesto que la formación del magnetosoma consta de 4 etapas (Figura 7) (Lohße et al. 2014; Uebe and Schüler 2016):



**Figura 7.** Esquema del proceso de formación del magnetosoma. Modelo del proceso de formación del magnetosoma de *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. El proceso

se divide en cuatro etapas: [1] Formación de las vesículas del magnetosoma (A, B); [2] Ensamblaje de las proteínas en la membrana del magnetosoma (A, B); [3] Transporte del hierro al interior del magnetosoma y biomineralización de la magnetita (C); [4] alineamiento de las cadenas del magnetosoma y división durante la segregación celular (D, E, F). Imagen adaptada y modificada de Uebe and Schüler 2016.

**Invaginación de la membrana del magnetosoma a partir de la membrana citoplasmática.** La formación de las vesículas está inducida por las proteínas MamQ, MamB y MamL, mientras que la proteína MamY está implicada en la regulación de la forma de las vesículas (Tanaka et al. 2010).

**Anclaje a la membrana citoplasmática de las proteínas del magnetosoma.** Se desconoce si este paso ocurre antes, a la vez o después de la invaginación de la membrana citoplasmática. Concretamente, la proteína MamA forma un complejo multi-proteico que rodea la membrana del magnetosoma y facilita las interacciones proteína-proteína. Por otro lado, la proteína MamE está implicada en la localización de las proteínas del magnetosoma mediante un proceso independiente de proteasa (Quinlan et al. 2011; Zeytuni et al. 2011).

**Transporte del hierro al interior de la vesícula y mineralización de los cristales de magnetita.** Esta fase del proceso de formación del magnetosoma se puede dividir a su vez en cuatro pasos:

- Transporte del hierro: una vez se ha formado la membrana del magnetosoma, se produce el proceso de biomineralización donde se acumulan grandes cantidades de hierro en el interior de las vesículas. Concretamente, las proteínas MamB y MamM se encargan del transporte del hierro ferroso, mientras que el hierro férrico bien se obtiene por la oxidación del hierro ferroso en el interior de la vesícula, o bien se transporta al interior de ésta con ayuda de las proteínas MamH y MamZ (Raschdorf et al. 2013; Uebe et al. 2011).
- Control del potencial rédox: para que tenga lugar la formación de la magnetita durante el proceso de biomineralización, es necesario un control del potencial rédox en el interior de la vesícula por parte de la bacteria. Las proteínas MamE, MamT, MamP y MamX contienen dos o tres dominios “magnetocromos”

(dominios de unión al grupo hemo) y se cree que forman un complejo para la regulación del flujo de electrones (Raschdorf et al. 2013; Siponen et al. 2012).

- **Nucleación de los cristales de magnetita:** el proceso de nucleación de los cristales de magnetita también se encuentra regulado debido a que en cada vesícula sólo tiene lugar la formación de un solo cristal. Estudios con mutantes que presentan deleciones en algunos de los genes implicados demuestran que las proteínas MamE, MamM y MamO parecen tener un papel importante en la regulación de la nucleación del cristal (Uebe and Schüler 2016).
- **Crecimiento y maduración del cristal:** los cristales de magnetita presentes en los magnetosomas maduros son muy uniformes y presentan una estrecha distribución de tamaño, lo que indica la existencia de un alto grado de control del crecimiento del cristal. En este proceso intervienen numerosas proteínas entre las que destacan: MamS, MamR, MamN, MamF (y su homóloga MmsF), Mms5 (o MamG), Mms6, Mms7 (o MamD) y MamC (o Mms13) (Uebe and Schüler 2016).

**Ensamblaje de la cadena de magnetosomas y posicionamiento de los mismos para la segregación durante la división celular.** Los magnetosomas se ensamblan en cadenas mediante la interacción de la proteína MamJ con los filamentos MamK (similares a actina), los cuales también regulan el posicionamiento de la cadena. Durante el proceso de división celular, las cadenas del magnetosoma se posicionan en la mitad celular para asegurar una segregación igualitaria en ambas células hijas. Se cree que la proteína implicada en este proceso es la proteína MamK (Uebe and Schüler 2016).

#### 1.2.3.2. *Características de los cristales del magnetosoma*

Como resultado del proceso de formación del magnetosoma y la consiguiente biomineralización, se obtienen cristales con unas características magnéticas, químicas y físicas únicas que los convierten en la **nanopartícula magnética ideal** (Valverde-Tercedor et al. 2015). Entre estas características destacan (Bazylinski et al. 1994; Thomas-Keprta et al. 2000):

**Tamaño.** Los magnetosomas maduros contienen cristales de magnetita o greigita que se producen en un rango de tamaños estrecho comprendido entre 35-120 nm (Bazylinski et al. 1995; Thomas-Keprta et al. 2000). De esta manera, tal y como se ha indicado anteriormente, estos cristales son dominios únicos magnéticos estables. Este hecho tiene un significado físico para la célula ya que, tal y como se ha comentado

anteriormente, partículas más pequeñas serían superparamagnéticas a temperatura ambiente y no tendrían una magnetización remanente estable y, en el caso de cristales de un tamaño superior, éstos serían nanopartículas de dominio múltiple, lo que reduciría la magnetización permanente (Bazylinski and Frankel 2003). Por lo tanto, los cristales de magnetita superparamagnéticos o multidominio no tienen valor para la magneto-aerotaxis (Kirschvink and Lowenstam 1979). Al presentar cristales de dominios magnéticos únicos, la célula consigue maximizar la remanencia magnética de sus cristales del magnetosoma. Por otro lado, a diferencia de los cristales obtenidos inorgánicamente o mediante BIM, la distribución de tamaño de los cristales de magnetita (CSD del inglés *Crystal Size Distribution*) de una sola especie de MTB exhibe una distribución de tamaño estrecha asimétrica que presenta una desviación negativa hacia los tamaños más grandes (Arató et al. 2005; Devouard et al. 1998).

**Morfología.** La morfología de los cristales de magnetita de los magnetosomas suele ser una característica específica de la cepa bacteriana. Por lo general, se han encontrado tres tipos de morfologías principales: (i) cubo-octaédricas (Balkwill et al. 1980), (ii) pseudo-prismáticas alongadas (Mann et al. 1984) y (iii) con forma de punta de flecha, bala o diente (Mann et al. 1987a, 1987b). A diferencia de los cristales de magnetita sintetizados inorgánicamente, donde tiene lugar un crecimiento centro-simétrico que conduce a morfologías isotrópicas (por ejemplo, cubo-octaédricas), la mayoría de los cristales de magnetita sintetizados por las MTB son partículas anisotrópicas inusuales, donde el crecimiento cristalino no es centro-simétrico, es decir, es diferente en las tres direcciones espaciales. Estas estructuras se obtienen como resultado del crecimiento desigual de algunas caras de simetría relacionadas (Jimenez-Lopez et al. 2010). En relación a los mecanismos causantes de esta asimetría, se cree que podría producirse bien a partir de un flujo anisotrópico de iones a través de la membrana del magnetosoma que rodea al cristal (Mann and Frankel 1989), o bien, a través de interacciones específicas del cristal de magnetita con las MAPs presentes en la membrana del magnetosoma (Amemiya et al. 2007; Arakaki et al. 2010; Galloway et al. 2011; Prozorov et al. 2007a, 2007b; Valverde-Tercedor et al. 2015). Por otro lado, como consecuencia de esta anisotropía, es característico (aunque no exclusivo) que los cristales de los magnetosomas crezcan y se alarguen en la dirección cristalográfica [111] (Jimenez-Lopez et al. 2010; Thomas-Keprta et al. 2002, 2000). Todo ello, permite que las partículas de los magnetosomas alcancen

volúmenes más grandes y, por tanto, momentos dipolares magnéticos más grandes manteniendo siempre el estado de dominio único magnético (Thomas-Keprta et al. 2000).

**Pureza química.** La magnetita producida por las MTB es  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estequiométrica y químicamente pura, carente de otros contaminantes metálicos, salvo contadas excepciones (Mann and Frankel 1989; Thomas-Keprta et al. 2000). Las MTB excluyen estos elementos metálicos (tales como Ti, Cr, Mn o Al) de los cristales de magnetita en crecimiento, a pesar de que dichos elementos se encuentren disponibles en el medio (Gorby et al. 1988). Esta alta especificidad química está condicionada por las múltiples vías que las MTB presentan para la adquisición y transporte de Fe, que implican múltiples pasos de quelación y reacciones redox asociadas a un transporte acoplado a ATP a través de la bicapa lipídica (Braun et al. 1998).

**Estructura cristalina perfecta.** Los cristales de magnetita producidos por las MTB presentan una gran perfección estructural, sin defectos internos (Mann et al. 1988). La falta de defectos en la red cristalina incrementa el momento magnético neto de la partícula, lo que es imprescindible para una correcta magneto-aerotaxis (Jimenez-Lopez et al. 2010). Además, esta perfección innata permite diferenciarlos claramente de aquellos cristales producidos mediante BIM, los cuales incorporan materia orgánica en su interior, lo que provoca una alteración en su estructura cristalina (Perez-Gonzalez et al. 2010).

**Alineación de la cadena.** Tal y como se ha comentado anteriormente, los magnetosomas de las MTB se encuentran alineados en una o varias cadenas en el interior celular, lo que produce la orientación espontánea de los cristales a lo largo de la cadena (Bazylnski and Frankel 2004). Esta disposición permite que el momento magnético total de la célula corresponda con la suma vectorial de cada uno de los momentos magnéticos de los cristales individuales dispuestos linealmente. Así, se consigue maximizar el momento magnético total de la célula (Thomas-Keprta et al. 2000).

### **1.3. Biomimética**

Las características descritas en el apartado anterior, especialmente aquellas relacionadas con el tamaño y la morfología, determinan las propiedades magnéticas únicas de los cristales de magnetosoma, lo que permite que sean fácilmente guiados mediante la aplicación de un campo magnético externo (Arakaki et al. 2014; Prozorov et



al. 2013). Todo ello, junto con otras características químicas y biológicas destacables como su biocompatibilidad (Alphandéry 2014; Sun et al. 2010), ha despertado el interés de la aplicación potencial de los magnetosomas en nanotecnología. Así, algunos ejemplos de estas aplicaciones son su uso como agentes de contraste en resonancia magnética (Goldhawk et al. 2012; Mathuriya 2015), agentes de hipertermia (Alphandéry 2014), sistemas de liberación de fármacos (Mathuriya 2015; Sun et al. 2011), biosensores (Arakaki et al. 2008; Matsunaga et al. 2003; Tanaka et al. 2004), separadores moleculares (Matsunaga et al. 2007) o para la extracción de ADN (Arakaki et al. 2008; Ota et al. 2006). Además, la biomineralización de la magnetita en el interior de las MTB es un proceso que se lleva a cabo en condiciones de temperatura ambiente y a 1 atm de presión, lo cual supone una ventaja clara frente a la síntesis química de nanocristales de magnetita en la que, en algunos casos, se utilizan solventes orgánicos y condiciones extremas para controlar el tamaño y la morfología del cristal (Amemiya et al. 2007; Valverde-Tercedor et al. 2015), lo que encarece la producción de dichos cristales, así como complica los procesos ulteriores de purificación para poder utilizar las nanopartículas en aplicaciones clínicas.

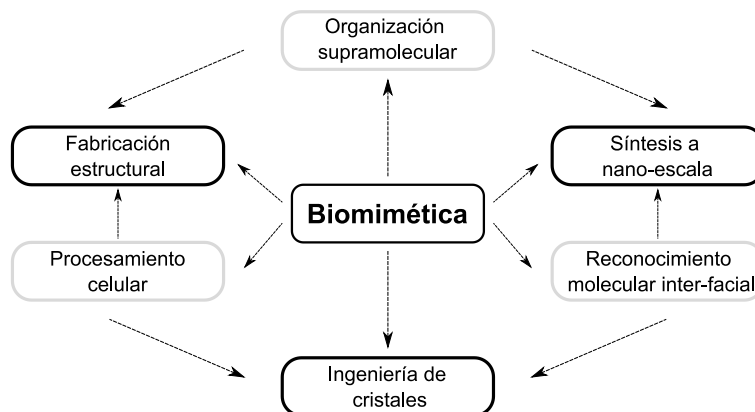
Sin embargo, a pesar de constituir la nanopartícula magnética ideal y de las ventajas que su síntesis conlleva, a día de hoy el uso de magnetosomas a nivel industrial supone un desafío debido a la imposibilidad de escalar la producción de estos cristales a niveles industriales. Este “cuello de botella” está condicionado por las estrictas necesidades fisiológicas de las MTB, lo que da lugar a un crecimiento lento y dificultoso, así como la falta de conocimiento real de cómo tiene lugar el proceso de síntesis del magnetosoma. De hecho, todavía se están dilucidando cuáles son los genes esenciales implicados en el proceso. Por ello, con el objetivo de solventar este problema y superar este cuello de botella, se están explorando y desarrollando tres aproximaciones diferentes.

La primera aproximación implica la **expresión de los genes involucrados en la biomineralización en bacterias fácilmente cultivables**. Esta vía ha sido explorada por Kolinko et al. 2014, los cuales insertaron genes específicos de la MTB *M. gryphiswaldense* en *Rhodospirillum rubrum*, obteniendo una cepa recombinante capaz de producir cristales de magnetita en su interior denominados magnetosomas "heterólogos". A pesar de ello, poco se conoce de la posibilidad de escalado industrial de esta bacteria recombinante.

La segunda aproximación implica el uso de **magnetosomas no producidos por MTB**. Se ha demostrado que bacterias oxidantes de hierro como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferriphilum* son capaces de sintetizar magnetosomas. La gran ventaja de estas bacterias es que son mucho más fáciles de cultivar que las MTB y, por tanto, la producción de magnetosomas utilizando estas bacterias sería más fácilmente escalable (Gao et al. 2006; Yan et al. 2016, 2013). Por el contrario, estos magnetosomas no son tan funcionales como los de las MTB, presentando unas propiedades magnéticas menos eficientes, así como están compuestos por mezclas de óxidos de hierro, lo que condiciona su potencial uso debido a la necesidad de un proceso de purificación que no sólo incluye la separación partícula-célula, sino también la extracción de magnetita de la mezcla de sólidos con el objetivo de obtener partículas con unas propiedades magnéticas mejoradas (Gao et al. 2006; Yan et al. 2013).

La tercera aproximación, la cual es de especial relevancia en la presente Tesis Doctoral, es la **biomimética**, un concepto basado en aprender de la naturaleza para desarrollar nuevas estrategias de producción de materiales funcionalizados avanzados (Mann 2001). Este concepto fue introducido por Mann 1993, el cual postuló que las tres etapas básicas que tienen lugar en un proceso de biomineralización podrían proporcionar arquetipos útiles para el desarrollo nuevos materiales abióticos denominados biomiméticos. Estos tres pilares básicos del proceso de biomineralización son los siguientes: (i) **organización supramolecular**, es la etapa inicial del proceso donde tiene lugar la construcción de un entorno de reacción adecuado antes de la biomineralización; (ii) **reconocimiento molecular inter-facial**, una segunda etapa que implica la nucleación controlada de grupos inorgánicos a partir de una solución acuosa, la cual se lleva a cabo a partir de la construcción molecular de sistemas supramoleculares orgánicos que actúan de molde para dicha nucleación inorgánica; y (iii) **procesamiento celular**, el cual constituye el último paso de la biomineralización, donde tiene lugar una participación celular más activa, que conduce a la producción de biominerales con texturas y formas inusuales (por ejemplo, anisotrópicas), constituyendo este último nivel el nivel más complejo. Así, basándonos en dichas etapas se conseguiría abordar de una manera más eficiente los tres elementos clave de la síntesis química de nanopartículas: síntesis a escala nanométrica, la ingeniería de cristales (para el control de la nucleación y crecimiento del cristal) y la fabricación estructural de cristales (para el control de la morfología y estructura del cristal). De esta manera, en una aproximación biomimética, la síntesis a

nano-escala se debería abordar utilizando como inspiración las etapas de biomineralización de organización previa supramolecular y reconocimiento inter-facial, la ingeniería de cristales integraría las etapas de reconocimiento y procesamiento celular y, por último, la fabricación estructural combinaría las etapas de organización previa y el procesamiento celular (Figura 8) (Mann 1993).



**Figura 8.** Biomimética. Relaciones intrínsecas entre los procesos de biomineralización y la química sintética biomimética de materiales. Imagen adaptada y modificada de Mann 1993.

Por lo tanto, la química sintética biomimética utiliza una comprensión moderna de los procesos de biomineralización para diseñar y fabricar nuevos materiales con funcionalidades y propiedades específicas. Para ello, se lleva a cabo el uso de arquitecturas de proteínas y/o polímeros para controlar la composición, la orientación y la morfología de los materiales resultantes. Todo ello, ha generado un enorme interés en los enfoques biomiméticos para el desarrollo de materiales sintéticos versátiles por diseño.

En el caso de la estrategia biomimética para la obtención de magnetosomas, dicha estrategia implica la síntesis química de cristales parecidos a los magnetosomas, cuya producción podría ser potencialmente escalable a niveles industriales, mediante el uso de MAPs expresadas de manera heteróloga o como péptidos sintéticos en experimentos de precipitación de magnetita *in vitro* (Amemiya et al. 2007; Arakaki et al. 2010, 2003; Bird et al. 2016b; Galloway et al. 2011; Kashyap et al. 2014b; Liu et al. 2015; Lopez-Moreno et al. 2017; Nudelman et al. 2016, 2018a, 2018b; Prozorov et al. 2007a, 2007b; Rawlings et al. 2014; Valverde-Tercedor et al. 2015). Para ello, esta aproximación se fundamenta

en el hecho de que, durante la biomineralización, las MAPs situadas en la membrana del magnetosoma interactúan de manera específica con el biomineral, desempeñando un papel importante en el proceso de biomineralización (Bazylinski and Frankel 2004; Mann 2001). De hecho, tal y como se ha comentado anteriormente, estas interacciones definen las características de cristal. Del conjunto de todas las MAPs implicadas en el proceso de biomineralización de magnetosoma, han despertado interés para esta aproximación aquellas proteínas implicadas en el control del tamaño y/o la morfología del cristal (véase apartado 1.2.3.1.), dado que otras funciones necesarias para el proceso de síntesis como son el control del potencial redox o pH, pueden suplirse químicamente mediante la adición de diferentes compuestos a la reacción de mineralización. De todas ellas, a día de hoy, se han conseguido expresar de manera heteróloga y evaluar su efecto *in vivo* e *in vitro* las siguientes MAPs:

**Mms6:** fue una de las primeras proteínas del magnetosoma estudiadas (Arakaki et al. 2003). Mms6 es la proteína integral de membrana más abundante del magnetosoma y se encuentra fuertemente unida al cristal (Arakaki et al. 2003; Raschdorf et al. 2018). En cuanto a su estructura, presenta un dominio N-terminal hidrofóbico (el cual puede tener un papel importante en el auto-ensamblaje de estas proteínas *in vitro*), y una región C-terminal hidrofílica con aminoácidos ácidos y grupos hidroxilo con capacidad de unir hierro. La posible estructura secundaria de Mms6 muestra un dominio N-terminal desestructurado seguido de una hélice transmembrana y el extremo C-terminal, el cual puede formar una estructura en  $\alpha$ -hélice (Arakaki et al. 2003; Nudelman and Zarivach 2014). En relación a estudios *in vivo*, estudios de mutagénesis en los que se realizaba una delección del gen *mms6* en *M. magneticum* AMB-1, mostraron que Mms6 es una de las proteínas con mayor importancia en el control del tamaño y forma del cristal de magnetita (Arakaki et al. 2014; Tanaka et al. 2011). Respecto a su papel en la aproximación biomimética, estudios de mineralización *in vitro* en presencia de Mms6 recombinante procedente de *M. magneticum* AMB-1, muestran la formación de cristales con una morfología cúbica o cubo-octaédrica y una estrecha distribución de tamaños (20-30 nm) (Amemiya et al. 2007; Prozorov et al. 2007a). Por otro lado, en relación al uso de péptidos sintéticos, en el estudio desarrollado por Arakaki et al. 2010, se realizó la síntesis de diferentes péptidos sintéticos que mimetizaban el extremo C-terminal de la proteína, de los cuales algunos originaron nanopartículas con la misma distribución de tamaños que aquellas obtenidas con la proteína completa, poniendo de manifiesto el papel de la región

C-terminal de la proteína en el control del tamaño y la morfología de los cristales. Además, en relación a su mecanismo de acción, se ha observado que Mms6, durante los experimentos *in vitro*, se auto-ensambla en una estructura micelar con capacidad de unir hierro en su superficie, facilitando de esta manera la nucleación de magnetita a partir de la formación de una fase precursora amorfa (Kashyap et al. 2014b). Por otro lado, también se ha evaluado el papel de Mms6 unida a superficies en experimentos *in vitro* de biomineralización. Este enfoque ha proporcionado resultados prometedores tanto para la síntesis y fabricación de cristales, así como para comprender mejor el papel *in vivo* de la proteína (Bird et al. 2016a, 2016b; Galloway et al. 2012; Liu et al. 2015). En resumen, los cristales obtenidos *in vitro* en presencia de la proteína Mms6 presentan morfologías similares a las observadas en los magnetosomas de *M. magneticum* AMB-1. Sin embargo, el tamaño es significativamente menor al de los magnetosomas. Además, estas partículas no presentan una temperatura de Verwey (es decir, aquella temperatura por debajo de la cual la magnetita sufre una transición de fase asociada con una modificación de la carga superficial y un cambio brusco de susceptibilidad y magnetización remanente (Chang et al. 2016)), que es muy distintiva y característica de los magnetosomas y está estrechamente relacionada con una estructura cristalina bien definida.

**MamC:** MamC es la segunda proteína integral de membrana más abundante del magnetosoma después de Mms6 (Raschdorf et al. 2018). MamC presenta una estructura constituida por dos dominios transmembrana helicoidales unidos por un bucle con estructura en  $\alpha$ -hélice. La región N-terminal es hidrofóbica mientras que el extremo C-terminal y el bucle son hidrofílicos (Nudelman and Zarivach 2014). Estudios *in vivo* de mutagénesis en los que se realizaron deleciones del gen codificante para la proteína homóloga de MamC, Mms13, en *M. magneticum* AMB-1, dieron lugar a la formación de cristales con morfologías similares a las del tipo silvestre pero de tamaño muy pequeño, indicando esto su papel en el crecimiento y tamaño del cristal (Arakaki et al. 2014). Respecto a su papel en la aproximación biomimética, destacan los experimentos de mineralización *in vitro* en presencia de la proteína MamC recombinante de *Magnetococcus marinus* MC-1, llevados a cabo por Valverde-Tercedor et al. 2015 y Lopez-Moreno et al. 2017. En los citados estudios, se obtuvieron cristales de magnetita con un rango de tamaños entre 20-80 nm, dentro del cual la mayoría de los cristales presentaba un tamaño comprendido entre 30-40 nm, en comparación con los experimentos control (libres de proteína) donde se obtuvieron cristales con un tamaño

comprendido entre 10-20 nm. Además, dichos cristales mostraban unas caras bien desarrolladas y definidas con morfologías rectangulares, rómbicas y cuadradas bidimensionales. En relación a las propiedades magnéticas de estas partículas biomiméticas, éstas presentaban una temperatura de Verwey de 100 K, similar a la descrita para los magnetosomas (y que rara vez se encuentra en partículas sintéticas), así como mostraron un mayor momento magnético por partícula en comparación con las partículas obtenidas en el experimento control (Valverde-Tercedor et al. 2015). Dadas las destacables características de estas nanopartículas magnéticas biomiméticas de magnetita mediadas por la proteína MamC (de ahora en adelante referidas como BMNPs, del inglés *Biomimetic Magnetic Nanoparticles*), en especial sus propiedades magnéticas, dichas partículas serán objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. Concretamente, se evaluará la potencial aplicación de las BMNPs como nanotransportadores de fármacos y agentes de hipertermia en el tratamiento local de enfermedades localizadas.

En relación a cómo la proteína MamC podría ejercer su efecto *in vitro*, se ha puesto de manifiesto que tanto el extremo C-terminal como el bucle presente entre los dos dominios transmembrana parecen estar involucrados en la precipitación de magnetita, debido a la presencia de una alta concentración de aminoácidos ácidos en estas áreas específicas, siendo, por tanto, capaces de unir hierro y aumentar localmente la sobresaturación del sistema con respecto a la magnetita (Valverde-Tercedor et al. 2015). Esta teoría se vio reforzada con el estudio realizado por Kashyap et al. 2014a, donde, mediante el uso de la técnica de STEM-HAADF, se observó que MamC forma micelas en solución con una superficie cargada negativamente. De esta manera, el hierro se uniría preferentemente a la superficie de estas micelas y la nucleación del cristal tendría lugar en dicha superficie (Kashyap et al. 2014a). Por otro lado, el estudio realizado por Nudelman et al. 2016, puso de manifiesto la posible existencia de un efecto molde (efecto *template*), en el cual es necesario que el bucle presente una determinada estructura para que sea funcional. Estos autores sugieren que tanto la estructura helicoidal del bucle como la presencia de dos aminoácidos específicos, Asp70 y Glu66, juegan un papel importante en las interacciones proteína-mineral. Así, MamC interaccionaría con la partícula de magnetita actuando como un molde en su crecimiento mediante una interacción directa y específica entre la superficie de la magnetita y dichos residuos. En concreto, se ha postulado que la distancia entre dos átomos de hierro en la superficie del cristal es de 6 Å, mientras que la distancia existente entre estos dos aminoácidos es de 8 Å, pudiendo

así interactuar con el hierro. Esta interacción permitiría el control de la morfología y el tamaño de los cristales de magnetita (Nudelman et al. 2016; Subagyo and Sueoka 2007). Sin embargo, a pesar de todos estos avances y teorías, todavía no se ha descifrado el mecanismo específico de interacción entre MamC y el cristal y por el cual MamC ejerce su efecto.

**MmsF (o su homóloga MamF).** Estas proteínas presentan una estructura constituida por tres hélices transmembrana conectadas por dos bucles. El extremo C-terminal y el primer bucle son dos regiones ricas en aminoácidos ácidos y, por tanto, con capacidad de unir hierro (Murat et al. 2012; Nudelman and Zarivach 2014). Estudios *in vivo* de mutagénesis han demostrado que estas proteínas parecen controlar tanto el tamaño como la forma de los cristales de magnetita. Así, los mutantes que carecen de *mmsF/mamF* dieron lugar a un menor número de magnetosomas, los cuales presentaban un tamaño menor en comparación con los magnetosomas de tipo silvestre (Lohße et al. 2014; Murat et al. 2012). Respecto a su papel en la aproximación biomimética, los experimentos de mineralización *in vitro* de magnetita en presencia de MmsF, dieron lugar a cristales de magnetita más grandes y con una morfología más definida en comparación con los cristales obtenidos en el experimento control (sin proteínas). Sin embargo, en el caso de MamF, se obtuvieron mezclas de óxidos de hierro con diferentes morfologías y una amplia distribución de tamaño (Rawlings et al. 2014).

En conclusión, a pesar de que las nanopartículas de magnetita obtenidas mediante esta aproximación difieren de aquéllas encontradas en los magnetosomas, la aplicación del enfoque biomimético en la síntesis química de magnetosomas ha supuesto un gran avance en el diseño y producción de nanopartículas de magnetita, posibilitando su aplicación en nanotecnología.

#### **1.4. Limitación del escalado de la producción de nanopartículas de magnetita**

El uso de nanopartículas de magnetita en nanotecnología está condicionado por sus propiedades magnéticas, las cuales, tal y como se ha explicado en apartados anteriores, están íntimamente relacionadas con el tamaño y morfología del cristal. Además, otro factor importante que compromete su aplicación es la presencia de grupos

funcionales en su superficie que faciliten la adsorción de moléculas. A día de hoy, no existe un protocolo de síntesis química escalable industrialmente que permita la obtención de nanopartículas de magnetita con las características descritas anteriormente. Por otro lado, de los protocolos de síntesis existentes que permiten ejercer un control más exhaustivo sobre el tamaño y la morfología del cristal (véase *apartado 1.2.1.*), así como modificar la composición superficial, ninguno de ellos constituye un protocolo cuyo escalado sea asequible económicamente y/o no tenga impacto medioambiental. Así, tal y como se ha mencionado anteriormente, estos protocolos implican el uso de solventes orgánicos y condiciones extremas de temperatura y presión, lo que da lugar a la generación de diferentes subproductos tóxicos (Kolhatkar et al. 2013; Laurent et al. 2008; Lu et al. 2007; Reddy et al. 2012). Por otro lado, en relación a las metodologías de síntesis no contaminantes, destaca el método de síntesis de coprecipitación en agua como potencial candidato para síntesis a gran escala de nanopartículas de magnetita, debido a que constituye una metodología rentable, eficiente, escalable y ecológica. Sin embargo, el control ejercido sobre el tamaño de las MNPs y, por tanto, sobre sus propiedades magnéticas es limitado. Las MNPs resultantes de los métodos de coprecipitación a temperatura ambiente son altamente poli-dispersas con un tamaño promedio del cristal que varía entre 5-20 nm. Además, carecen de superficies funcionalizables y/o biocompatibles y, muchas de ellas, son demasiado pequeñas para mostrar un gran momento magnético por partícula (El-Boubbou 2018; Kolhatkar et al. 2013; Laurent et al. 2008; Lu et al. 2007; Prozorov et al. 2013).

En consecuencia, existe una necesidad real de diseño de nuevas metodologías de coprecipitación en agua que permitan ejercer un control sobre el tamaño de las nanopartículas y sus propiedades magnéticas, así como proporcionen superficies modificadas que faciliten su funcionalización, y cuyas condiciones no presenten un impacto significativo en el medio ambiente. En este contexto, una alternativa prometedora es el enfoque biomimético para la síntesis química en agua de nanopartículas de magnetita a temperatura ambiente mediante el uso de MAPs, descrita en el *apartado 1.3.* Sin embargo, a pesar de las claras ventajas que esta aproximación conlleva, todavía no se ha optimizado escalado industrial para la producción en masa de BMNPs. Uno de los “cuellos de botella” de dicho proceso de escalado recae en la necesidad de obtener MamC como proteína recombinante cada vez que se necesita la síntesis de un nuevo lote de BMNPs. Así, una alternativa sería la posibilidad de producir en masa la proteína y



poder almacenarla de una manera eficiente y segura hasta su uso. En este aspecto, las proteínas, como cualquier otro reactivo biológico, son sensibles a una manipulación brusca, por lo que los métodos de conservación varían y dependen notablemente de las propiedades de las proteínas y las condiciones de almacenamiento. Por lo tanto, la definición de un método para el almacenamiento de cantidades masivas de MamC que permita su conservación, a la vez que mantiene sus propiedades funcionales, constituye el primer paso hacia el escalado de la producción de BMNPs mediante la metodología de la química sintética biomimética. En el **Capítulo I, se abordará el estudio y análisis de la idoneidad de diferentes metodologías para la conservación de la proteína MamC como primer paso hacia el escalado de la síntesis de BMNPs.**

Alternativamente, se ha puesto de manifiesto que la aplicación de enfoques biomiméticos que implican el uso de poli-aminoácidos como aditivos, en lugar de proteínas, también presentan un efecto en el control del tamaño, la morfología, la agregación y las propiedades magnéticas de las nanopartículas de magnetita (Baumgartner et al. 2014; Lenders et al. 2017, 2015). De hecho, se ha demostrado que cambios en la proporción de aminoácidos de las cadenas principales de poli-aminoácidos resultan en un ajuste en el tamaño y las propiedades magnéticas de las nanopartículas de magnetita resultantes (Lenders et al. 2015). Sin embargo, pese a las ventajas que ofrece esta estrategia, el empleo de poli-aminoácidos supone un coste demasiado elevado, lo que condiciona o limita su posible escalado industrial. Partiendo de esta premisa, es necesaria la búsqueda de nuevos aditivos más económicos capaces de ejercer efecto sobre las propiedades de las nanopartículas de magnetita resultantes como una alternativa real que posibilite su escalado industrial. Concretamente, en el **Capítulo I se evaluará el efecto del uso de aminoácidos simples (Lisina y Arginina) como aditivos biológicos para la producción de MNPs en condiciones biomiméticas (a temperatura ambiente y 1 atm de presión).**

## **1.5. Estabilización de las nanopartículas magnéticas**

La estabilización de las nanopartículas de magnetita constituye otro elemento crucial para la aplicabilidad de dichas nanopartículas, dada la necesidad de obtener ferrofluidos coloidales magnéticos estables contra la agregación. Dicha estabilización se puede lograr mediante el uso y/o la combinación de dos fuerzas repulsivas: la repulsión

electrostática y la repulsión estérica (Schwertmann and Cornell 1991). Para ello, es necesario el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas. Este recubrimiento, además de mejorar la estabilidad coloidal y física de las nanopartículas, permite aumentar su dispersión en agua, así como proporcionar grupos funcionales que permitan la conjugación con moléculas bio-activas o ligandos dirigidos, para obtener nanopartículas multifuncionales (De Cuyper et al. 2007; Gupta and Curtis 2004; Ma et al. 2006). Dentro de las diferentes estrategias utilizadas para el recubrimiento y estabilización de las nanopartículas de magnetita destacan:

**El recubrimiento de superficies mediante el uso de materiales estabilizadores.**

Esta estrategia incluye el uso de moléculas estabilizadoras como compuestos tensoactivos o polímeros con el objetivo de estabilizar las superficies recién formadas, así como proporcionar grupos funcionales en la superficie. Para ello, se pueden aplicar dos metodologías: un recubrimiento *in situ* durante la síntesis o un recubrimiento post-síntesis (Laurent et al. 2008). En el primer caso, estas moléculas estabilizadoras se añaden como aditivos durante la síntesis de las nanopartículas de magnetita para estabilizar las superficies recién formadas. En este caso, el uso de estos aditivos durante la reacción de precipitación condiciona tanto el tamaño como la morfología del cristal (Laurent et al. 2008). En cambio, el recubrimiento post-síntesis consiste en recubrir o encapsular las nanopartículas una vez formadas. Destaca el uso de estabilizadores no poliméricos basados en monómeros orgánicos que contienen grupos funcionales como carboxilato, fosfato o sulfato (por ejemplo, ácido oleico o ácido cítrico) (Kim et al. 2005; Sahoo et al. 2005), así como el uso de estabilizadores poliméricos como el dextrano (Carmen Bautista et al. 2005), polivinilalcohol (Liu et al. 2008), alginato (Morales et al. 2008), quitosano (Zhi et al. 2006) o ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (Ngaboni Okassa et al. 2005).

**Encapsulación en liposomas.** Los liposomas (vesículas compuestas por una bicapa de fosfolípidos) presentan la capacidad de encapsular altas concentraciones de coloides magnéticos. La gran ventaja de estos sistemas magnéticos liposomales (también conocidos como magnetoliposomas) es que, a diferencia de la estrategia anterior, el recubrimiento de la superficie se logra utilizando metodologías de síntesis de liposomas sin ninguna modificación química de las nanopartículas de magnetita encapsuladas (Arias et al. 2011a). El recubrimiento de las nanopartículas con este material biológico incrementa su estabilidad coloidal, facilita la funcionalización de los magnetoliposomas con numerosas sustancias bioactivas, así como incrementa la biocompatibilidad y la

biodegradabilidad de las nanopartículas (Cho et al. 2008; Durán et al. 2008). Dadas las ventajas que el recubrimiento de las nanopartículas de magnetita con liposomas presenta, en el **Capítulo III se realizará la optimización del recubrimiento de MNPs y BMNPs con liposomas y se evaluará el impacto de dicho recubrimiento en sus propiedades físicas y magnéticas.**

## **2. Nanopartículas de magnetita: una plataforma tecnológica muy versátil**

### **2.1. Aplicaciones tecnológicas y biotecnológicas**

Las propiedades magnéticas, físicas, químicas y biológicas de las nanopartículas de magnetita, en especial de aquellas obtenidas mediante la química sintética biomimética, convierten a estas nanopartículas en una plataforma tecnológica muy versátil con un gran abanico de oportunidades y aplicaciones en el campo de la biotecnología y nanotecnología. A continuación, se describirán las aplicaciones más relevantes de las nanopartículas de magnetita.

**Nanopartículas de magnetita en aplicaciones tecnológicas.** Dadas sus propiedades magnéticas, las nanopartículas de magnetita se pueden utilizar para el almacenamiento magnético de información, desarrollo de tintas magnéticas, la refrigeración magnética o la producción de ferrofluidos, formados por nanopartículas magnéticas en líquidos viscosos (Berger et al. 1999; Charles and Popplewell 1982; Huber 2005; Prozorov et al. 2013; Shen and Kirschner 2002; Sun et al. 2000). Los ferrofluidos son materiales química y termodinámicamente estables que, ante la presencia de un campo magnético, responden de manera homogénea y unitaria, es decir, es el fluido en su totalidad el que responde y se alinea con el campo. Todo ello ha permitido su uso en la fabricación de materiales que están sujetos a movimiento y vibraciones (por ejemplo, amortiguadores de discos duros y centrífugas, o su uso en la fabricación de materiales en la industria aeroespacial) (Berger et al. 1999; Odenbach 2009; Prozorov et al. 2013).

**Nanopartículas de magnetita para bio-análisis.** Las nanopartículas de magnetita se pueden utilizar para el desarrollo de diferentes técnicas de bio-análisis:

- Bio-separación *in vitro*: la separación magnética constituye un método alternativo muy atractivo para la captura selectiva y específica de diferentes moléculas (proteínas, péptidos, ADN, células o virus) en comparación con los métodos tradicionales (por ejemplo, electroforesis, ultrafiltración o precipitación y cromatografía de afinidad). Además, la separación magnética se puede combinar con técnicas analíticas posteriores para la detección y cuantificación (cromatografía líquida, infrarrojos, etc.). El principio básico de esta metodología es muy simple. Las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos funcionales que reconozcan y/o se unan a la molécula de interés (como puede ser una etiqueta de afinidad, grupos de intercambio iónico o ligandos hidrofóbicos/hidrofílicos), se mezclan con la muestra biológica a analizar. Tras un tiempo de incubación, los complejos formados (nanopartícula funcionalizada y molécula unida) se aíslan por separación magnética y se lavan. Finalmente, se realiza la elución de las moléculas purificadas (He et al. 2014).
- Biosensores e inmunoensayos: las nanopartículas de magnetita se pueden utilizar como elementos transductores y/o plataformas magnéticas para la inmovilización, separación y concentración del analito objetivo antes de la detección. En el caso de su uso como transductor magnético, la transducción se puede realizar mediante dos técnicas: la detección mediante resonancia magnética (véase “*Nanopartículas de magnetita como agentes de contraste*” en el presente apartado) o el uso de sensores magnetorresistivos (basado en los cambios de la resistencia electrónica del material al exponerlo a un campo magnético). En el caso de su uso como inmunoplatformas magnéticas, las nanopartículas de magnetita proporcionan un soporte sólido con un gran área de superficie, aumentando la cantidad de biomoléculas conjugadas, lo que permite incrementar el rendimiento del sensor analítico. Además, los protocolos de lavado pueden automatizarse mediante el uso de imanes (Ortega and Reguera 2019; Sobczak-Kupiec et al. 2016).
- Nanopartículas de magnetita para la inmovilización de enzimas/proteínas: debido a que permiten la recuperación magnética de una manera fácil y rápida de mezclas complejas, las nanopartículas de magnetita han despertado un creciente interés en su uso como soporte sólido de proteínas/enzimas. Dicha inmovilización se puede llevar a cabo mediante la conjugación directa del enzima/proteína sobre las nanopartículas mediante un enlace covalente usando carbodiimida o mediante un enlace tioéter (Reddy et al. 2012; Saiyed et al. 2007). Así, se han conseguido

inmovilizar diferentes enzimas en nanopartículas magnéticas como la peroxidasa de rábano (Zhang et al. 2008a), la tripsina (Pereira et al. 2010), la lacasa (Huang et al. 2007), la amilasa o la xilanasa (Salem et al. 2021).

- Nanopartículas de magnetita para la separación de metales pesados contaminantes en mezclas: este método de separación magnética permite la eliminación magnética rápida, rentable y fácil de estas sustancias de mezclas de reacción heterogéneas y complejas, tanto a pequeña escala como a escala de planta piloto. Además, esta metodología puede automatizarse sin necesidad de diluir la muestra o perder el portador magnético durante la purificación. Así, nanopartículas de magnetita recubiertas con poli-ácido-acrílico o poli-L-cisteína se han utilizado como quelantes selectivos para la separación de metales pesados (Huang and Chen 2009; White et al. 2009).

**Nanopartículas de magnetita en nanomedicina.** Las nanopartículas de magnetita se aplican en diferentes ámbitos de la nanomedicina como son el análisis, el diagnóstico y/o el tratamiento de la enfermedad:

- Nanopartículas de magnetita como agentes de contraste: la resonancia magnética de imagen (MRI del inglés *Magnetic Resonance Imaging*) es una técnica de imagen no invasiva capaz de proporcionar imágenes anatómicas de alta resolución con alta resolución espacial. Es un método ampliamente empleado, principalmente, en el diagnóstico de patología de tejidos blandos o cartílagos, permitiendo diferenciar entre tejidos malignos y tejidos sanos. Las nanopartículas de magnetita son excelentes agentes de contraste  $T_2$  en comparación con otros agentes de contraste como  $Gd^{3+}$ -DTPA. Así, mediante su uso, se obtiene un contraste oscuro o negativo debido a la inducción de una fuerte susceptibilidad magnética en los protones de agua de alrededor de las nanopartículas (Laurent et al. 2008; Qiao et al. 2009). En otras palabras, la alta susceptibilidad magnética de las nanopartículas de magnetita acorta el tiempo de relajación transversal de los protones en las regiones del tejido donde se localizan dichas nanopartículas, generando una imagen más oscura del área objetivo en contraste con el fondo biológico (Na et al. 2009).
- Nanopartículas de magnetita como plataformas de teragnóstico: el término teragnóstico se definió como aquel material que combina las modalidades de

terapia y diagnóstico por imagen (Funkhouser 2002). Las nanopartículas de magnetita son la plataforma más estudiada y utilizada para este fin. Los principales beneficios que las nanopartículas de magnetita ofrecen en este ámbito son: (i) una carga muy alta de fármaco; (ii) farmacocinética y biodistribución adecuados; (iii) capacidad de guía magnética y control de la liberación de fármacos; y, (iv) la capacidad que presentan para su uso como agentes de contraste para MRI, para monitorizar y controlar el suministro del fármaco y la respuesta terapéutica (Han and Zhou 2016; Han et al. 2016).

- Nanopartículas de magnetita en magnetofección: las terapias génicas se basan en la introducción de ácidos nucleicos con el objetivo de modular y/o reparar alguna función. En este sentido, la magnetofección se define como la administración de ácidos nucleicos bajo la influencia de un campo magnético externo que actúa sobre las nanopartículas de magnetita que transportan el material genético. Dicho suministro se puede realizar utilizando vectores virales (transducción) o vectores no virales (transfección). La magnetofección conlleva los siguientes pasos: (i) funcionalización de las nanopartículas de magnetita con el ADN; (ii) incubación *in vitro* o administración sistémica *in vivo*; y (iii) guía del vector cerca del objetivo mediante la aplicación de un campo magnético externo (Mykhaylyk et al. 2007; Reddy et al. 2012). Así, son numerosos los estudios que han mostrado un incremento en la eficiencia de la transducción/transfección tanto *in vitro* como *in vivo* al administrar el material genético acoplado a nanopartículas magnéticas (Tresilwised et al. 2010).
- Nanopartículas de magnetita en ingeniería de tejidos: la ingeniería de tejidos se basa en el desarrollo y construcción de “andamios” biocompatibles basados en microestructuras bidimensionales o tridimensionales que proporcionan a las células propiedades de fijación, crecimiento, diferenciación y proliferación. La colonización celular de esos “andamios” puede tener lugar *ex vivo* para su posterior injerto en el cuerpo o en condiciones *in vivo* (Kubinová and Syková 2010). Existe una técnica de ingeniería de tejidos que incluye el uso de nanopartículas magnéticas para proporcionar propiedades magnéticas a las células y facilitar la colonización del andamio, conocida como Mag-TE (Bock et al. 2010; Ishii et al. 2011). Esta tecnología se basa en el siguiente procedimiento: (i) adsorber o cargar las células con las nanopartículas; (ii) hidratar el “andamio” con la suspensión celular anterior; (iii) aplicar un campo magnético externo

permitiendo que las células se dirijan, compacten y colonicen el “andamio” (Ito et al. 2007).

- Nanopartículas de magnetita como nanotransportadores de fármacos y agentes de hipertermia: dado que estas dos aplicaciones son aplicaciones de relevancia para esta Tesis Doctoral, se describirán con mayor detalle en el *apartado 2.2*.

## 2.2. Nanopartículas magnéticas en nanomedicina: el reto del tratamiento local de enfermedades localizadas

El término **nanomedicina** se popularizó a finales de la década de los noventa para describir el uso y aplicación de un campo emergente, la **nanotecnología** (la cual busca describir y explotar las propiedades y comportamientos únicos de las estructuras a escala nanométrica), en la salud humana (Freitas 1999; Shi et al. 2017). El concepto nanomedicina incluye una amplia gama de enfoques que abordan tanto el tratamiento como el diagnóstico de enfermedades y su definición se está perfeccionando a medida que la disciplina avanza y evoluciona. Desde la aprobación de las primeras nanomedicinas (Doxil: formulación liposómica que incluye el fármaco doxorubicina) por parte de la Agencia de Medicamentos y Alimentación (FDA del inglés *Food and Drug Administration*) en 1995, el campo de la nanomedicina ha experimentado un crecimiento exponencial. De esta manera, el número total de artículos relacionados con nanomedicina en *PubMed* se ha duplicado en número cada año desde el inicio del siglo XXI (Shi et al. 2017). A día de hoy, existen aproximadamente 50 nanoformulaciones aprobadas por la FDA y se estima que su valor de mercado alcance los 270 billones de dólares para el año 2023.

En relación al ámbito de aplicación de la nanomedicina para la **liberación de fármacos** (del inglés *drug delivery*), el cual será el tema que se aborde en el presente bloque, las nanoformulaciones incluyen soluciones terapéuticas compuestas por polímeros, lípidos, metales, materiales inorgánicos o magnéticos que presentan, al menos, una dimensión física de 1-1000 nm, preferentemente entre 5-200 nm. Estas plataformas de tamaño nanométrico conocidas como **nanotransportadores** (del inglés *nanocarriers*) han ido evolucionando en complejidad macromolecular para incrementar y mejorar sus funcionalidades, así como conseguir mejorar los requisitos básicos que todo nanotransportador debe presentar: (1) el nanotransportador debe poder transportar una

dosis suficiente de un fármaco hidrófobo o hidrófilo; (2) se debe poder dirigir, distribuir y acumular en el sitio diana tanto a nivel anatómico como a nivel sub-celular; y (3) debe ser biocompatible, estar bien caracterizado y ser fácilmente funcionalizable. De manera resumida, un nanotransportador tiene que solubilizar el agente activo farmacéutico, adaptar las interacciones celulares para incrementar la absorción del fármaco, así como minimizar la eliminación o degradación de su carga antes de llegar al sitio diana. Además, el nanotransportador debe no ser inmunogénico y tener un protocolo de síntesis sencillo y escalable (Kakkar et al. 2017; Peer et al. 2007a).

Las características mencionadas anteriormente hacen plausible que la aplicación del fármaco cargado en el nanotransportador ofrezca una serie de ventajas que la administración convencional del fármaco no presenta: (1) mejora del índice terapéutico del fármaco (el cual representa la comparación entre la cantidad de fármaco que causa el efecto terapéutico y aquella cantidad que causa toxicidad) incrementando su eficacia y/o disminuyendo su toxicidad; (2) posibilidad de liberación dirigida en un tejido, célula y /o compartimento celular; (3) mejora de las propiedades farmacocinéticas del agente terapéutico (estabilidad, solubilidad, vida media en sangre); (4) posibilidad de liberación múltiple de fármacos con efecto sinérgico; (5) posibilidad de realización de una liberación del fármaco controlada por estímulos; y (6) posibilidad de aplicación de una terapia combinada aprovechando las características físicas inherentes del nanotransportador (por ejemplo, la capacidad de generar calor mediante hipertermia magnética de las nanopartículas de óxido de hierro) (Kumari et al. 2016; Peer et al. 2007a; Shi et al. 2017).

Sin embargo, a pesar de las ventajas que el uso de nanotransportadores en la liberación de fármacos conlleva, aún existen numerosos retos y desafíos a nivel biológico y tecnológico por resolver que han imposibilitado la total irrupción de la nanotecnología en el tratamiento de enfermedades localizadas, tales como el cáncer o las enfermedades infecciosas. Prueba de ello, es el bajo número de medicamentos que incluyen nanotransportadores aprobados por la FDA.

En los siguientes apartados, se describirán los desafíos a los que actualmente se enfrenta el campo de la nanomedicina en el ámbito de la liberación de fármacos, así como las vías alternativas que se están desarrollando para superar el problema y posibilitar la ansiada explosión de la nanotecnología en el campo de la nanomedicina.



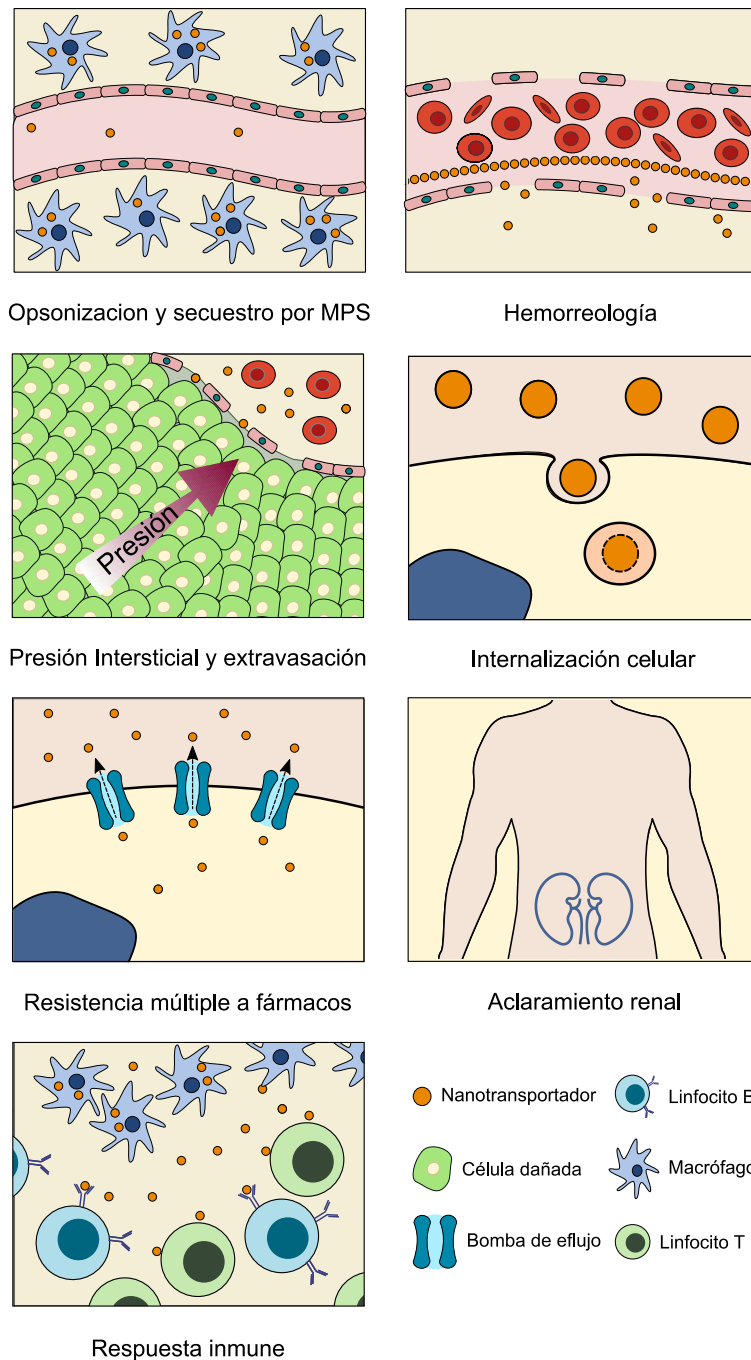
### 2.2.1. Retos y desafíos

El interés en el uso de nanotransportadores para la liberación de fármacos despertó, en un primer momento, por la capacidad de estas plataformas para solventar las limitaciones farmacocinéticas asociadas con las formulaciones terapéuticas convencionales. Sin embargo, no fue hasta el descubrimiento por parte de Maeda et al. 1986 del efecto de retención y permeabilidad aumentadas (efecto EPR del inglés *Enhanced Permeability and Retention effect*) que la comunidad científica puso el foco en el potencial de estos nanotransportadores (Chauhan and Jain 2013; Matsumura and Maeda 1986). El paradigma del **efecto EPR** se basa en la idea de que nanopartículas con un tamaño comprendido entre 10 y 100 nm que presenten una larga circulación sanguínea, son lo suficientemente grandes para evitar la extravasación en los tejidos sanos, así como para ser eliminados por los riñones. Sin embargo, su tamaño permite la extravasación a través de la vasculatura disfuncional asociada a los tumores. Una vez dentro del tumor, los vasos linfáticos defectuosos evitan la eliminación de las nanopartículas del tejido favoreciendo así su acumulación (Maeda et al. 2013). Este descubrimiento supuso el inicio de numerosas vías de investigación encaminadas a la liberación de fármacos en sitios específicos utilizando nanotransportadores y ha sido objeto de estudio durante las últimas décadas (Blanco et al. 2015; Irvine and Dane 2020). Posteriormente, se puso de manifiesto la evidencia del efecto EPR en diferentes patologías incluyendo, por ejemplo, infecciones (Azzopardi et al. 2012) o insuficiencia cardíaca (Marti et al. 2012). Todo ello, ha posibilitado que el uso de nanotransportadores suponga una estrategia con gran potencial para el tratamiento de enfermedades localizadas, tal y como demuestra la aprobación clínica por parte de la FDA de nanoformulaciones de nanotransportadores para el tratamiento de infecciones fúngicas, hepatitis A o la enfermedad renal terminal (Zhang et al. 2008b). Sin embargo, a pesar de la aprobación clínica de estas nanoformulaciones, en un sentido práctico, el beneficio ofrecido a los pacientes por estas plataformas en comparación con las formulaciones convencionales es ínfimo (Gradishar et al. 2005; O'Brien et al. 2004). A pesar del potencial de dichas plataformas para incrementar la vida media del fármaco y mejorar su acumulación en el sitio deseado, existen numerosas barreras biológicas que comprometen en un sentido estricto la biodisponibilidad en el sitio deseado, imposibilitado así la obtención de los resultados terapéuticos esperados.

Además de las barreras biológicas, encontramos otras barreras y retos tecnológicos relacionados con el diseño racional del nanotransportador, aspectos regulatorios o la optimización de su síntesis y caracterización que también deben ser abordados para conseguir el éxito en la traslación de los resultados a clínica.

### 2.2.1.1. Barreras biológicas

El conocimiento de las interacciones biológicas a las que se enfrentan los nanotransportadores tras su administración, supone un aspecto clave y necesario para abordar el diseño correcto de estas plataformas y conseguir la correcta acumulación de las nanoformulaciones en el lugar deseado. Existen numerosas barreras biológicas que los nanotransportadores deben superar para llegar al sitio diana. Entre estas barreras encontramos: opsonización y secuestro por el sistema fagocítico mononuclear (MPS del inglés *Mononuclear Phagocyte System*), distribución no específica, limitación condicionada por los flujos sanguíneos o hemorreológicos, gradientes de presión, internalización celular, escape de los compartimentos lisosomales y endosomales y las bombas de eflujo de fármacos (Figura 9). Es importante destacar que la complejidad de dichas barreras se verá afectada por otros factores tales como, por ejemplo, la ruta de administración (oral o sistémica), el tipo de enfermedad (cáncer o infección) o el estado de avance de la enfermedad. A continuación, se describirán brevemente y de manera secuencial todas estas barreras. Además, se analizarán otras interacciones biológicas de los nanotransportadores como son la respuesta inmunológica y el aclaramiento renal.



**Figura 9.** Secuencia de las barreras e interacciones biológicas que tienen lugar durante la administración de fármacos utilizando nanotransportadores. Imagen adaptada y modificada de Blanco et al. 2015.

**Opsonización y secuestro por el MPS.** Una de las mayores limitaciones de la liberación de fármacos utilizando nanotransportadores, reside en la incapacidad de alcanzar los niveles terapéuticos en el lugar deseado debido a la captación de estas nanoformulaciones en los órganos sanos. El MPS es un sistema constituido por células

fagocíticas, predominantemente macrófagos, localizados en el bazo, ganglios linfáticos e hígado. Este sistema secuestra los nanotransportadores inmediatamente después de la aplicación sistémica (Patel and Moghimi 1998). Para ello, en un primer momento, se produce el fenómeno conocido como opsonización, el cual consiste en la adsorción de proteínas del plasma (las conocidas como proteínas corona) en la superficie de la nanoformulación (Tenzer et al. 2013). A continuación, como consecuencia de la unión, se desencadena el reconocimiento y eliminación de las nanoformulaciones por el sistema MPS (Mahmoudi et al. 2011). Se han diseñado diferentes estrategias con el objetivo de “camuflar” las nanoformulaciones y evitar su opsonización, como son el recubrimiento con polietilenglicol (PEG) (Milton Harris and Chess 2003), el uso de péptidos como el péptido CD47 que provocan que el macrófago reconozca la nanoformulación como propia evitando la fagocitosis (Rodríguez et al. 2013) o la aproximación biomimética de recubrimiento de la nanoformulación con membranas celulares obtenidas bien de leucocitos (Parodi et al. 2013) o de células rojas (Hu et al. 2011).

**Dinámica de los vasos sanguíneos y hemorreología.** El flujo de los nanotransportadores, la marginación de los mismos, entendida como la deriva lateral de las nanopartículas a las paredes endoteliales, así como sus propiedades de adhesión a los vasos sanguíneos dependen del tamaño y la geometría. A diferencia de las nanopartículas esféricas, las cuales debido a su geometría se encuentran en una región particular del vaso sanguíneo conocida como capa libre de células, resultado directo de la tendencia de los glóbulos rojos a acumularse preferentemente en el centro del vaso, las nanopartículas no esféricas, como las alargadas, son más propensas a efectos de caída y oscilación en la dinámica de circulación de los vasos sanguíneos moviéndose de un lado del vaso sanguíneo al opuesto. Todo ello posibilita el incremento del contacto de las nanoformulaciones con la pared celular y hace posible su extravasación a través de las fenestraciones de la vasculatura (Blanco et al. 2015).

**Presión intersticial y extravasación.** Una de las características potenciales que hacen atractivo el uso de nanotransportadores en el tratamiento de enfermedades localizadas es su potencial para acumularse preferentemente en el sitio de tumor, infección o inflamación, gracias al efecto EPR descrito en el *apartado 2.2.1*. Sin embargo, aunque el efecto EPR se basa en el efecto derivado de la vasculatura anómala asociada con la enfermedad, estudios previos han demostrado que el aumento de la permeabilidad y la retención de los nanotransportadores dependerán tanto del órgano afectado, así como

en el caso de los tumores, del conocido como *microambiente tumoral* (Yokoi et al. 2014). De esta manera, las presiones intersticiales de los fluidos pueden prevenir el flujo de las nanoformulaciones a los sitios de interés. En el caso de los tumores, las presiones hidrostáticas y osmóticas están comprometidas debido al microambiente tumoral y a la vasculatura alterada (Heldin et al. 2004). Además, la presencia de un drenaje linfático ineficiente, junto con una matriz extracelular muy densa, provocan unas elevadas presiones de líquido intersticial. Estas altas presiones evitan la correcta extravasación de las nanoformulaciones a la zona de interés, comprometiendo la correcta liberación del fármaco en el lugar deseado.

**Internalización celular y compartimentalización.** Una vez se ha conseguido realizar la extravasación al sitio deseado, las nanoformulaciones deben ser internalizadas y, posteriormente, liberar el fármaco que transportan para ejercer su efecto terapéutico. En relación a los mecanismos de internalización, en células mamíferas no especializadas, la endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo común para realizar la incorporación de las nanoformulaciones por parte de las células (Le Roy and Wrana 2005). En dicho mecanismo, la endocitosis de las nanoformulaciones implica la invaginación de la membrana plasmática celular y la formación de vesículas intracelulares (endosomas) que finalmente se fusionan con los lisosomas (Bogart et al. 2014; Gould and Lippincott-Schwartz 2009; Rosenblum and Peer 2014; Sahay et al. 2010). El ambiente extremadamente ácido de los lisosomas puede derivar en la degradación tanto del agente terapéutico como del nanotransportador. Una alternativa para evitar la deriva de las nanoformulaciones en los lisosomas, es conseguir la activación de mecanismos alternativos de internalización, como es la endocitosis mediada por caveolina, en la cual los compartimentos formados que se desprenden de la membrana, se fusionan con caveosomas de pH neutro, evitando así la fusión con lisosomas (Bareford and Swaan 2007; Sahay et al. 2010). Algunos estudios han demostrado que la funcionalización de las nanoformulaciones con ácido fólico, albúmina y colesterol ha derivado en la internalización de las mismas a través de endocitosis mediada por caveolina (Dauty et al. 2002; Gradishar 2006).

**Resistencia múltiple a fármacos: bombas de eflujo de fármacos.** Sin duda alguna, la resistencia múltiple a fármacos supone a día de hoy un gran obstáculo para el tratamiento de diferentes enfermedades incluyendo infecciones, inflamación y cáncer. La resistencia múltiple a fármacos (MDR del inglés *Multidrug Resistance*) tanto intrínseca

como adquirida, implica el eflujo hacia el exterior de fármacos por parte de las células. Este fenómeno deriva en una disminución de las concentraciones intracelulares de agente terapéutico y, por consiguiente, en una disminución del impacto terapéutico. Todo ello, tiene como resultado final una mayor toxicidad local como consecuencia de la exposición de las células sanas al fármaco expulsado, así como la necesidad de aumentar la dosis del tratamiento (Blanco et al. 2015).

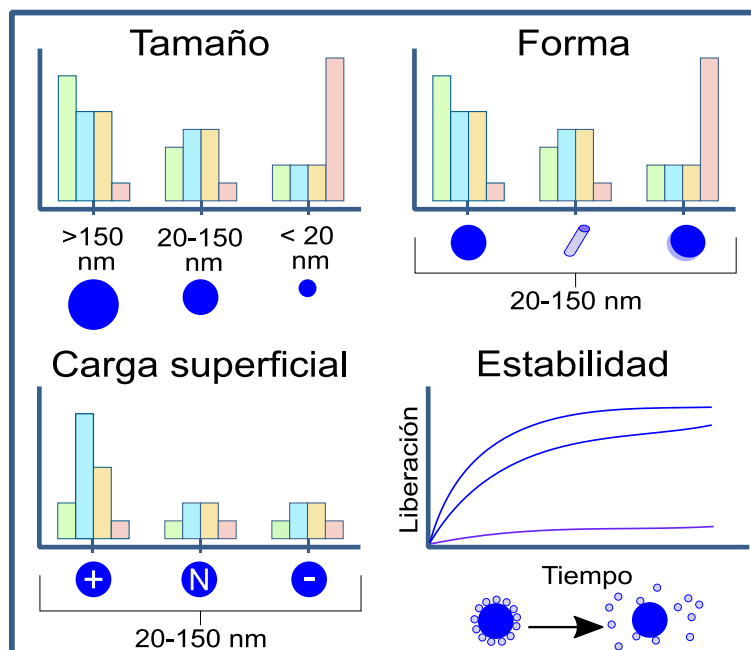
**Aclaramiento renal.** Además de los órganos que componen el sistema MPS, los riñones suponen el segundo mayor órgano implicado en el aclaramiento de las nanoformulaciones. Tras la administración intravenosa, los riñones filtran las nanoformulaciones de la sangre y las eliminan rápidamente del cuerpo (Du et al. 2018). Se ha demostrado que el tamaño de la nanoformulación está relacionado de manera inversa con el aclaramiento renal. Así, por ejemplo, las nanoformulaciones con un tamaño inferior a 5-6 nm tienen una vida media muy corta, inferior a 600 minutos, mientras que aquéllas de diámetro superior incrementan su vida media en la sangre (Choi et al. 2010, 2007). Sin embargo, en el caso de las nanoformulaciones compuestas por nanotransportadores no biodegradables, este mecanismo de aclaramiento ha resultado un aliado para mejorar la biocompatibilidad y reducir la toxicidad de estos nanotransportadores (Kang et al. 2016; Yu and Zheng 2015; Zhou et al. 2011).

**Respuesta inmunológica al nanotransportador.** Otra de las interacciones biológicas de los nanotransportadores es su interacción con el sistema inmune. La mayoría de los nanotransportadores son inmunoestimuladores, es decir, son reconocidos por el sistema inmune como sustancias extrañas y se genera una respuesta inmune contra ellos. Entre estas respuestas destacan la respuesta de anticuerpos por su naturaleza antigénica o una respuesta inflamatoria derivada de la endocitosis por parte del sistema MPS y la activación de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias o el sistema del complemento (Dobrovolskaia and McNeil 2007).

#### *2.2.1.2. Diseño racional del nanotransportador*

El conocimiento de las numerosas barreras secuenciales que las nanoformulaciones tienen que superar tras la administración intravenosa ha puesto de manifiesto la necesidad urgente de optimizar los parámetros de diseño de los nanotransportadores incluyendo el tamaño, la forma o la carga superficial, con el objetivo

último de superar estas barreras y conseguir la acumulación del agente terapéutico en el lugar deseado (Figura 10).



**Figura 10.** Diseño racional del nanotransportador. Efecto de las diferentes propiedades del nanotransportador (tamaño, forma, carga superficial o estabilidad) en la biodistribución (● pulmón, ● hígado, ● bazo y ● riñón). Imagen adaptada y modificada de Blanco et al. 2015.

**Tamaño.** El tamaño del nanotransportador es un parámetro de diseño importante que afecta a la distribución de los nanotransportadores *in vivo*. Dicho parámetro determina diferentes interacciones biológicas que condicionan su vida media en circulación, la extravasación a través de la vasculatura o la absorción de macrófagos. Los nanotransportadores de  $< 5$  nm son rápidamente eliminados mediante el aclaramiento renal (Choi et al. 2007), mientras que nanotransportadores de tamaños superiores son acumulados de manera inespecífica en el hígado (Braet et al. 2007). Por otro lado, la filtración esplénica explica la retención de nanotransportadores de tamaño  $> 200$  nm dado el tamaño hendiduras de las células interendoteliales (comprendido entre 200 y 500 nm) (Chen and Weiss 1973). Así, nanotransportadores con un tamaño comprendido entre 20-100 nm tienen, en principio, un mayor potencial para una larga circulación sanguínea (Petros and Desimone 2010). Esto es importante debido a que un incremento en la vida media en sangre, aumenta las posibilidades de extravasación a través de la vasculatura tumoral, la cual presenta fenestraciones con un tamaño comprendido entre 380-780 nm

(Hobbs et al. 1998). Con el fin de acotar el tamaño ideal para conseguir la acumulación del nanotransportador en el lugar deseado, se han realizado diferentes estudios en los cuales se determinó que el tamaño óptimo para disminuir el aclaramiento y conseguir una mayor penetración en el sitio diana es aquel comprendido entre 30 y 50 nm (Cabral et al. 2011; Tang et al. 2012).

**Forma.** Se ha demostrado que la forma y geometría es un factor crucial que determina tanto la farmacocinética como la biodistribución de los nanotransportadores. Diferentes formas geométricas dan lugar a diferentes dinámicas de flujo que, de manera substancial, alteran el tiempo de circulación, la capacidad de movimiento hacia los laterales de los vasos sanguíneos, así como su absorción por células tumorales y macrófagos (Ananta et al. 2010; Barua et al. 2013; Black et al. 2014; Smith et al. 2012; Toy et al. 2014). Algunos estudios han demostrado que los nanotransportadores con formas alargadas, elipsoidales, cilíndricas o discoidales presentan una mayor capacidad de acumulación en el lugar deseado, en comparación con las formas esféricas, dada su capacidad/tendencia a acumularse y adherirse a las células endoteliales que recubren las paredes de los vasos sanguíneos, mejorando así la extravasación al lugar deseado. Sin embargo, todavía no se ha definido de manera clara el efecto que la forma tiene en la extravasación, ya que se ha demostrado que dicho efecto puede variar dependiendo del tipo de enfermedad (Chauhan et al. 2011; Gentile et al. 2008; Kolhatkar et al. 2013; Park et al. 2008; Smith et al. 2012).

**Carga superficial.** La carga superficial es otro parámetro del diseño racional de los nanotransportadores que se puede modificar con el objetivo de prolongar la vida media en sangre, así como mejorar selectivamente la acumulación del agente terapéutico en el lugar de interés. Se ha demostrado que los nanotransportadores que presentan cargas superficiales neutras o negativas reducen la adsorción de proteínas del plasma, reduciendo el fenómeno de opsonización y secuestro e incrementando su vida media en sangre (Alexis et al. 2010). Así, el estudio realizado por Yamamoto et al. 2001 utilizando polímeros aniónicos y neutros, puso de manifiesto que las nanoformulaciones neutras o aniónicas presentaban una mayor circulación en sangre, así como que las nanoformulaciones cargadas negativamente resultaban en una menor acumulación en los órganos del sistema MPS. Por el contrario, los nanotransportadores catiónicos tienen una mayor tasa de adsorción no específica en la mayoría de las células. Sin embargo, una vez localizado el nanotransportador en el sitio diana, se ha demostrado que aquellas



nanoformulaciones cargadas positivamente facilitan la liberación endosómica a través del mecanismo denominado efecto de esponja de protones (basado en la idea de que las cargas positivas son capaces de tamponar el pH endosomal y provocar en el endosoma un hinchamiento osmótico que finaliza con la liberación de la nanoformulación en el citoplasma) (Nel et al. 2009), evitando la degradación del agente terapéutico en dicho compartimento celular. Por lo tanto, en un diseño ideal, la nanoformulación debería presentar una carga neutra o negativa tras la administración intravenosa, pero, una vez llegue al sitio diana, su superficie debería virar hacia una carga positiva (Yuan et al. 2012).

**Estabilidad y degradabilidad.** La estabilidad y degradabilidad del nanotransportador constituyen otras de las características que determinan la liberación del agente terapéutico en el lugar deseado. La liberación de dicho agente está condicionada por la cinética de degradación del nanotransportador, por lo que dicho parámetro representa una consideración crítica en el diseño racional de la plataforma. Para un correcto funcionamiento, el nanotransportador debe permanecer estable en la circulación sanguínea para evitar la acumulación no deseada e inespecífica del fármaco en órganos sanos y maximizar la biodisponibilidad en el sitio deseado (Blanco et al. 2015). Una vez llegue a su destino, dicho nanotransportador debe liberar el fármaco y degradarse en metabolitos que no presenten toxicidad y puedan ser eliminados (Reddy et al. 2012).

### 2.2.1.3. Barreras tecnológicas

Además de los desafíos relacionados con las barreras biológicas y el diseño racional del nanotransportador, existen otros obstáculos técnicos y regulatorios que, hasta la fecha, han imposibilitado la correcta traslación y comercialización de las nanoformulaciones.

**Regulación.** Uno de los obstáculos que constituye una barrera tecnológica es la complejidad de los protocolos recogidos en el documento de buenas prácticas del laboratorio (GLP del inglés *Good Laboratory Practices*), así como la brecha existente entre los resultados obtenidos en el entorno académico y las necesidades requeridas por la industria farmacéutica. Las directrices GLP se establecieron en la década de 1970 como respuesta a las incongruencias encontradas en numerosos análisis toxicológicos (Baldeshwiler 2003). Así, tanto la FDA como la Agencia Europea de Medicamentos (EMA del inglés *European Medicines Agency*) establecieron una serie de regulaciones

mínimas para estandarizar los ensayos de laboratorio pre-clínicos necesarios para la comercialización de los productos ensayados. La aplicación de GLP en los estudios pre-clínicos realizados en ambientes académicos incrementaría la colaboración con industria, reduciendo la brecha que existe actualmente. Sin embargo, todavía existe una gran controversia sobre cuándo y cómo aplicar estas directrices, ya que su aplicación en estadios tempranos de desarrollo podría conllevar un alto coste, así como una ralentización de la investigación. Por otro lado, la complejidad química y estructural de las nanoformulaciones ha puesto de manifiesto la necesidad de definir un nuevo marco de herramientas reguladoras, diferentes de las clásicas, para evaluar su seguridad y eficacia. Así, en respuesta a esta necesidad, la FDA aprobó en 2013 el *Nanotechnology Regulatory Science Research Plan*, con el objetivo de abordar los métodos y herramientas adecuados para la regulación de la evaluación de los nanotransportadores, en el cual se definieron cinco criterios principales que siempre se deben abordar: caracterización físico-química, modelos pre-clínicos, caracterización, evaluación y comunicación de riesgos (Sanhai et al. 2007). Un ejemplo claro de esta iniciativa fue el establecimiento del Laboratorio de Caracterización Nanotecnológica (NCL del inglés *Nanotechnology Characterization Lab*), el cual realiza evaluaciones exhaustivas de nanoplataformas (de origen académico o industrial) utilizando una cascada analítica estandarizada basada en los criterios definidos anteriormente ('Home | Nanotechnology Characterization Lab (NCL)' n.d.). Este procedimiento permite la recopilación estandarizada de los datos necesarios para presentar una solicitud de Nuevo Medicamento de Investigación (IND del inglés *Investigational New Drug*) a la FDA, lo que facilita la translación clínica de las terapias basadas en dichas nanoplataformas (Rosenblum et al. 2018).

**Escalado de la producción.** Otro aspecto que compromete la translación clínica del uso de nanotransportadores es, dada la creciente complejidad en el diseño de los mismos, la dificultad para el escalado de la síntesis y el recubrimiento de dichas plataformas, la cual, en la mayoría de las ocasiones, implica el desarrollo y la optimización de nuevos procesos de fabricación (Shi et al. 2017). Este hecho es relevante debido a que la mayoría de las nanoplataformas utilizadas en estudios pre-clínicos son sintetizadas casi exclusivamente en pequeños lotes y la ampliación a lotes más grandes, así como la reproducibilidad entre lotes, no siempre es posible, incluso para cubrir las necesidades de los estudios clínicos (Anselmo and Mitragotri 2016). Este procedimiento se complica aún más cuando la síntesis de la nanoformulación conlleva múltiples pasos o

tecnologías complicadas. Todo ello implica que la transición de laboratorio a clínica vaya siempre acompañada de la optimización o incluso cambio en las propiedades de las nanoformulaciones lo que interrumpe y/o ralentiza el proceso de traslación. Por lo tanto, es necesario un cambio de pensamiento que posicione el escalado de la síntesis de la nanoformulación en uno de los primeros pasos a definir en el diseño del mismo.

### 2.2.2. Soluciones actuales

En el ámbito de la liberación de fármacos, a día de hoy, existen numerosas nanoformulaciones aprobadas para su uso clínico tanto por la FDA como por la EMA. Un aspecto que llama la atención es el hecho de que todas (a excepción de una: Abraxane), están compuestas por liposomas que encapsulan un agente terapéutico. La primera nanoformulación aprobada para su uso clínico fue Doxil en 1995, la cual está constituida por liposomas funcionalizados con PEG que encapsulan doxorubicina (Barenholz 2012). Poco tiempo después, se incrementó el número de formulaciones liposómicas aprobadas para su uso clínico: DaunoXome (Fox 1995) que encapsula daurubicina; Marqibo (Silverman and Deitcher 2013) que encapsula vincristina; Onivyde (Carnevale and Ko 2016) que encapsula irinotecan; Myocet (Leonard et al. 2009) constituido por liposomas no pegilados que contienen doxorubicina; AmBisome, Abelcet o Amphotec (Boswell et al. 1998; Rust and Jameson 1998) que constituyen diferentes formulaciones de liposomas que encapsulan el fármaco antifúngico altamente tóxico anfotericina B. La única nanoformulación no consistente en liposomas es Abraxane, la cual está constituida por nanopartículas de albúmina que encapsulan paclitaxel (Miele et al. 2009).

En relación a los ensayos clínicos que se están desarrollando relacionados con la encapsulación y liberación de fármacos, el número de ensayos clínicos es abundante. Sin embargo, a pesar de ello, la mayoría de los sistemas que se están evaluando en la actualidad son liposomas que presentan un diseño similar a aquéllos ya aprobados para su uso clínico (por ejemplo, liposomas pegilados, no pegilados o que incluyen un solo fármaco). Este hecho se debe a que las nanoformulaciones previamente aprobadas ya han demostrado su seguridad y eficacia en humanos y, en caso de comercializarse, es más sencillo que cumplan los estándares de buenas prácticas de fabricación (GMP del inglés *Good Manufacturing Practice*) (Anselmo and Mitragotri 2016). Por el contrario, solamente unos pocos han introducido un diseño innovador. Entre éstos, destaca el producto VYEXOS/CPX-351, el cual es una formulación liposomal que combina dos

fármacos citarabina-daunorubicina y ha mostrado un incremento en la supervivencia de los pacientes con leucemia mieloide aguda de alto riesgo (9,56 meses en comparación con los 5,95 meses de los pacientes tratados con la misma combinación de fármacos administrados de manera libre) (Lancet et al. 2016, 2014). Alternativamente, poco a poco, se han introducido en los ensayos clínicos nuevas formulaciones que incluyen micelas (Genexol PM (Ahn et al. 2014) o NK105 (Kato et al. 2012)) o polímeros (CRLX101 (Clark et al. 2016) o AZD-2811 (Ashton et al. 2016)) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Formulaciones que no han sido aprobadas clínicamente, pero están siendo evaluadas en ensayos clínicos.

Nombre	Formulación	Aplicación	Identificador*
<b>Liposomas</b>			
PROMITIL (Lipomedix Pharmaceuticals)	Liposoma pegilado con mitomicina-C	Tumores sólidos	NCT01705002 (Fase I)  NCT02286726 (Fase II) NCT02019069 (Fase II)
VYEXOS CPX- 351 (Celator Pharmaceuticals)	Liposoma con citarabina y daunorubicina	Leucemia	NCT01943682 (Fase I) NCT02269579 (Fase II) NCT02533115 (Fase IV) NCT01696084 (Fase III)
Oncopres (Genprex)	Liposoma con FUS1	Cáncer de pulmón	NCT01455389 (Fase II)
Lipocurc (SignPath Pharma)	Liposoma con curcumina	Tumores sólidos	NCT02138955 (Fase II)
LiPlaCis (LiPlasome Pharma)	Liposoma con cisplatino	Tumores avanzados	NCT01861496 (Fase I)
LIPUSU (Nanjing Luye Sike Pharmaceutical Co.,)	Liposoma con paclitaxel	Tumores sólidos, cáncer de mama o cáncer gástrico	NCT01994031(Fase IV) NCT02142790(Fase IV) NCT02163291 (Fase II)
CAL02 (Combioxin SA)	Liposomas con esfingomielina y colesterol para la neutralización de toxina	Neumonía	NCT02583373 (Fase I)

Nanocort ( <i>Sun Pharma Global</i> )	Liposomas pegilados con prednisolona	Artritis reumatoide	NCT02495662 (Fase II) NCT02534896 (Fase III)
---------------------------------------	--------------------------------------	---------------------	---

**Polímeros y micelas**

AZD-2811 ( <i>AstraZeneca</i> )	Polímero que incluye el inhibidor de la aurora quinasa B	Tumores sólidos avanzados	NCT02579226 (Fase I)
Genexol-PM ( <i>Samyang Biopharmaceuticals</i> )	Micela polimérica con paclitaxel	Cáncer de mama, cabeza y cuello	NCT01689194 (Fase II) NCT02263495 (Fase II) NCT00912639 (Fase IV)
NC-6004 Nanoplatin ( <i>Nanocarrier</i> )	Nanopartícula micelar pegilada con cisplatino	Tumores sólidos avanzados, cáncer de pulmón o páncreas	NCT02240238 (Fase II) NCT02043288 (Fase III)
NC-4016 DACH-Platin micelle ( <i>Nanocarrier</i> )	Nanopartícula micelar pegilada con oxalipatino	Tumores sólidos avanzados o linfomas	NCT01999491 (Fase I)
NK105 ( <i>Nippon Kayaku</i> )	Micela con paclitaxel	Cáncer de mama	NCT01644890 (Fase III)
CriPec ( <i>Cristal Therapeutics</i> )	Micela con docetaxel	Tumores sólidos	NCT02442531 (Fase I)
CRLX101 ( <i>Cerulean</i> )	Conjugado de ciclodextrina con camptotecina	Cáncer ovárico o renal	NCT02187302 (Fase II) NCT02010567 (Fase II) NCT02389985 (Fase I) NCT01803269 (Fase II) NCT01652079 (Fase II)
CRLX301 ( <i>Cerulean</i> )	Conjugado de ciclodextrina con docetaxel	Tumores sólidos avanzados	NCT02380677 (Fase II)

**Nanopartículas de albúmina**

ABI-009 ( <i>Celgene</i> )	Nanopartículas de albúmina con rapamicina	Cáncer de vejiga o hipertensión arterial	NCT02009332 (Fase II) NCT02587325 (Fase I) NCT02494570 (Fase II)
----------------------------	---	--	--

---

\*Identificadores en *ClinicalTrials.gov*.

La mayoría de las formulaciones citadas anteriormente simplemente alteran la farmacocinética, el perfil toxicológico o la solubilidad del fármaco, **sin tener efectos significativos** en los índices de supervivencia o en la mejora del efecto terapéutico que el

fármaco administrado de manera no encapsulada en sí presenta. La explicación a este hecho recae en la evidencia de que estas nanoformulaciones basan su efecto terapéutico en la llegada al sitio deseado mediante transporte pasivo, es decir, utilizando como único mecanismo el efecto EPR (Bertrand et al. 2014; Gerlowski and Jain 1986; Maeda 2015; Matsumura and Maeda 1986). De esta manera, su eficacia se ve comprometida por la heterogeneidad de dicho efecto el cual se ha probado que varía sustancialmente entre pacientes, tipo de enfermedad o tipo de tumor, e incluso, en un mismo paciente dependiendo del tumor y la evolución del mismo (Arrieta et al. 2014; Koukourakis et al. 1999; Ramanathan et al. 2014).

Prueba de ello es un **estudio de meta-análisis** realizado a partir de manuscritos publicados en los últimos 10 años, el cual demuestra la baja capacidad que presentan los nanotransportadores actuales para llegar al tumor. En este estudio, realizado por Wilhelm et al. 2016, se llevó a cabo el análisis del porcentaje de nanotransportador administrado que conseguía llegar al tumor, definido como la eficiencia de liberación del nanotransportador. Para ello, se analizaron un total de 117 manuscritos y, como resultado, se estimó que solamente el 0,7% de los nanotransportadores administrados se acumulaban en el tumor. La consecuencia directa de esta estimación es la imposibilidad de realizar una correcta traslación a clínica de los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*. Así, se estima que para conseguir obtener una dosis efectiva en la región del tumor similar a la obtenida en el ensayo *in vivo*, sería necesaria una administración sistémica de 100-200 mL de nanoformulación por dosis en cada paciente. Estas cifras imposibilitan la traslación debido a problemas derivados de la dificultad del escalado de la síntesis, el coste prohibitivo del tratamiento por la alta cantidad de nanotransportador necesaria por dosis, así como una limitación técnica provocada por el alto volumen de inyección que puede comprometer o afectar a la estabilidad coloidal del nanotransportador. Por todo ello, es necesario el diseño de vías alternativas que incrementen la eficiencia de liberación del transportador. De esta manera, si se consiguiera incrementar dicha eficiencia de 1% al 10%, el volumen de inyección comentado en el ejemplo anterior disminuiría de 100 a 10 mL (Wilhelm et al. 2016).

No obstante, si las cifras estimadas en el estudio se analizan en términos relativos, se observa que una eficiencia de liberación del 0.7% de una nanoplataforma es sustancialmente mayor que la eficiencia de liberación de la mayoría de las formulaciones convencionales que, a día de hoy, se utilizan en clínica incluyendo docetaxel, paclitaxel

y doxorubicina (Cui et al. 2016; Peer and Margalit 2004; Rosenblum et al. 2018; Shi et al. 2011; van Vlerken et al. 2008). Por ejemplo, en un estudio pre-clínico realizado por van Vlerken et al. 2008, se observó una eficiencia de liberación del 0.6% en las nanoformulaciones de paclitaxel en comparación en 0.2% obtenido usando el fármaco libre.

Todo ello demuestra la clara ventaja y los beneficios que el uso de nanotransportadores conlleva en comparación con la administración libre de fármacos y que justifica su impacto en la investigación de las últimas décadas. Sin embargo, es necesaria la investigación y el desarrollo de mecanismos alternativos que impliquen el uso de nuevos materiales con el objetivo de mejorar la eficiencia de liberación en términos absolutos para maximizar su beneficio terapéutico.

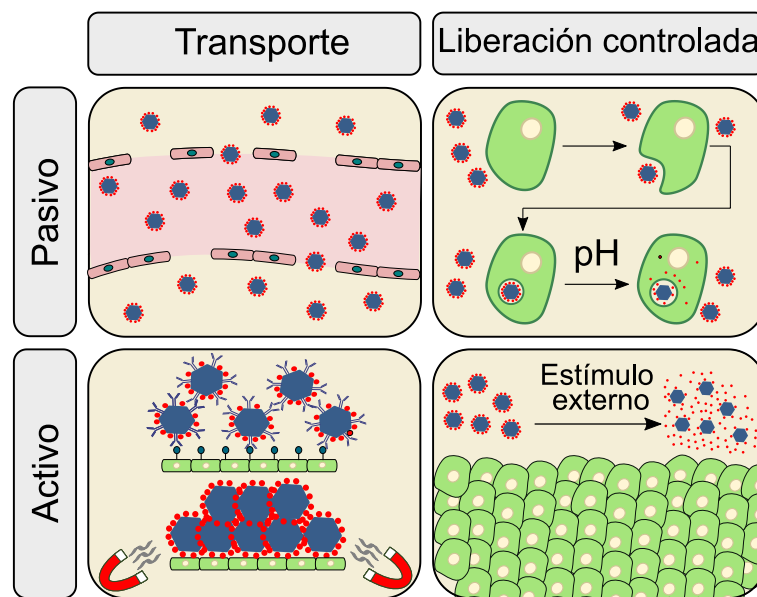
### 2.2.3. Alternativa: Nanopartículas magnéticas

Ante la necesidad de desarrollo de alternativas para mejorar la eficiencia de liberación de los nanotransportadores, los nanosistemas de administración de fármacos que se activan en respuesta a estímulos internos o externos para liberar el fármaco y/o para alcanzar el sitio diana, así como aquéllos que presentan moléculas que reconocen de manera específica el tejido diana, se han posicionado como unos potenciales candidatos para conseguir tal fin.

En este punto, es necesaria la definición de dos conceptos clave: **orientación/transporte localizado** (en inglés *targeting*) y **liberación controlada** (en inglés *triggering*). La orientación o transporte localizado se refiere al uso de estrategias para dirigir un nanotransportador a una ubicación específica y, en la mayoría de los casos, permanezca localizado en dicha ubicación. Por otro lado, la liberación controlada se refiere al uso de estímulos para desencadenar la liberación del fármaco del nanotransportador. Estos dos conceptos se suelen definir como pasivos o activos (Figura 11). Por lo general, pasivo se refiere al proceso que es estimulado por una propiedad intrínseca del tejido diana, como puede ser el transporte localizado pasivo provocado por el efecto EPR o, la liberación pasiva de fármacos por cambios de pH. Por el contrario, activo se refiere al proceso en el cual se hace uso de una característica intrínseca del nanotransportador para, tras la aplicación de una energía externa, se produzca bien el transporte localizado o la liberación del fármaco. Además, en el concepto de transporte

activo también se incluyen aquellas nanoplataformas que utilizan ligandos para unirse específicamente a un tejido (Wang and Kohane 2017).

El uso de nanotransportadores que respondan a estímulos, especialmente aquéllos que responden a estímulos externos y/o reconozcan de manera específica al tejido/órgano deseado, permitiría sobrepasar aquellas limitaciones presentes en los nanotransportadores convencionales y aprobados clínicamente hasta la fecha. *A priori*, la posibilidad de controlar de manera espacio/temporal la localización del nanotransportador y la liberación de fármaco, permitiría disminuir la toxicidad no específica y aumentar la eficacia terapéutica de la nanoformulación, como consecuencia del incremento de la concentración de agente terapéutico en el lugar de la enfermedad, consiguiendo así el objetivo último todavía no alcanzado por parte de la nanomedicina: el tratamiento local de enfermedades localizadas.



**Figura 11.** Representación gráfica de los procesos de orientación/transporte localizado (pasivo y activo) y de los procesos de liberación controlada de fármacos (pasivo y activo). Imagen adaptada y modificada de Wang and Kohane 2017.

Dentro de todos los materiales que se están evaluando en esta vía alternativa para el desarrollo de nanoformulaciones con nuevas funcionalidades para su uso como nanotransportadores de fármacos, las nanopartículas magnéticas, en especial, las **nanopartículas de magnetita biomiméticas, han despertado un gran interés en los**



**últimos años debido a sus propiedades magnéticas, químicas y biológicas únicas** (véase *apartado 1.3.*).

En relación al diseño racional de estas nanopartículas, su tamaño, forma y carga superficial, junto con sus propiedades magnéticas, posibilitan superar las barreras biológicas descritas en el *apartado 2.2.1.1.* Respecto al tamaño, sus dimensiones (< 50 nm) les permiten reducir los procesos de opsonización y secuestro por parte del sistema MPS, así como son lo suficientemente grandes para escapar del aclaramiento renal. Un ejemplo de cómo existe una relación inversa entre la vida media en sangre de las nanopartículas magnéticas y su tamaño (Chouly et al. 1996), es el análisis del tiempo de vida media en sangre de dos fármacos aprobados para su uso clínico consistentes en nanopartículas magnéticas recubiertas con el polímero dextrano (Ferumoxide de 80-150 nm y Ferumoxtran-10 de 20-40 nm). En este estudio, se demostró que el mayor tamaño del fármaco Ferumoxide daba lugar a un rápido aclaramiento sistémico teniendo una corta vida media (8-30 min), mientras que el fármaco Ferumoxtran-10 mostró un significativo incremento de la vida media en sangre (25-30 horas) (Bourrinet et al. 2006; Majumdar et al. 1990; Varallyay et al. 2002). Por otro lado, la carga superficial de estas nanopartículas magnéticas (neutra en el caso de las MNPs y negativa en el caso de las BMNPs) da lugar a una menor interacción con las proteínas del plasma, disminuyendo el aclaramiento sistémico y la distribución no específica (Aillon et al. 2009; Alexis et al. 2008; Corot et al. 2006; Weissleder et al. 1995). Además, se ha observado que las nanopartículas magnéticas con carga negativa interaccionan eficientemente con las células y son internalizadas mediante endocitosis (Wilhelm et al. 2002). Por último, sus propiedades magnéticas (superparamagnetismo) les permiten responder de manera eficiente a un campo magnético alterno sin alterar la estabilidad coloidal de la suspensión durante su almacenamiento o tras la inyección intravenosa (Neuberger et al. 2005). Así, en ausencia de campo magnético externo, las nanopartículas magnéticas no muestran interacción magnética evitando la aglomeración (Corot et al. 2006).

En relación a las propiedades biológicas (biocompatibilidad y toxicidad), la biocompatibilidad de un nanotransportador está determinada tanto por la respuesta inmune que genera tras su administración sistémica, como por la toxicidad intrínseca de la nanoplataforma y/o de los metabolitos resultantes de su biodegradación (Reddy et al. 2012). De los diferentes tipos de nanotransportadores analizados, se ha puesto de manifiesto que las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro no generan una respuesta

de anticuerpos y, lo más interesante, se internalizan en los macrófagos a través de los receptores *scavenger* (von zur Muhlen et al. 2007). Esta vía es la ruta clásica utilizada para eliminar las células apoptóticas, la cual no está acompañada por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, poniendo de manifiesto el bajo carácter inmunoestimulador y la baja toxicidad de este tipo de nanotransportador (Aderem and Underhill 1999). Relacionado con la toxicidad y biodegradabilidad, las nanopartículas magnéticas, una vez llegan al sitio destino, son internalizadas en las células mediante endocitosis, y son metabolizadas en los lisosomas dadas las condiciones de bajo pH, la presencia de enzimas hidrolíticas, así como de proteínas que participan en el metabolismo de hierro (Klausner et al. 1993). Una de las ventajas que ofrecen las nanopartículas magnéticas es que el hierro resultante de la biodegradación es posteriormente metabolizado e incorporado a las reservas de hierro del propio cuerpo para después, gradualmente, formar parte de la hemoglobina y transferrina y/o ser eliminado lentamente a través de la vía fecal (Elias and Tsourkas 2009; Schulze et al. 1995; Singh et al. 2010). Así, diferentes ensayos clínicos han demostrado que, una vez realizada la administración intravenosa de las nanopartículas de hierro, se observa una elevación transitoria de los niveles séricos de hierro sin ningún síntoma tóxico. Además, en estos mismos ensayos clínicos, se aplicó y evaluó el efecto de la aplicación de un campo magnético en la superficie de la piel, donde sólo se observó una ligera decoloración transitoria sin ningún otro evento toxicológico (Lemke et al. 2004; Lübbe et al. 1996).

En relación a las barreras tecnológicas, uno de los inconvenientes que comprometía la traslación clínica de los nanotransportadores eran los tediosos procedimientos de síntesis, la falta de reproducibilidad entre lotes y la imposibilidad del escalado de los mismos. En el caso de las nanopartículas magnéticas biomiméticas, éstas presentan un proceso de producción sencillo y reproducible, siendo posible la optimización del proceso de escalado de su síntesis de una manera simple y económica (objeto de estudio en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral). Por otro lado, en relación a la funcionalización de las nanopartículas con el agente terapéutico, en el caso de las nanopartículas biomiméticas, la presencia *per sé* de grupos funcionales en su superficie posibilita un proceso de funcionalización sencillo, económico y fácilmente escalable (García Rubia et al. 2018).

En conclusión, el diseño racional de estas nanopartículas magnéticas, junto con la facilidad de síntesis y funcionalización, hacen de estas nanopartículas un prometedor

nanotransportador capaz de responder a estímulos (Nuzhina et al. 2019). En este contexto, sus propiedades permiten que, una vez inyectados, sigan los siguientes pasos (Reddy et al. 2012): (i) sean guiadas y concentradas magnéticamente hasta el lugar deseado; (ii) sean inmovilizadas magnéticamente en dicho lugar mientras tiene lugar la liberación del fármaco, minimizando así los efectos adversos relacionados con la distribución inespecífica; (iii) y, finalmente, son metabolizadas y/o eliminadas del cuerpo. Además, dichas propiedades también permiten el uso de otras aplicaciones terapéuticas en el lugar deseado, como el tratamiento de hipertermia a través de la aplicación de un campo magnético alterno.

A continuación, se describirán las principales aplicaciones de las nanopartículas de magnetita en nanomedicina para uso como nanotransportadores en el tratamiento local de enfermedades localizadas, y que serán objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral.

#### 2.2.3.1. *Transporte activo*

El **transporte activo** se desarrolló como una estrategia complementaria al transporte pasivo de los nanotransportadores, con el objetivo de mejorar la localización del nanotransportador en el lugar deseado al aumentar su eficiencia de localización, así como la retención en el sitio diana (Bertrand et al. 2014; Farokhzad and Langer 2009; Shi et al. 2011). Tal y como se ha definido anteriormente, el transporte activo consiste en el uso de estrategias para enviar a un nanotransportador a una ubicación específica y, en la mayoría de los casos, permanezca localizado en dicha ubicación. En el caso de las nanopartículas magnéticas, se pueden aplicar dos estrategias de transporte activo: (i) **el uso de ligandos**, moléculas que reconocen específicamente receptores expresados en las células presentes en el sitio diana, como pueden ser receptores específicos de las células tumorales; y (ii) **la aplicación de un campo magnético externo** para dirigir de manera externa los nanotransportadores al lugar deseado y retenerlos en el sitio diana.

En relación a la primera estrategia, **la presencia de ligandos “decorando” la superficie** del nanotransportador permite que dichos nanotransportadores se unan activamente y de manera específica a las células una vez se ha producido la extravasación. En algunas ocasiones, dependiendo del tipo de ligando, la presencia de estos ligandos incrementa la captación celular del nanotransportador debido a que las interacciones ligando-receptor desencadenan la internalización mediada por receptores de toda la nanoformulación de la misma manera que se produciría en presencia única de ligando

(Allen 2002; Pastan et al. 2006; Peer et al. 2007b). Por el contrario, existen otros tipos de ligandos que reconocen receptores que no median en la internalización. En este caso, el uso de este tipo de ligandos puede ser ventajoso en el caso de tumores sólidos debido al conocido efecto espectador, en el cual las células que carecen del receptor pueden ser destruidas a través de la liberación del fármaco en la superficie de las células vecinas que sí lo expresan (Allen 1994).

Además, esta estrategia resulta clave cuando la acumulación en sitio diana no depende del efecto EPR (Howard et al. 2014) o cuando el nanotransportador requiere la realización de transcitosis activa de barreras fisiológicas para llegar al sitio diana, como es el caso de la mucosa intestinal o la barrera hematoencefálica (Cheng et al. 2014; Pridgen et al. 2013; Zhu et al. 2016). En cualquier caso, siempre que se utilice el transporte activo mediado por ligandos es necesario que el agente de reconocimiento, el ligando, presente una alta selectividad por la molécula de reconocimiento, así como que dicha molécula se exprese de manera única en el sitio diana (Peer et al. 2007a). Entre los diferentes ligandos encontramos: anticuerpos monoclonales, péptidos, transferrina, ácido fólico, aptámeros, así como ciertos restos de azúcar (Sawant and Torchilin 2012; Trapani et al. 2012).

Los anticuerpos monoclonales (mAb del inglés *monoclonal antibody*) fueron los primeros ligandos utilizados para el transporte activo de nanotransportadores (Bazak et al. 2015). Dichos ligandos son producidos por las células B y presentan una alta selectividad y afinidad de unión, condicionada por la presencia de dos sitios de unión a epítomos en una sola molécula (Peer et al. 2007a). Desde el descubrimiento de la técnica del hibridoma para la obtención de grandes cantidades de anticuerpos monoclonales puros (Köhler and Milstein 1975), se ha producido un gran desarrollo en el uso de estos ligandos como agentes de direccionamiento. El mAb murino Muromonab CD3 (*OrthoClone OKT3*), constituyó el primer mAb aprobado para uso clínico por la FDA en 1986 (Ecker et al. 2015). Posteriormente, se produjo la aprobación de otros mAb como Rituximab (*Rituxan*) en 1997 o Trastuzumab (*Herceptin*) en 1998 para el tratamiento de linfoma no *Hodgkin* (James and Dubs 1997) y el tratamiento de cáncer de mama (Albanell and Baselga 1999), respectivamente. A día de hoy, hay al menos 570 anticuerpos monoclonales que están siendo estudiados en ensayos clínicos y alrededor de 79 mAb han sido aprobados por la FDA para su uso clínico (Lu et al. 2020).

Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN de cadena sencilla que presentan afinidad y especificidad mediante interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, así como mediante enlaces de hidrógeno (Torchilin 2014). Los aptámeros son capaces de unirse de manera específica a numerosos tipos de moléculas como proteínas intracelulares, proteínas transmembrana o carbohidratos (Peer et al. 2007a). Algunos de ellos han sido diseñados para unirse específicamente a los receptores presentes en células cancerígenas, como es el caso de las nanopartículas que encapsulan docetaxel y que presentan la superficie modificada por aptámeros que reconocen un antígeno expresado en la superficie de las células del cáncer de próstata (Farokhzad et al. 2006). Otra estrategia interesante consiste en el uso de ligandos los cuales se encuentran de manera natural (en forma libre) en la circulación como puede ser el ácido fólico, la transferrina o ciertos péptidos. El ácido fólico se está utilizando como ligando dada la facilidad de funcionalización al nanotransportador, su alta afinidad por los receptores de folato (FRs) y la baja expresión de estos receptores en células sanas en comparación con su expresión en células tumorales o que median enfermedades inflamatorias (Antony 1992; Low et al. 2008). En el caso de la transferrina, la alta expresión del receptor de la transferrina (TfR) en células tumorales a consecuencia del incremento de la demanda de hierro, ha condicionado su uso para el transporte activo en terapia antitumoral (Prost et al. 1998; Torchilin 2014). En ambos casos, la unión del ligando a su receptor desencadena la internalización celular vía endocitosis mediada por receptores, mejorando así el suministro intracelular del agente terapéutico y, por lo tanto, el resultado terapéutico.

Entre los receptores más estudiados para su aplicación en el transporte activo mediado por ligandos destacan el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), el receptor de transferrina (TfR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) (Bazak et al. 2015). Por otro lado, en los últimos años ha despertado el interés por la vasculatura anómala desarrollada en la enfermedad para su uso como blanco, destacando el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), las metaloproteinasas de matriz (MMP), así como las integrinas (Byrne et al. 2008; Li et al. 2008; Wicki et al. 2012).

Sin embargo, a pesar de sus numerosas ventajas, desde que se introdujo el concepto de transporte activo mediado por ligandos hace 40 años (Heath et al. 1980; Leserman et al. 1980), sólo unos pocos ejemplos han conseguido llegar a la evaluación

clínica (Tabla 2): liposomas funcionalizados con ligandos que reconocen el receptor HER2 (MM-302) (Espelin et al. 2016), nanopartículas poliméricas (BIND-104) (Hrkach et al. 2012) o nanoformulaciones para la liberación controlada de siRNA (CALAA-01) (Davis et al. 2010). Este hecho está condicionado por la mayor complejidad de diseño y escalado de la producción de estas nanoplataformas en comparación con aquellas que utilizan el transporte pasivo (Rosenblum et al. 2018), así como por la necesidad de un mayor conocimiento sobre cómo la presencia del ligando en la superficie del receptor condiciona la llegada del nanotransportador al sitio diana ya que, por ejemplo, se ha demostrado que, para un mismo objetivo, la presencia de mAb de alta afinidad en la nanoformulación condiciona una menor penetración en comparación con aquellas nanoformulaciones funcionalizadas con mAb que presentaban menor afinidad (Jain and Stylianopoulos 2010; Rudnick et al. 2011).

**Tabla 2.** Formulaciones que incluyen el transporte activo mediado por ligandos y que están siendo evaluadas en clínica.

Nombre	Formulación	Aplicación	Identificador*
ND-L02-s0201 ( <i>Nitto Denko</i> )	Lípido de siRNA conjugado con la vitamina A	Fibrosis hepática	NCT02227459 (Fase I)
BIND-014 ( <i>BIND Therapeutics</i> )	Nanopartícula de PLGA con docetaxel que reconoce PSMA	Cáncer de próstata, cervical metastásico, de cabeza o cuello	NCT02479178 (Fase II) NCT02283320 (Fase II) NCT01812746 (Fase II) NCT01792479 (Fase II) NCT01300533 (Fase I)
MM-302 ( <i>Merrimack Pharmaceuticals</i> )	Liposoma con doxorubicina que reconoce HER2	Cáncer de mama	NCT01304797 (Fase I) NCT02213744 (Fase III)
SGT-53 ( <i>SynerGene Therapeutics</i> )	Liposoma catiónico con anticuerpo para el receptor anti-transferrina	Glioblastoma, tumores sólidos o cáncer de páncreas	NCT02354547 (Fase I) NCT00470613 (Fase I) NCT02354547 (Fase I) NCT02340156 (Fase II)
SGT-94 ( <i>SynerGene Therapeutics</i> )	Liposoma que contiene el plásmido RB94 con anticuerpo para el receptor anti-transferrina	Tumores sólidos	NCT01517464 (Fase I)

\*Identificadores en *ClinicalTrials.gov*.

En relación a la segunda estrategia, la **orientación magnética**, ésta implica el uso de las propiedades magnéticas intrínsecas de las nanopartículas magnéticas (véase *apartado 1.1.2.*) para, una vez inyectadas, realizar su transporte activo a través del sistema vascular y, posteriormente, mantenerlas concentradas en un lugar específico mediante la aplicación de un campo magnético externo mientras tiene lugar la liberación del agente terapéutico. Como resultado, la aplicación de esta metodología supone un incremento de la concentración del agente terapéutico en el sitio diana (Dobson 2006), así como limita su disponibilidad sistémica (Saiyed et al. 2003).

Esta estrategia fue ideada en 1960 por Freeman et al. 1960 (Freeman et al. 1960). Sin embargo, dicha idea no se aplicó en el transporte de fármacos hasta finales de la década de los 70, cuando Widder et al. 1978 desarrollaron microesferas de albúmina que encapsulaban el agente quimioterápico adriamicina (doxorrubicina) y un núcleo magnético de magnetita (Mosbach and Schröder 1979; Senyei et al. 1978; Widder et al. 1978). Desde entonces, el uso de nanopartículas magnéticas como nanotransportadores de fármacos se ha convertido en un campo de investigación activo y atractivo, especialmente en la última década, debido a que dicho concepto ha demostrado un gran potencial en la terapia experimental de enfermedades localizadas debido a una mayor acumulación del fármaco en el lugar deseado (Mura et al. 2013). Así, por ejemplo, en el estudio realizado por Foy et al. 2010, se observó una mayor acumulación de nanopartículas magnéticas (administradas sistémicamente) tras la corta exposición (1 hora) de un tumor murino a un campo magnético externo. Al igual que éste, son numerosos los estudios que demuestran el potencial y la eficacia de la orientación magnética para aumentar la localización de los nanotransportadores magnéticos en el sitio diana (Alexiou et al. 2000; Arias et al. 2011b; Cole et al. 2011b, 2011a; Oltolina et al. 2020; Yang et al. 2012). Sin embargo, a pesar de sus ventajas, el potencial de la orientación magnética se encuentra, a día de hoy, limitada por los gradientes magnéticos, es decir, por la distancia existente entre los imanes y el sitio diana (Schleich et al. 2015). Para realizar la orientación magnética de manera correcta y evitar que las nanopartículas sean eliminadas rápidamente del tejido, el gradiente magnético deber ser mayor que el flujo sanguíneo hidrodinámico encontrado en arterias ( $> 10$  cm/s) y capilares (0.05 – 0.1 cm/s) (Reddy et al. 2012). Por otro lado, se ha determinado que la inmovilización magnética de las nanopartículas también está condicionada por el tamaño (Arias et al. 2001; Dobson 2006; Durán et al. 2008). De esta manera, se ha estimado que es necesaria

la inducción de un campo magnético de  $> 1$  T para conseguir la inmovilización eficiente de las nanopartículas contra las fuerzas brownianas e hidrodinámicas que actúan en el flujo sanguíneo (Senyei et al. 1978). Dado que los gradientes magnéticos disminuyen a medida que se incrementa la distancia con la fuente magnética, esta aplicación está limitada al tratamiento de enfermedades localizadas superficialmente (Alexiou et al. 2000; Laurent and Mahmoudi 2011). Sin embargo, se están investigando diferentes estrategias para superar dicha limitación. Actualmente, la FDA ha establecido que el uso de imanes que induzcan campos hasta 8 T no supone ningún riesgo fisiológico para adultos. Así, se ha propuesto el uso de dispositivos externos con electroimanes o imanes permanentes de neodimio hierro (Nd-Fe), los cuales pueden aplicar un campo de 1 T con una profundidad hasta 10-15 cm para la localización magnética en sitios diana superficiales o, en el caso de profundidades mayores, se ha propuesto la implantación interna de imanes mediante cirugía mínimamente invasiva para conseguir dicha localización magnética (Arruebo et al. 2007; Durán et al. 2008; Polyak et al. 2008).

#### 2.2.3.2. *Hipertermia magnética*

El concepto de **hipertermia magnética** se desarrolló en el año 1957, cuando Gilchrist et al. 1957 usó nanopartículas magnéticas para calentar selectivamente tumores linfáticos en presencia de un campo magnético alterno (AMF del inglés *Alternating Magnetic Field*). Desde entonces y, apoyado por el auge y desarrollo de la nanotecnología, la introducción de nanopartículas magnéticas ha supuesto una revolución en este campo (Blanco-Andujar et al. 2018). La ventaja más significativa del uso de nanopartículas magnéticas en la hipertermia reside en la capacidad de penetración en el lugar deseado y la destrucción selectiva de las células dañadas sin afectar a los tejidos sanos circundantes (Ho et al. 2011; Kumar and Mohammad 2011; Shubayev et al. 2009; Yoo et al. 2011). De alguna manera, el uso de las nanopartículas magnéticas permite realizar el tratamiento a nivel celular debido a su capacidad de localización en la zona deseada (ya sea transporte activo mediado por ligandos o mediante orientación magnética) (Jordan et al. 1999b). Además, presentan la capacidad de generar un calor local y homogéneo que conduce a una mayor selectividad y efectividad del tratamiento. Todas estas ventajas terapéuticas han permitido la traslación a clínica de la hipertermia magnética, especialmente para el tratamiento de tumores. Actualmente, existen numerosos ensayos clínicos de hipertermia magnética para el tratamiento de glioblastoma, cáncer de próstata o de páncreas (Espinosa et al. 2018). Un buen ejemplo

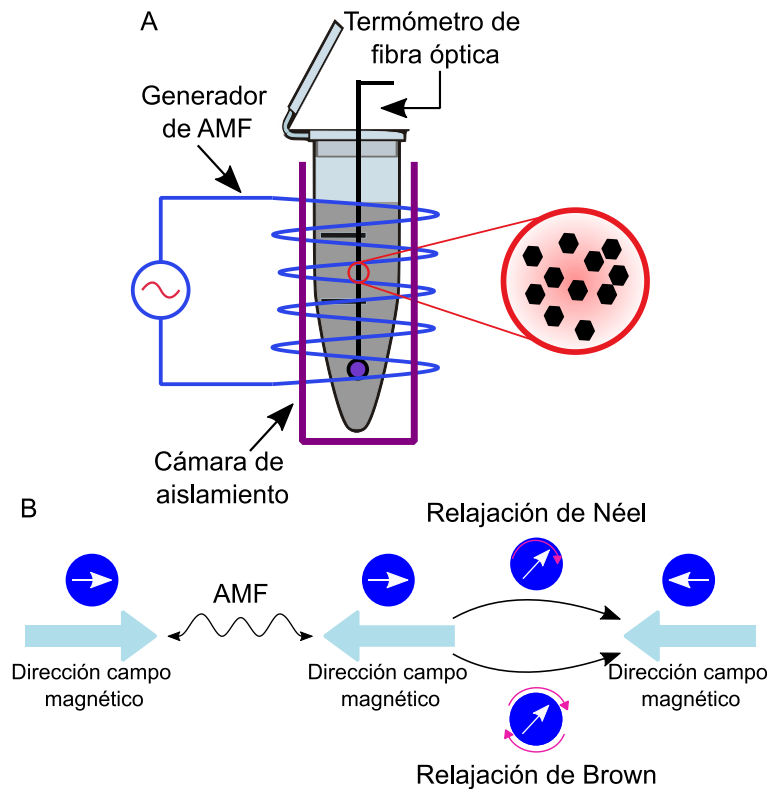


de su eficacia, es el producto aprobado por la EMA MagForce (véase *apartado 2.2.3.4.*). Sin embargo, a pesar de los avances realizados hasta la fecha, se requiere todavía un conocimiento más profundo para sacar el máximo partido de esta aplicación en el tratamiento local de enfermedades.

El significado etimológico de la palabra hipertermia es la generación de calor. Su enfoque clínico implica la elevación local de la temperatura en la zona deseada a tratar, lo que resulta en un cambio en la fisiología de las células dañadas que, finalmente, conducen a la necrosis o apoptosis (Hildebrandt et al. 2002; Ho et al. 2011; Kumar and Mohammad 2011). Dependiendo del grado de aumento de la temperatura, el tratamiento de hipertermia se puede clasificar en diferentes tipos: (i) la ablación térmica, la cual implica el uso de altas temperaturas  $> 46\text{ }^{\circ}\text{C}$  (hasta  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) que conducen a la necrosis, coagulación o carbonización de la zona tratada; (ii) hipertermia moderada que utiliza temperaturas comprendidas entre  $41\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; y (iii) la diatermia que utiliza temperaturas bajas ( $< 41\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para el tratamiento del dolor de algunas enfermedades reumáticas. De las tres, la hipertermia moderada (la cual, tradicionalmente, se conoce como tratamiento de hipertermia) es la más utilizada. La aplicación de temperaturas entre  $41\text{ }^{\circ}\text{C}$  -  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$  conlleva un estrés celular térmico que resulta en la activación de numerosos mecanismos de degradación intra y extracelular produciendo un daño celular irreversible (Goldstein et al. 2003). En resumen, la efectividad de un tratamiento de hipertermia magnética depende en gran medida de las temperaturas generadas, la duración de la exposición y las características de las células tratadas.

Otro aspecto importante en el uso de la hipertermia magnética y que condiciona su aplicación clínica, es la capacidad de las nanopartículas para generar calor en el sitio diana sin afectar a los tejidos normales circundantes. Existe una limitación estricta en las características del AMF aplicado, donde  $H$  (intensidad del campo magnético)  $\cdot f$  (frecuencia)  $< 5 \cdot 10^9$  (Jordan et al. 1999a). Con esta limitación en el AMF, la eficacia terapéutica de la hipertermia magnética va a estar condicionada por la eficiencia de conversión térmica de las nanopartículas magnéticas. En el tratamiento de hipertermia magnética, las nanopartículas son nanomediadores magnéticos que ejecutan la conversión de ondas electromagnéticas en energía térmica, por lo que van a constituir los elementos clave para la mejora de la eficacia terapéutica este tratamiento. La capacidad de calentamiento inductivo de las nanopartículas cuando se someten a un AMF está

condicionada por numerosos factores como el efecto de histéresis, el efecto de relajación o la corriente de Eddy (Blanco-Andujar et al. 2016).



**Figura 12.** Hipertermia magnética. (A) Esquema de la medida de la eficiencia de calentamiento magnético de las nanopartículas magnéticas mediante el método calorimétrico. (B) Representación gráfica de los mecanismos de relajación de Néel y Brown. Imagen adaptada y modificada de Liu et al. 2020.

La pérdida magnética de las nanopartículas se define como la cantidad de la energía de AMF convertida en calor durante la reversión de la magnetización. Los mecanismos mediante los cuales se produce dicha producción de calor son la relajación (Néel y Brown) y la pérdida de histéresis. La cantidad de calor producido por las nanopartículas es aproximadamente igual al área de su ciclo de histéresis durante un ciclo de campo magnético (Carrey et al. 2011). Así, se produce la disipación del calor como consecuencia de la pérdida de histéresis, la cual está condicionada por cómo la magnetización sigue los cambios del AMF. El otro mecanismo de disipación de calor proviene de la pérdida de la energía producida para superar la barrera de la energía rotacional en presencia de un AMF (Carrey et al. 2011; Hergt and Dutz 2007; Rosensweig 2002), conocida como relajación (Figura 12B). En el caso de la relajación de Néel, la

generación de calor se produce debido a cambios rápidos en la dirección de los momentos magnéticos en relación con la red cristalina (dinámica interna). En este caso, la rotación se ve obstaculizada por la energía de anisotropía, la cual tiende a orientar el dominio magnético con la red cristalina. En el caso de la relajación de Brown, ésta se debe a la rotación física de la nanopartícula en el medio en el que se encuentran (dinámica externa), la cual se ve obstaculizada por la viscosidad del medio que tiende a contrarrestar el movimiento de las nanopartículas (Jeyadevan 2010). Los mecanismos para superar estas barreras conducen a una pérdida de energía electromagnética y, por tanto, a la producción de energía térmica. Se ha demostrado que la capacidad de conversión está estrictamente condicionada por el comportamiento magnético y el tamaño de las nanopartículas (Fortin et al. 2007; Hergt and Dutz 2007; Jun et al. 2007; Rosensweig 2002; Yoo et al. 2011). Así, en el caso de las nanopartículas superparamagnéticas y/o de dominio único magnético, el principal mecanismo de producción de calor es la relajación de Néel y Brown (rotaciones de magnetización), mientras que el caso de nanopartículas magnéticas multidominio, el mecanismo principal es la pérdida por histéresis (Liu et al. 2020).

En relación a la evaluación de la eficiencia de calentamiento magnético, la capacidad de calentamiento de las nanopartículas se evalúa principalmente a través de un enfoque calorimétrico (Abenojar et al. 2016). Los dispositivos utilizados para ello constan de 4 componentes principales (Fortin et al. 2007; Hilger et al. 2002; Liu et al. 2012): (i) un generador del AMF; (ii) una cámara de aislamiento para el material; (iii) sensores de temperatura; y (iv) un sistema de adquisición de datos. De esta manera, durante el procedimiento de medida, el aumento de la temperatura se observa a través de una sonda de temperatura de fibra óptica a la vez que se aplica un AMF, el cual se genera mediante un sistema de inducción de campo magnético con bobina enfriada por agua y vinculado a un generador de radiofrecuencia (Figura 12A).

Generalmente, la eficacia de calentamiento se suele evaluar a través de la tasa de absorción de calor específica (SAR del inglés *Specific Absorption Rate*, W/g), basada en la pendiente inicial de la curva de temperatura dependiente del tiempo, utilizando la siguiente ecuación (Kozissnik et al. 2013; Shah et al. 2015):

$$SAR = \left( \frac{C \cdot V_s}{m} \right) \frac{dT}{dt} \quad (2)$$

donde  $C$  es la capacidad calorífica de la suspensión ( $C_{H_2O} = 4185 \text{ J/g/K}$ ),  $V_S$  es el volumen de la muestra,  $m$  es la masa de sólido magnético en la muestra (en gramos) y  $dT/dt$  es la pendiente inicial de la curva de la temperatura dependiente del tiempo.

Además, también se puede calcular la pérdida de potencia intrínseca (ILP del inglés *Intrinsic Loss Power*,  $\text{nHm}^2/\text{kg}$ ), la cual se obtiene normalizando el valor del SAR con respecto a las características del campo aplicado utilizando la siguiente ecuación:

$$ILP = \frac{SAR}{fH_0^2} \quad (3)$$

donde  $H_0$  es la intensidad del campo magnético expresado en  $\text{kA/m}$  y  $f$  la frecuencia expresada en  $\text{kHz}$ . El ILP es un parámetro recientemente introducido que, dado que es independiente de las características del campo magnético aplicado, permite realizar una comparación directa de la eficiencia de calentamiento de nanopartículas medidas bajo diferentes campos magnéticos (Kallumadil et al. 2009).

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto una nueva funcionalidad de la hipertermia magnética alternativa al conocido y bien caracterizado efecto del incremento macroscópico de la temperatura. Algunos trabajos recientes han sugerido que el calor generado por una sola nanopartícula magnética podría estar localizado en los alrededores de dicha nanopartícula con un alcance nanométrico (Cazares-Cortes et al. 2019). Este calor inducido a escala nanométrica, definido como “local-termia”, se podría utilizar como un mecanismo alternativo para regular y/o alterar la función de algunos componentes celulares contribuyendo así a la muerte celular (Huang et al. 2010; Stanley et al. 2012). Esta capacidad, junto con la posibilidad de dirigir a las nanopartículas mediante transporte activo a localizaciones sub-celulares específicas, hace posible una destrucción selectiva intracelular de objetivos. Uno de estos objetivos podrían ser los lisosomas, donde un incremento local de la temperatura podría inducir la muerte celular a través de la vía de la muerte lisosómica. Así, por ejemplo, Creixell et al. 2011 demostraron que nanopartículas magnéticas funcionalizadas para unirse activamente a EGFR, en presencia de un AMF, inducían un calor local capaz de matar a las células cancerígenas que expresaban dicho receptor sin detectar ningún aumento macroscópico de la temperatura. Posteriormente, en el estudio realizado por Domenech et al. 2013, se demostró que dichas nanopartículas se acumulaban en los lisosomas y, tras la aplicación de un AMF, se producía una reducción en la viabilidad celular relacionada con un

incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *Reactive Oxygen Species*) (Domenech et al. 2013; Sola-Leyva et al. 2020). Al igual que en el experimento anterior, la temperatura se mantuvo a 37 °C. En ambos casos, se postuló que la muerte celular se habría producido como consecuencia del incremento local de la temperatura producido por las nanopartículas magnéticas que habría supuesto un incremento en la producción de ROS a través de la reacción de Fenton en los lisosomas (Clerc et al. 2018).

Los resultados preliminares obtenidos hasta la fecha ponen de manifiesto que este calor inducido a escala nanométrica presenta una serie de ventajas únicas para la regulación de procesos biológicos: (i) es direccional, eficiente y seguro, ya que solo puede afectar a moléculas que se encuentren a una distancia máxima de ~ 10 nm de la nanopartícula; (ii) la producción de calor localizado es instantáneo y se puede utilizar como un “interruptor molecular” en el tratamiento de enfermedades. En consecuencia, el efecto biológico de esta inducción de calor localizado a nivel nanométrico se ha definido incluyendo las siguientes características: (i) no se produce un incremento de calor a nivel macroscópico; (ii) bajo el efecto de AMF las nanopartículas magnéticas pueden regular la interacción entre macromoléculas de manera específica o modificar microambientes como el microambiente tumoral para lograr la destrucción selectiva de células; y (iii) este nuevo tipo de calor puede lograr terapias extremadamente selectivas y específicas (Liu et al. 2020). Por todo ello, esta nueva funcionalidad podría suponer una alternativa muy interesante para la mejora del efecto terapéutico de la hipertermia magnética (Cazares-Cortes et al. 2019; Gordon et al. 1979; Jordan et al. 1999b; Sanz et al. 2017). Sin embargo, se trata de un campo de investigación reciente y es necesario un mayor desarrollo para comprender y regular los efectos biológicos que la inducción de calor local tiene en la muerte celular/sub-celular.

#### 2.2.3.3. *Liberación controlada mediante estímulos*

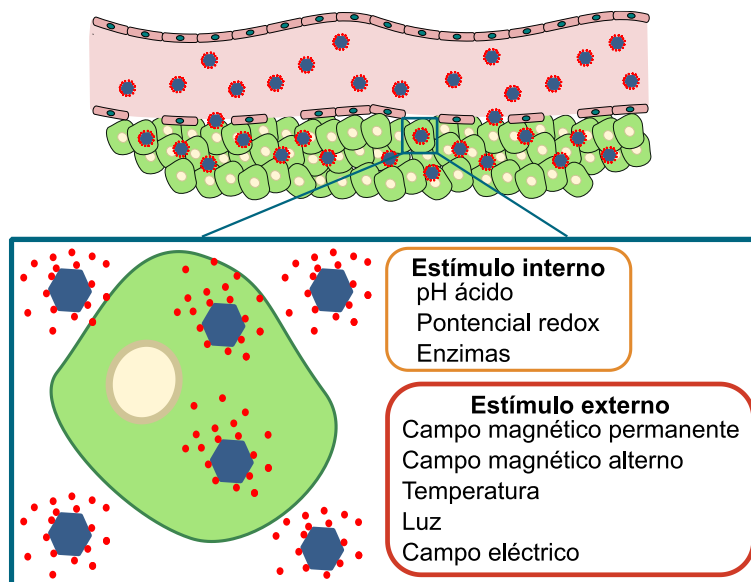
El uso de nanotransportadores capaces de **responder a estímulos** para controlar de manera espacio/temporal la liberación del agente terapéutico es un área de investigación importante y creciente dadas las ventajas derivadas de dicho control, mediante el cual se consigue una tasa basal de liberación del fármaco nula o muy baja durante el tiempo que el nanotransportador alcanza su diana o durante el tiempo que no esté activado, lo que disminuye la toxicidad no específica, así como se consigue un

incremento de la concentración del fármaco en el lugar deseado tras la activación de la liberación (Mura et al. 2013; Wang and Kohane 2017).

Los estímulos utilizados pueden ser internos o intrínsecos del tejido diana (liberación controlada pasiva) o estímulos externos (liberación controlada activa) (Figura 13).

En relación a los **estímulos internos**, se ha investigado el desarrollo de diferentes nanotransportadores que respondan a diferentes estímulos tales como cambios en el pH, temperatura, potencial redox o la concentración de determinados enzimas y/o analitos específicos. Entre todos ellos, han generado gran interés las nanopartículas que son capaces de aprovechar las variaciones de pH para controlar la administración de fármacos en órganos específicos (como el tracto gastrointestinal) o en determinados compartimentos intracelulares (como lisosomas o endosomas), así como aquéllas que son capaces de desencadenar la liberación del fármaco cuando se produce una alteración ambiental asociada con situaciones patológicas como el cáncer o la inflamación. Para ello, se han desarrollado dos estrategias principales (Mura et al. 2013): (i) el uso de nanopartículas que presentan grupos ionizables los cuales sufren cambios conformacionales y/o de solubilidad en respuesta a la variación ambiental del pH; y (ii) el uso de nanosistemas que presenten enlaces sensibles a ambientes ácidos cuya escisión dé lugar a la liberación de moléculas, la modificación de la carga del nanosistema o la exposición de ligandos activos. En el caso del cáncer, existe una gran cantidad de nanosistemas de administración que se están investigando para aprovechar la ligera diferencia de pH existente entre tejidos sanos ( $\text{pH} = 7,4$ ) y el entorno extracelular de tumores sólidos ( $5,8-7,2$ ). Esta diferencia de pH es consecuencia directa de la angiogénesis irregular que presentan los tumores de rápido crecimiento, lo que da lugar a un déficit rápido de nutrientes y oxígeno y, por tanto, un cambio hacia el metabolismo glucolítico. Todo ello, conduce a la producción de metabolitos ácidos en el intersticio tumoral. Para utilizar esta estrategia en la liberación de fármacos, las nanoformulaciones deben dar una respuesta aguda a un cambio sutil de pH en el microambiente tumoral extracelular (Deng et al. 2011; Min et al. 2010). En el caso de las infecciones bacterias, éstas se caracterizan generalmente por presentar un pH muy bajo como consecuencia de la fermentación anaerobia y la posterior inflamación. Un ejemplo de esta estrategia es el uso de un segmento de poli-histidina ionizable acoplado a nanosistemas de administración de antibióticos para incrementar la interacción y la absorción de la

nanofórmula en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Radovic-Moreno et al. 2012). A nivel celular, la acidificación de los endosomas (pH = 5-6) y su fusión con los lisosomas (pH = 4-5) es otro gradiente de pH que puede utilizarse como estrategia para la acumulación intracelular efectiva de fármacos.



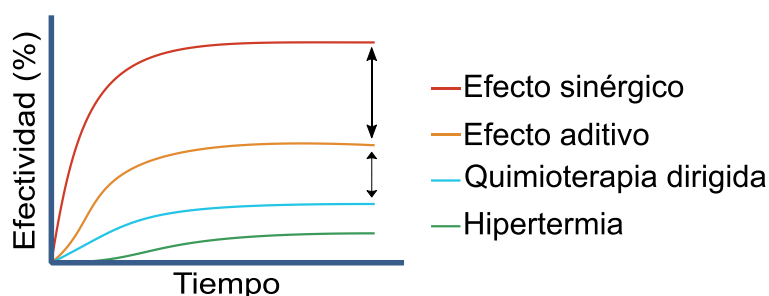
**Figura 13.** Esquema representativo de mecanismos de liberación controlada de fármacos mediante estímulos internos y externos. Imagen adaptada y modificada de Rosenblum et al. 2018.

En relación a los **estímulos externos**, en este caso, la estrategia se centra en el desarrollo de nanotransportadores con unas propiedades intrínsecas determinadas que les permita liberar el fármaco tras la aplicación de un estímulo externo, como pueden ser los cambios de temperatura, la aplicación de campos magnéticos, ultrasonidos, luz o campos eléctricos. En el caso de las nanopartículas magnéticas, dadas sus propiedades magnéticas intrínsecas, se puede utilizar el uso de campos magnéticos externos para controlar la liberación del fármaco. En el caso de campos magnéticos permanentes, curiosamente, se ha observado que su aplicación puede desencadenar la liberación controlada del fármaco. Por ejemplo, se ha observado que en micelas que encapsulan en su interior nanopartículas magnéticas y un fármaco hidrófobo, se desencadena la liberación de dicho fármaco cuando las nanopartículas magnéticas se acercan entre sí en respuesta al campo magnético y “exprimen” las micelas (Qin et al. 2009). En el caso de la aplicación de AMF (véase apartado 2.2.3.2.), la respuesta de las nanopartículas magnéticas, en combinación con otras propiedades físicas y/o químicas de los nanotransportadores, ofrecen una amplia

gama de mecanismos de activación para la liberación controlada del agente terapéutico. Así, por ejemplo, se están desarrollando polímeros y lípidos termosensibles para el recubrimiento de las nanopartículas magnéticas, los cuales desencadenan la liberación del fármaco de manera intermitente en respuesta a un aumento de la temperatura inducido magnéticamente (Huang et al. 2012; Katagiri et al. 2011). La aplicación del AMF también puede provocar la alternación estructural del nanotransportador como puede ser un aumento de la porosidad del recubrimiento polimérico o lipídico (Bringas et al. 2012; Hu et al. 2012), desintegración del núcleo de hierro (Hu et al. 2008a) o la deformación de la red cristalina (Hu et al. 2008b), desencadenando todo ello la liberación del fármaco.

#### 2.2.3.4. Nanopartículas de magnetita como sistemas multifuncionales

El diseño de **sistemas multifuncionales** con sensibilidad a más de un estímulo tanto externo como interno, podría, en teoría, mejorar la localización de la terapia. Así, el desarrollo de formulaciones que permitan la integración en una misma nanoplataforma multifuncional de diferentes estrategias, junto con la posibilidad de combinar terapias en una misma nanoformulación, podría incrementar la eficacia de la terapia, bien por la obtención de un efecto sinérgico, bien por la obtención de efectos aditivos (Wang and Kohane 2017) (Figura 14).



**Figura 14.** Beneficios clínicos potenciales del uso de sistemas multifuncionales que combinen varias terapias para el tratamiento de enfermedades localizadas.

En el caso de las nanopartículas magnéticas, se ha puesto de manifiesto la existencia de un efecto sinérgico cuando se combinan en una misma nanoformulación el transporte activo mediado por ligandos y el transporte activo mediado por la orientación magnética de las nanopartículas en respuesta a un campo magnético, lo que se conoce como mecanismo de doble guía (en inglés *dual guidance*). Así, por ejemplo, en el trabajo realizado por Schleich et al. 2014, desarrollaron una nanoplataforma compuesta por



nanopartículas de PLGA que contenían el fármaco paclitaxel y nanopartículas superparamagnéticas funcionalizadas con el péptido RGD. En comparación con las nanopartículas no dirigidas o aquellas en las que solo se aplicaba una única estrategia de transporte activo, la combinación de las dos estrategias resultó en un incremento significativo de las nanopartículas en el tumor y en una mejora del efecto terapéutico. Resultados similares se han obtenido en otros trabajos, como por ejemplo, el trabajo realizado por Cui et al. 2016, en el que demostraron la sinergia de la localización magnética con el transporte activo mediado por ligandos que reconocían receptor TfR. Otros trabajos también han demostrado la sinergia en el efecto citotóxico cuando se combinan el transporte activo mediado por ligandos y la respuesta de las nanopartículas magnéticas a un AMF (Pradhan et al. 2010). Esta sinergia también se ha observado en BMNPs funcionalizadas con doxorubicina y con el anticuerpo monoclonal DO-24 (Peigneux et al. 2019).

Por otro lado, tal y como se ha expuesto en el *apartado 2.2.3.2.*, las nanopartículas magnéticas no sólo se pueden utilizar para el transporte y la liberación controlada de fármacos bajo la influencia de un campo magnético externo, sino que también se pueden utilizar como agentes de hipertermia pudiendo aplicar de manera conjunta un doble tratamiento (hipertermia y quimioterapia), el cual ha demostrado tener efectos sinérgicos. El incremento de la temperatura derivado de la hipertermia magnética mejora la citotoxicidad del agente terapéutico al interferir con mecanismos de reparación de ADN y con la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia múltiple a fármacos (Ren et al. 2012; Willerding et al. 2016). Por otro lado, también se ha observado que la hipertermia magnética incrementa la absorción intracelular de fármacos al afectar a la permeabilidad de la membrana celular. En el estudio realizado por Alvarez-Berríos et al. 2013, se analizó la fluidez de la membrana celular al exponer las células a un tratamiento de hipertermia magnética y se comparó con la fluidez de la membrana celular de células expuestas a temperaturas similares pero en ausencia de AMF, observando un incremento significativo en la permeabilidad de la membrana celular de aquellas células tratadas con hipertermia magnética. Además, la aplicación conjunta de quimioterapia local dirigida e hipertermia magnética mediada por BMNPs funcionalizadas con doxorubicina ha resultado más eficiente que la aplicación de cada terapia de manera individual, resultado de la sinergia que se ejerce. De hecho, estudios *in vivo* han demostrado que esta terapia combinada resulta incluso más eficiente en la disminución del tumor de cáncer de mama,

que las terapias tradicionales de quimioterapia sistémica, sin ocasionar efectos secundarios, ni a corto ni a medio plazo (Oltolina et al. 2020).

Por lo tanto, las nanopartículas magnéticas, biomiméticas o no, disponen de las características adecuadas para su aplicación como un sistema multifuncional para el transporte activo y la liberación controlada de fármacos (usando estímulos externos e internos) aplicando un tratamiento dual (quimioterapia e hipertermia) con efectos sinérgicos, lo que resultaría en una mejora en el efecto terapéutico combinatorio (Hayashi et al. 2016; Li et al. 2015a; Oltolina et al. 2020; Ullah et al. 2019; Yao et al. 2017).

Sin embargo, a pesar de que el concepto del transporte y liberación de fármacos controlados por estímulos se inició hace varias décadas (Yatvin et al. 1978) y del gran potencial que las nanopartículas magnéticas como sistemas multifuncionales ofrecen, se trata de una vía de investigación reciente y con baja presencia en clínica. Hasta la fecha, la mayoría de las nanoformulaciones basadas en óxidos de hierro aprobadas por FDA están indicadas para su uso en terapias de reemplazo de hierro, especialmente para el tratamiento de anemia asociada a la enfermedad renal crónica, así como, en menor medida, para su uso como agentes de contraste MRI (Tabla 3). Estas nanoformulaciones están compuestas por un núcleo de óxido de hierro, recubierto con polímeros hidrofílicos como el dextrano o la sacarosa, los cuales permiten su disolución lenta una vez son administrados (Ventola 2017). A pesar de ello, con el descubrimiento de las nuevas funcionalidades y oportunidades ofrecidas por las nanopartículas magnéticas en el campo de la liberación controlada de fármacos y tratamiento de enfermedades localizadas, se ha ido incrementando poco a poco el número de ensayos clínicos y nanoformulaciones aprobadas para su uso clínico (Tabla 3). Así, por ejemplo, destaca la nanoformulación aprobada por la EMA para su uso MFL AS1 (NanoTherm, *MagForce Nanotechnologies*). Esta nanoformulación consiste en nanopartículas superparamagnéticas de óxido hierro recubiertas con amino silano para el tratamiento local de glioblastomas mediante hipertermia magnética. Tras realizar la inyección directamente en el tumor, se aplica un AMF para calentar selectivamente las partículas, consiguiendo un calentamiento local en el microambiente tumoral (40-45 °C) que causa la muerte celular (Bobo et al. 2016; Caster et al. 2017; ‘Magforce: Our Therapy’ 2021). Otro ejemplo, es el producto Magnablate I (*University College London Hospitals*), diseñado para extirpar térmicamente tumores sólidos con la aplicación de AMF. Este producto se encuentra en un ensayo clínico para su uso en el tratamiento de tumores de próstata (Anselmo and Mitragotri 2016). En el

caso del uso de nanopartículas magnéticas como transportadores de fármacos, destaca el producto MCT-Dox (*FeRx Inc.*), nanoformulación compuesta por nanopartículas de hierro funcionalizadas con doxorubicina, el cual está siendo evaluado clínicamente para su uso en el tratamiento de cáncer de hígado (Fase II) y el carcinoma hepatocelular no rescatable (Fase III) (Mura et al. 2013).

**Tabla 3.** Formulaciones de óxido de hierro en clínica (productos aprobados para uso clínico o que han completado alguna fase del ensayo clínico).

*Nanoformulaciones aprobadas para su uso clínico*

<b>Nombre</b>	<b>Formulación</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Año</b>
CosmoFer / Ferrisat ( <i>Pharmacosmos</i> )	Dextrano de hierro	Anemia	FDA (1992)
DexFerrum/DexIron ( <i>American Reagent</i> )	Dextrano de hierro	Anemia	FDA (1996)
Ferrlecit ( <i>Sanofi</i> )	Gluconato de hierro	Anemia	FDA (1999)
Venofer ( <i>American Regent</i> )	Sacarosa de hierro	Anemia	FDA (2000)
Feraheme ( <i>AMAG</i> )/ Rienso ( <i>Takeda</i> )/ Ferumoxytol	Óxido de hierro recubierto por poli-glucosa sorbitol carboximetiléter	Anemia asociada a insuficiencia renal crónica	FDA (2009)
Injectafter/Ferinject ( <i>Vifor</i> )	Carboximaltosa de hierro	Anemia	FDA (2013)
Feridex I.V. ( <i>AMAG</i> )/ Endorem	Dextrano de hierro	Agente de contraste MRI (Hígado)	FDA (1996)
Resovist ( <i>Bayer Schering Pharma</i> )/ Cliavist	Carboxidextrano de hierro	Agente de contraste MRI (Hígado)	EMA (2009)
Sienna+ ( <i>Sysmex</i> )	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro	Agente de contraste MRI (Cáncer de mama)	EMA (2017)
MLF AS1 /NanoTherm AS1 ( <i>MagForce Nanotechnologies</i> )	Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con aminosilano	Hipertermia magnética (Glioblastoma)	EMA (2010)

*Nanoformulaciones que han completado alguna fase del ensayo clínico*

Nombre	Formulación	Aplicación	Identificador*
Feraheme (AMAG)	Óxido de hierro recubierto por poli-glucosa sorbitol carboximetiléter	Agente de contraste MRI (Tumor cerebral y cáncer de próstata)	NCT02452216 (Fase I) NCT01296139 Fase (I)
Magnablate I (University College London Hospitals)	Nanopartículas de hierro	Ablación térmica (cáncer de próstata)	NCT02033447 (Fase 0)
MTC-DOX (FeRx Inc.)	Óxido de hierro y doxorubicina	Liberación controlada de fármacos	NCT00034333 (Fase 3) NCT00054951 (Fase II) NCT0004180 (Fase II)

*\*Identificadores en ClinicalTrials.gov. A fecha JULIO-2021, el número de ensayos clínicos en desarrollo que implican el uso de nanoformulaciones de óxido de hierro es de 191.*

Los Capítulos II y III de la presente Tesis Doctoral se encuentran alineados con esta reciente vía de investigación que implica uso de nanopartículas magnéticas para el transporte y la liberación controlada de fármacos, así como su uso como agentes de hipertermia. De hecho, dichos capítulos constituyen las primeras pruebas de concepto para evaluar el potencial de un tipo específico de nanopartículas magnéticas, las nanopartículas magnéticas biomiméticas de magnetita mediadas por la proteína MamC (BMNPs) como nanotransportadores de nuevos fármacos en este ámbito de la nanomedicina. Concretamente, en el **Capítulo II se evaluará el uso de BMNPs como nanotransportadores de dos agentes terapéuticos** (el compuesto antitumoral de nueva síntesis Ff-35 y la bacteriocina AS-48) **en combinación con la aplicación de la hipertermia magnética** para el tratamiento de dos enfermedades localizadas: cáncer y enfermedades infecciosas, respectivamente. Por el contrario, **en el Capítulo III se abordará el diseño de nuevas formulaciones que incluyan BMNPs** con el objetivo de ahondar y explorar la aplicación de las BMNPs como sistemas multifuncionales en el tratamiento local de enfermedades localizadas.

### 3. Nanopartículas de magnetita como magnetofósiles: en busca de la huella definitiva de las MTB

El legado geoquímico/mineralógico presente en el registro geológico de biominerales fósiles proporciona información relevante sobre la evolución de la vida temprana en nuestro planeta, así como de la existencia de vida en otros planetas como Marte (Li et al. 2013a). A pesar de ello, la información conservada en dichos registros fósiles es difícil de interpretar. Por ejemplo, los biominerales fósiles muestran una gran variedad de morfologías y composiciones químicas, algunas de las cuales son consecuencia de los procesos biológicos que los originaron (es decir, los procesos de biomineralización) y otras se han originado durante los procesos diagenéticos y metamórficos que dichos fósiles han experimentado a lo largo del tiempo (es decir, su historia tafonómica) (Kopp and Kirschvink 2008; Li et al. 2013a). Además, se ha demostrado que existen diferentes procesos abióticos que dan lugar a la formación de minerales con características geoquímicas, morfológicas y/o mineralógicas similares a aquéllas presentes en biominerales fósiles, características las cuales pueden dar lugar a interpretaciones potencialmente erróneas (García-Ruiz et al. 2009; Li et al. 2013a).

En el caso de las MTB, elemento objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral, una vez se produce la muerte y lisis de estas bacterias, los cristales de magnetita intracelulares se pueden conservar en sedimentos o en rocas sedimentarias dando lugar a los denominados **magnetofósiles** (Chang and Kirschvink 1989). Dado que dichas MTB representan uno de los microorganismos más antiguos capaces de sintetizar minerales en la Tierra (Amor et al. 2020), se han buscado magnetofósiles como posible evidencia de vida temprana en rocas terrestres y extraterrestres (Chang and Kirschvink 1989; McKay et al. 1996; Thomas-Keprta et al. 2001) (Tabla 4). Además, también se han utilizado como posibles candidatos geológicos para estudios paleoambientales y paleomagnéticos. Sin embargo, a pesar de que los cristales de las MTB constituyen una de las herramientas más prometedoras para calibrar la evolución de la vida y la química de la Tierra primitiva, como consecuencia de las destacadas propiedades intrínsecas de estos cristales del magnetosoma (véase *apartado 1.2.3.2.*) y su capacidad de preservación en el registro geológico, los criterios y/o huellas biológicas utilizados hasta la fecha para determinar el origen biológico de este tipo de magnetita no han sido aceptados de manera unánime por parte de la comunidad científica como evidencia sólida y sigue existiendo una gran

controversia sobre este tema. Por lo tanto, se requiere la definición de una huella biogeoquímica definitiva presente en la magnetita bacteriana de las MTB que permita su distinción de aquella magnetita producida químicamente, especialmente, en aquellos casos en los que dichos cristales se utilizan como evidencia de actividad microbiana ligada a la existencia de vida en sedimentos y rocas terrestres y extraterrestres (Amor et al. 2015; Mandernack et al. 1999; McKay et al. 1996; Thomas-Keprta et al. 2009, 2001).

**Tabla 4.** Magnetofósiles encontrados y analizados a lo largo de la historia.

Localización	Edad*	Eón Geológico	Huellas analizadas	Referencias
Nueva Jersey (Máximo Térmico del Paleoceno-Eoceno, PETM)	55.8 Ma	Fanerozoico	Forma, tamaño, presencia de cadenas, propiedades magnéticas	Kopp et al. 2009, 2007
Sur de Inglaterra	85 Ma	Fanerozoico	Forma, tamaño, presencia de cadenas, propiedades magnéticas	Montgomery et al. 1998
Oeste de Australia	2 Ga	Proterozoico	Forma, tamaño, presencia de cadenas, propiedades magnéticas	Chang et al. 1989
Estromatolito de la formación Tumbiana (Australia)	2.7 Ga	Arcaico	Forma, tamaño	Akai et al. 1997
Meteorito ALH84001 (Marte)	3.9 Ga	Arcaico	Forma, tamaño, pureza química	Jimenez-Lopez et al. 2012; McKay et al. 1996; Thomas-Keprta et al. 2009, 2000

\*Ma: millón de años; Ga: mil millones de años.

En relación a las metodologías utilizadas para la determinación de las diferentes huellas biológicas, durante décadas se ha realizado la identificación de magnetofósiles y su distinción de aquellos cristales producidos químicamente mediante el uso de criterios morfológicos, cristalográficos, geológicos y/o magnéticos. Especialmente, destacan los criterios “sólidos” definidos en los trabajos realizados por Thomas-Keprta et al. 2000 y

por Kopp and Kirschvink 2008 (Tabla 5). Recientemente, estos criterios se han completado con la introducción de nuevas huellas químicas e isotópicas (Amor et al. 2020). A continuación, se describirán brevemente dichos criterios, junto con las metodologías y técnicas utilizadas para su análisis, así como las limitaciones que su uso conlleva (Figura 15).



**Figura 15.** Resumen de las metodologías aplicadas para la determinación de los criterios morfológicos, magnéticos, químicos e isotópicos utilizados para distinguir los cristales de magnetita de las MTB (magnetofósiles) de los cristales abióticos y/o producidos mediante BIM.

**Criterios morfológicos.** Dentro de esta clasificación se incluyen aquellos criterios y/o características que se pueden obtener mediante un análisis de microscopía electrónica de transmisión de los cristales. Así, se ha definido que, aquellos cristales producidos por las MTB presentan morfologías uniformes y características de cada especie, se disponen alineados formando cadenas y presentan bordes romos, en comparación con aquellos cristales de magnetita abióticos o producidos mediante BIM que muestran morfologías aleatorias, no se encuentran alineados y presentan bordes afilados (Kopp and Kirschvink 2008; Thomas-Keprta et al. 2000). Además, tal y como se ha comentado anteriormente, los cristales de magnetita de las MTB crecen a lo largo del eje cristalino [111] sin defectos en la red cristalina (Mann et al. 1987a). A pesar de que se han encontrado evidencias de cristales de magnetita de MTB con elongaciones “anómalas” a lo largo de los ejes [110] y [100], este criterio de elongación [111] es uno de los criterios más aceptados hasta la fecha (Benzerara and Menguy 2009; Isambert et al. 2007; Li et al. 2015b). Por otro lado, la relación entre los factores de forma (relación ancho/largo) y la longitud de los cristales de magnetita de las MTB se encuentran dentro del dominio único estable, así como dichos cristales muestran una distribución de tamaño gaussiana estrecha y sesgada, en

comparación con los cristales de magnetita abióticos o producidos mediante BIM que dan lugar a distribuciones logarítmicas normales o distribuciones sesgadas positivamente (Arató et al. 2005; Devouard et al. 1998; Muxworthy and Williams 2009; Witt et al. 2005). Sin embargo, este criterio no es suficiente para distinguir los magnetofósiles de la magnetita abiótica en rocas sedimentarias, debido a que la presencia simultánea de magnetita biótica y abiótica en la mayoría de los sedimentos da lugar a que los picos de abundancia de sendos tipos de cristales de magnetita puedan superponerse, creando distribuciones de tamaño más complejas (Amor et al. 2020; Arató et al. 2005). Además, también se ha observado la existencia de cristales producidos mediante BIM que exponen un dominio único estable (Li et al. 2013a; Vali et al. 2004).

**Tabla 5.** Resumen de los criterios/huellas determinados por Thomas-Keprta et al. 2000 y Kopp and Kirschvink 2008 para la identificación de magnetofósiles.

<b>Thomas-Keprta et al. 2000</b>	<b>Kopp and Kirschvink 2008</b>
1. Tamaño de dominio único estable y proporciones (ratio ancho / largo) anisotrópicas restringidas.	1. Contexto y robustez geológica. <i>Puntuación de calidad paleomagnética PQ.</i>
2. Pureza química.	2. Tamaño de dominio único estable. <i>Criterio SD.</i>
3. Perfección cristalográfica.	3. Tamaño y forma. <i>Criterio S.</i>
4. Cristales alineados en cadenas.	4. Cristales alineados en cadenas. <i>Criterio C.</i>
5. Morfología cristalina inusual.	5. Perfección química. <i>Criterio ChP.</i>
6. Cristales elongados a lo largo del eje [111].	6. Perfección cristalográfica. <i>Criterio CrP.</i>

**Criterios magnéticos.** La presencia de cristales con dominio único estable alineados en cadenas proporciona a las MTB propiedades magnéticas únicas caracterizadas por una gran magnetización remanente, así como por un campo de interacción limitado entre partículas (Li et al. 2012; McCartney et al. 2001). Las curvas de inversión de primer orden (FORC del inglés *First-Order Reversal Curves*) junto con la espectroscopía de resonancia ferromagnética (FMR del inglés *Ferromagnetic Resonance Spectroscopy*), han permitido identificar la presencia de cadenas intactas de magnetosomas fosilizados (Gehring et al. 2013; Heslop et al. 2014; Roberts et al. 2019). Sin embargo, la limitación de este criterio recae en que dicho alineamiento puede perderse



durante el proceso de fosilización, debido a la degradación de las proteínas que ensamblan las cadenas del magnetosoma. En este caso, la huella biológica de las curvas FORC se pierde (Li et al. 2012). Otra huella biológica que se ha utilizado para probar la presencia de magnetofósiles es la temperatura de Verwey (véase *apartado 1.3*). En el caso de las MTB, la temperatura de Verwey es de 100 K, frente a la magnetita abiótica que se encuentra por encima de los 120 K. A pesar de ello, este valor puede sufrir variaciones como consecuencia de procesos medioambientales tales como la oxidación parcial diagenética de los cristales (Chang et al. 2016; Kopp and Kirschvink 2008), limitando de esta manera su aplicación como indicador de origen biogénico.

**Criterios químicos e isotópicos.** El alto control de las MTB sobre el proceso de biomineralización permite que los cristales obtenidos mediante este procedimiento presenten una alta pureza química. No obstante, se ha demostrado que algunos elementos traza como el molibdeno, estaño, cobalto y/o magnesio sí que pueden ser incorporados en los cristales MTB durante el proceso de biomineralización, limitando la aplicación de la pureza química de los cristales MTB como huella (Amor et al. 2015; Keim et al. 2009; Staniland et al. 2008). En base a la línea de estos resultados, se diseñó un enfoque basado en la búsqueda de diferencias en la incorporación de cationes extraños, en términos de velocidad y concentración total, entre los cristales MTB y sus contrapartes abióticos (Amor et al. 2015; Keim et al. 2009; Prozorov et al. 2014). Sin embargo, los estudios que utilizaron esta estrategia tampoco han proporcionado la huella biológica definitiva, especialmente, por las limitaciones relacionadas con la imposibilidad de determinar la concentración absoluta de los cationes externos incorporados en los cristales del magnetosoma, así como por la falta de conocimiento del proceso mediante el cual las MTB los incorporan (Amor et al. 2015; Baumgartner et al. 2013; Tanaka et al. 2016, 2012). Por último, también se ha investigado el fraccionamiento isotópico del hierro y el oxígeno por parte de las MTB durante la biomineralización de los cristales de magnetita como posible firma biológica (Amor et al. 2016; Mandernack et al. 1999). Así, se ha demostrado que la magnetita producida por *M. magneticum* AMB-1, da lugar a un agotamiento significativo de isótopos pesados de hierro en relación con el medio de crecimiento y la fracción orgánica de la célula. Además, en dicho estudio también se evidenció una incorporación específica del isótopo de  $^{57}\text{Fe}$  en la magnetita, presentando una incorporación preferencial en comparación con los otros tres isótopos ( $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}$  y  $^{58}\text{Fe}$ ). Esta anomalía isotópica nunca se ha observado hasta la fecha y, por lo tanto, podría

constituir una firma biológica única de los cristales de magnetita MTB. Pese a ello, el origen de esta firma isotópica no está demostrado y se necesita un análisis más profundo y detallado para su confirmación (Amor et al. 2018, 2016).

Por lo tanto, dadas las limitaciones de los criterios descritos anteriormente, se requiere la definición de un enfoque alternativo que implique el uso de una nueva metodología con el objetivo de poder determinar una huella biogeoquímica definitiva. En relación a este aspecto, de las tres aproximaciones descritas anteriormente (criterios morfológicos, magnéticos y químicos), probablemente, el enfoque más sencillo y eficaz sea la búsqueda de elementos químicos (criterios químicos) relacionados con la presencia de moléculas orgánicas dentro de la red cristalina de la magnetita. El Capítulo IV de la presente Tesis Doctoral se encuadra dentro de esta hipótesis. Así, dado que el proceso de biomineralización de la magnetita de las MTB está mediado por proteínas específicas del magnetosoma, dichas proteínas podrían “imprimir” en el cristal de magnetita huellas de C, huellas que podrían detectarse mediante una técnica de alta resolución como la técnica de tomografía con sonda atómica (APT del inglés *Atom Probe Tomography*) (Kuhlman et al. 2001; Miller and Forbes 2009). En este contexto, se ha demostrado que la alta resolución química espacial de la APT es ideal para las dimensiones a nano-escala de los cristales de magnetita de magnetosoma. Además, diversos estudios han realizado la caracterización química de fases orgánicas presentes en cristales de hidroxiapatito o en el esmalte mediante la aplicación de dicha metodología con excelentes resultados (Gordon et al. 2015, 2012; Gordon and Joester 2011). Por todo ello, en el **Capítulo IV de la presente Tesis Doctoral se abordará el diseño de un enfoque alternativo para la caracterización directa de la composición química de los cristales de magnetita de las MTB, magnetitas inorgánicas y biomiméticas (desnudas o envueltas en liposomas) a escala atómica mediante el uso de la técnica APT**, con el objetivo, por un lado, de identificar y cuantificar la presencia de moléculas orgánicas dentro de la magnetita de las MTB y diferenciarlas de aquellos cristales abióticos, por otro, para determinar si las proteínas de la membrana del magnetosoma imprimen una huella biológica en dichos cristales y, por último, para determinar posibles artefactos en la determinación de la huella biológica inducidos por la contaminación con la membrana del magnetosoma, modelizada por el liposoma en estos experimentos.

# **OBJETIVOS**



A día de hoy, las nanopartículas de magnetita, especialmente aquellas nanopartículas de magnetita obtenidas mediante la química sintética biomimética, constituyen una plataforma tecnológica muy versátil con infinidad de oportunidades y aplicaciones en el campo de la nanotecnología dadas sus propiedades magnéticas, físicas, químicas y biológicas. Debido a ello, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo y la caracterización de nanosistemas magnéticos y la evaluación de su aplicación en nanotecnología, especialmente, en el campo de la nanomedicina y la astrobiología. Para ello, se abordan diferentes enfoques y desafíos que incluyen el escalado de la producción de estas nanopartículas magnéticas, la evaluación de su aplicación como nanotransportadores de fármacos y agentes de hipertermia, el desarrollo de nuevas formulaciones compuestas por diferentes tipos de nanopartículas de magnetita, así como el uso de dichos nanosistemas para la determinación de la huella biogeoquímica de las bacterias magnetotácticas (MTB), enfoques todos ellos recogidos en los siguientes objetivos.

El **Capítulo I** tiene como principal objetivo el estudio del escalado de la síntesis de nanopartículas mediante la química sintética biomimética. Así, dicho capítulo consta de los siguientes objetivos específicos:

- I. Analizar las diferentes metodologías de conservación de la proteína MamC de *Magnetococcus marinus* MC-1 y evaluar su efecto en la estructura y funcionalidad de la proteína como primer paso hacia el escalado de la síntesis de nanopartículas magnéticas biomiméticas de magnetita mediadas por la proteína MamC (BMNPs).
- II. Diseñar una metodología de síntesis química biomimética potencialmente escalable de nanopartículas de magnetita en presencia de aminoácidos (Lisina y Arginina) y evaluar el efecto de la presencia de dichos aminoácidos en las propiedades químicas, físicas y magnéticas de las nanopartículas de magnetita obtenidas.

El **Capítulo II** tiene como principal objetivo la evaluación del uso de BMNPs como nanotransportadores para la liberación controlada de agentes terapéuticos en combinación con la aplicación de la hipertermia magnética para el tratamiento de enfermedades localizadas, utilizando como modelo de dichas enfermedades el cáncer y

las enfermedades infecciosas. Así, dicho capítulo consta de los siguientes objetivos específicos:

- III. Diseñar y caracterizar la unión del inhibidor del enzima colina quinasa  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ) Ff35 a las BMNPs y evaluar el efecto del nanosistema (Ff35-BMNPs) en términos de citotoxicidad y especificidad *in vitro*, así como explorar su uso combinado con la hipertermia magnética para potenciar el efecto citotóxico del nanosistema.
- IV. Diseñar y caracterizar la unión de la bacteriocina AS-48 a las BMNPs y evaluar el efecto del nanosistema (AS-48-BMNPs) en términos de citotoxicidad y mecanismo de acción *in vitro*, así como explorar su uso combinado con la hipertermia magnética para potenciar el efecto antibacteriano del nanosistema.

El **Capítulo III** tiene como principal objetivo el desarrollo y la caracterización de nuevas nanoformulaciones que incluyan BMNPs y evaluar su aplicación como sistemas multifuncionales en el tratamiento local de enfermedades localizadas. Así, dicho capítulo consta de los siguientes objetivos específicos:

- V. Desarrollar y caracterizar una nueva nanoformulación que combine dos tipos diferentes de nanopartículas magnéticas (nanopartículas de magnetita inorgánicas -MNPs- y BMNPs) y evaluar su efecto en la mejora de la respuesta de hipertermia magnética de la nanoformulación.
- VI. Desarrollar y caracterizar una nueva nanoformulación que combine dos tipos diferentes de nanopartículas magnéticas (MNPs y TBM, BMNPs funcionalizadas con doxorubicina y el anticuerpo monoclonal AR-3) y evaluar la aplicación de este nanosistema multifuncional como nanotransportador de fármacos mediante doble guía (anticuerpos y orientación magnética) y como agente de hipertermia en términos de citotoxicidad *in vitro*.
- VII. Diseñar una metodología para el recubrimiento de nanopartículas magnéticas (BMNPs y/o MNPs) con una envoltura lipídica (magnetoliposomas) y evaluar el efecto de dicho recubrimiento en la respuesta de hipertermia magnética de la nanoformulación, así como en la mejora de la estabilidad coloidal de la misma.

El **Capítulo IV** tiene como principal objetivo la definición de una huella biogeoquímica definitiva que permita diferenciar los cristales producidos por las MTB de aquéllos con origen abiótico. Así, dicho capítulo consta del siguiente objetivo específico:

- VIII. Caracterización de la huella geoquímica de la magnetita de las MTB a través del análisis de la composición química de dichos cristales a escala atómica mediante el uso de la técnica de tomografía con sonda atómica (APT). Determinación de la potencial huella biológica de las proteínas de membrana y la eliminación de artefactos en la determinación de dicha huella por contaminación con la membrana que rodea al magnetosoma.





# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# 1. Expresión, purificación, conservación y caracterización de proteínas

## 1.1. Purificación de la proteína MamC

La purificación de la proteína MamC se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Valverde-Tercedor et al. 2015. Para ello, se partió de la cepa *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP10 (Life Technologies: Invitrogen) transformada con el plásmido pTrcHis-TOPO\_mamC (Life Technologies: Invitrogen). Se llevó a cabo la siembra en placa a partir de la cepa conservada en glicerol a una temperatura de -80 °C. Una vez crecieron las colonias, se inocularon en 750 mL de medio Luria Bertani (LB, Scharlau) a una concentración de 25 g/L suplementados con ampicilina (Sigma Aldrich) a una concentración de 0,05 mg/mL. Las células crecieron a una temperatura de 26 °C y 50 rpm hasta una densidad óptica (DO) de 0,5-0,6 a 600 nm. Una vez se alcanzó el valor de DO deseado, se indujo la expresión de la proteína con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma Aldrich) a una concentración de 2 mM durante 5 horas a 37 °C y 220 rpm. A continuación, se detuvo la inducción depositando los matraces en hielo durante 15 minutos. Seguidamente, se llevó a cabo la centrifugación de los cultivos obtenidos a 6000 rpm durante 10 minutos en frío. Para ello, se utilizó una centrífuga modelo 5804R con un rotor F-34-6-38 (Eppendorf). El sedimento de células obtenido se suspendió en el tampón de lisis (tampón fosfato 20 mM, hidrócloruro de guanidina 6 M, NaCl 0,5 M, pH 7,8) y se dejó toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente, se aplicó un tratamiento de sonicación (sonicador modelo *Sonic VibraCell*) con una intensidad del 70% durante 10 minutos (intervalos de 25 segundos de sonicación y 35 segundos de reposo). Tras la sonicación, la muestra se centrifugó a 11000 rpm durante 40 minutos en frío, de la cual se recogió el sobrenadante, es decir, el extracto libre de células.

La obtención de las fracciones con la proteína de interés se realizó mediante una cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*) en condiciones desnaturalizantes mediante cambios de pH. Para ello, se utilizó el sistema *ÄKTA Prime Plus FPLC* (GE Healthcare) y una columna de 5 mL *HiTrap Chelating HP* (GE Healthcare). En la preparación de la columna, la cual estaba conservada en etanol al 20%, ésta se lavó con 5 volúmenes de agua destilada y se

cargó con 0,1 M de sulfato de níquel (Sigma Aldrich). Aquellos iones de níquel que no quedasen retenidos en la columna debido a que se encontraban en exceso se eliminaron mediante un lavado con 5 volúmenes de agua destilada. A continuación, se equilibró la columna con 2 volúmenes del tampón de unión (tampón fosfato 20 mM, urea 8 M, NaCl 0,5 M, pH 7,8). Para la purificación de la proteína, el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se cargó en la columna. Posteriormente, la columna se lavó con 15 volúmenes de tampón de unión, seguido de 10 volúmenes de tampón de lavado (tampón fosfato 20 mM, urea 8 M, NaCl 0,5 M, pH 6). Para eluir la proteína se utilizaron 8 volúmenes de tampón de elución (tampón fosfato 20 mM, urea 8 M, NaCl 0,5 M, pH 4). Finalmente, las fracciones que presentaban la proteína se dializaron durante toda la noche en agitación suave en el tampón A (Tris 50 mM, urea 6 M, NaCl 0,15 M, pH 8,5). Con el objetivo de reducir la concentración de urea y permitir así el replegamiento de la proteína, el tampón A se fue diluyendo a la mitad de concentración del agente desnaturizante (urea) con el tampón B (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 8,5). Concretamente, se diluyó en tres ocasiones dejando un espacio de 3-4 horas entre cada cambio, exceptuando el último (sin urea) que se dejó toda la noche en agitación.

El grado de pureza de las fracciones de proteína obtenidas y su patrón de migración, correspondiente con el valor del peso molecular teórico calculado para MamC-His (17,46 KDa, *ExpAsy Server*), se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Para la realización de la medida de la concentración de la proteína se utilizó el coeficiente de extinción molar de dicha proteína ( $14440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Éste se obtuvo a partir de la aplicación *Protparam*, la cual utiliza el método descrito por Gill and von Hippel 1989 basado en la determinación del coeficiente de extinción molar a partir de la suma de los coeficientes de extinción molar de aquellos aminoácidos aromáticos presentes en la proteína. A continuación, se determinó la concentración de MamC midiendo la absorbancia a 280 nm en un equipo *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific).

### **1.1.1. Métodos para la conservación de la proteína MamC**

Una vez se completó la purificación y el replegamiento de la proteína, se analizó la estabilidad de la misma utilizando tres metodologías de conservación: liofilización, criopreservación y refrigeración. En el caso de la liofilización, se realizó la congelación

mediante N<sub>2</sub> líquido de alícuotas de MamC, las cuales, posteriormente, se liofilizaron en el liofilizador *Cryodos-50* (Testlar) durante 12 horas. Una vez liofilizadas, éstas se conservaron a 4 °C. Para la crioconservación, al igual que en el caso anterior, las alícuotas se congelaron utilizando N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Finalmente, en el caso de la refrigeración, diferentes alícuotas de MamC se almacenaron a 4 °C durante 15, 30 and 60 días, respectivamente.

## 1.2. Purificación de la bacteriocina AS-48

AS-48 es un péptido catiónico circular con una longitud de 70 aminoácidos. Esta bacteriocina presenta un fuerte efecto bactericida frente a bacterias Gram-positivas, así como frente a diversos patógenos humanos. Por el contrario, las bacterias Gram-negativas, dado que disponen de una membrana externa, muestran una resistencia natural a esta bacteriocina, siendo necesario un daño sub-letal previo para su sensibilización (Galvez et al. 1991; Maqueda et al. 2004).

La purificación de la bacteriocina AS-48 se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente por Ananou et al. 2008 y Cebrián et al. 2012. Brevemente, se utilizó el medio Esprion-300 suplementado con 1% de glucosa a un pH controlado de 6,5 para cultivar la cepa productora *Enterococcus faecalis* UGRA10 (Cebrián et al. 2012). Los sobrenadantes obtenidos se concentraron mediante ultrafiltración y se purificaron mediante una cromatografía de intercambio iónico seguida de una cromatografía de fase reversa. Tras la eliminación del disolvente orgánico, el polvo obtenido se solubilizó utilizando un tampón acuoso. Posteriormente, la bacteriocina se purificó realizando una cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa (RP-HPLC del inglés Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography) mediante el uso del equipo preparativo *Agilent 1260 infinity* (Agilent). A continuación, se determinó la concentración de la bacteriocina mediante espectrofotometría de absorbancia UV-Visible, a 280 nm.

## 1.3. Caracterización físico-química

### 1.3.1. Dicroísmo circular (CD)

Los espectros de dicroísmo circular (CD del inglés *Circular Dichroism*) de las diferentes alícuotas de proteína MamC (previamente centrifugadas durante 3 minutos a

14000 rpm en una centrífuga 5804R con un rotor F-34-6-38) se realizaron en un espectrofotómetro de CD JASCO J-715 (Jasco) equipado con un sistema de termostatación mediante efecto *Peltier*. Los espectros se registraron en el intervalo de ultravioleta lejano (190-260 nm), con un tiempo de respuesta de 1 s, amplitud de la banda espectral de 2 nm y una velocidad de barrido de 100 nm/min. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 0,1 cm de longitud. Las medidas se realizaron a una temperatura de 25 °C y el resultado se expresó como el promedio de 5 acumulaciones. Además, también se registró el espectro correspondiente al tampón en el que estaba suspendida MamC y se sustrajo de los espectros. El análisis de los datos experimentales se realizó utilizando el programa *Spectra Manager* (Jasco).

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

Se utilizó la técnica de la dispersión de luz dinámica (DLS del inglés *Dynamic Light Scattering*) para la realización del estudio de la proporción de agregados y monómeros proteicos de la proteína MamC. Las medidas de las diferentes muestras (previamente centrifugadas durante 3 minutos a 14000 rpm en una centrífuga 5804R con un rotor F-34-6-38) se realizaron en el instrumento *DynaPro MS-X* (Wyatt Technology) equipado con un sistema de termostatación mediante efecto *Peltier*, utilizando cubetas de cuarzo termostatación de 30 µL y una temperatura de 25 °C. Las medidas se registraron cada 5 segundos hasta que se produjo la saturación de la señal. El tratamiento y análisis de los datos experimentales se realizó utilizando el programa *Dynamics v6* (Wyatt Technology).

## **2. Biomineralización de nanopartículas de magnetita**

### **2.1. Síntesis de nanopartículas de magnetita inorgánicas (MNPs)**

Los experimentos de biomineralización se realizaron en condiciones de anaerobiosis para evitar la potencial oxidación de las partículas de magnetita. Todos los reactivos utilizados se prepararon a partir de agua desoxigenada y desionizada en el interior de una cámara de anaerobiosis *COY* (Coy Laboratory Products), la cual presentaba una atmósfera interna compuesta por 4% de H<sub>2</sub> en N<sub>2</sub>. Para llevar a cabo la

desoxigenación, el agua se calentó hasta la ebullición (30 min/L) utilizando piedras de teflón para facilitar la formación de burbujas y, posteriormente, se introdujo en un baño de hielo a la vez que se burbujeaba con una corriente de N<sub>2</sub> (30 min/L). Las disoluciones madre utilizadas para llevar a cabo la precipitación de la magnetita fueron las siguientes: NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,15 M/0,15 M), FeCl<sub>3</sub> (1 M), Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (0,5 M) y NaOH (1 M) (Sigma Aldrich).

La magnetita se dejó precipitar en un sistema cerrado a 25 °C y a 1 atmósfera de presión siguiendo el protocolo descrito previamente por Perez-Gonzalez et al. 2011. Para preparar la disolución a partir de la cual precipitaron los cristales de magnetita, se mezclaron y diluyeron las disoluciones madre de sales hasta alcanzar la concentración final de NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,5 mM/3,5 mM), FeCl<sub>3</sub> (5,56 mM), Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (2,78 mM). Las cantidades de las disoluciones madre de FeCl<sub>3</sub> y de NaOH utilizadas fueron las necesarias para alcanzar el campo de estabilidad de la magnetita, es decir, valores de pH altos (pH = 9) y condiciones reductoras (valores de Eh negativos), según lo previsto en el diagrama de estabilidad de la magnetita calculado para estos experimentos por las ecuaciones de Garrels and Christ 1990. La suspensión de nanopartículas generada se dejó dentro de la cámara de anaerobiosis durante un mes antes de ser procesada (*ver apartado 2.4.*).

## **2.2. Síntesis de nanopartículas de magnetita biomimética en presencia de la proteína MamC (BMNPs)**

Una vez se obtuvo purificada la disolución madre de la proteína MamC, ésta se desoxigenó con ayuda de una corriente de N<sub>2</sub> ultrapuro e inmediatamente después se introdujo en la cámara de anaerobiosis. El volumen apropiado de disolución madre proteica para rendir una concentración final de 10 µg/mL se mezcló con la disolución para preparar la magnetita descrita en el *apartado 2.1.*, previamente a la adición de NaOH. A continuación, una vez se completó la mezcla, se inició la precipitación añadiendo NaOH. Al igual que el proceso de síntesis de nanopartículas inorgánicas, la magnetita se dejó precipitar en un sistema cerrado a 25 °C y a 1 atmósfera de presión durante un mes.

## **2.3. Síntesis de nanopartículas de magnetita en presencia de aminoácidos**

Las disoluciones madre de los aminoácidos de lisina o arginina (Sigma Aldrich) se prepararon a partir de agua desoxigenada y desionizada en el interior de la cámara de anaerobiosis. Para ello, los aminoácidos (en forma de clorhidrato), se pesaron cuidadosamente, se desoxigenaron con ayuda de una corriente de Ar y se introdujeron en la cámara de anaerobiosis. A continuación, se prepararon las disoluciones madre de cada una de las concentraciones usadas (0,1, 2 y 10 mM). El volumen apropiado de cada disolución de aminoácidos se mezcló con la disolución para preparar magnetita descrita en el *apartado 2.1.*, previamente a la adición de NaOH. Posteriormente, una vez se completó la mezcla, se inició la precipitación añadiendo NaOH. La magnetita se dejó precipitar en un sistema cerrado a 25 °C y a 1 atmósfera de presión durante un mes.

### **2.3.1. Precipitación a diferentes pHs**

Se prepararon disoluciones madre de los aminoácidos de lisina y arginina a 10 mM. El volumen apropiado de cada disolución de aminoácidos se mezcló con la disolución para preparar magnetita descrita en el *apartado 2.1.*, previamente a la adición de NaOH. Posteriormente, una vez se completó la mezcla, se inició la precipitación añadiendo NaOH. En este caso, a diferencia de los apartados descritos anteriormente, la cantidad de la disolución madre de NaOH utilizada fue la necesaria para alcanzar valores de pH de 10 y 11. La magnetita se dejó precipitar en un sistema cerrado a 25 °C y a 1 atmósfera de presión durante un mes.

## **2.4. Purificación, preparación y conservación de las nanopartículas de magnetita**

Transcurridos 30 días de reacción de precipitación, las partículas de magnetita resultantes se lavaron y se recogieron. Las nanopartículas se concentraron mediante decantación magnética con ayuda de un imán permanente de neodimio y se retiró el sobrenadante. A continuación, las nanopartículas magnéticas se volvieron a suspender con agua desoxigenada y desionizada y, posteriormente, se decantaron magnéticamente. Este mismo procedimiento se repitió tres veces para cada uno de los experimentos de



precipitación de magnetita. Finalmente, las partículas se suspendieron en un volumen conocido de agua, las botellas que las contenían se sellaron herméticamente y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. En el caso de las nanopartículas de magnetita utilizadas en los estudios *in vitro*, éstas se suspendieron en tampón HEPES (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4, Sigma Aldrich), las botellas que las contenían se sellaron herméticamente y se esterizaron en el autoclave antes de su almacenamiento a 4 °C.

### **3. Desarrollo y formulación de liposomas y magnetoliposomas**

#### **3.1. Preparación de las nanopartículas de magnetita**

Las nanopartículas de magnetita (tanto MNPs como BMNPs), se incubaron durante 12 horas en citrato 2 M (Thermo-Fisher) con el objetivo de estabilizarlas y disminuir la agregación de las mismas (Bacri et al. 1990; Laurent et al. 2008). A continuación, se realizaron un total de 5 lavados con agua ultrapura con ayuda de un imán mediante decantación magnética, y las nanopartículas se dejaron en un volumen de 1,67 mL de agua. Posteriormente, las suspensiones se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm (Sartorius).

#### **3.2. Síntesis de liposomas y magnetoliposomas**

Se realizó la síntesis de liposomas y magnetoliposomas mediante el uso del fosfolípido L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (PC del inglés *Phosphatidylcholine*) de huevo (Avanti Polar Lipids). Se trata de un fosfolípido que forma parte del grupo de ésteres de ácidos grasos cuyo componente alcohólico presenta un grupo fosfato. En cuanto a su estructura, está compuesto por dos cadenas de ácidos grasos que se encuentran esterificadas con los hidroxilos situados en las posiciones 1 y 2 de la glicerina. El hidroxilo restante está esterificado con una molécula de ácido fosfórico, la cual está unida a una colina. La PC es el fosfolípido mayoritario en la membrana de las células eucariotas, así como sirve como reservorio de numerosos mensajeros lipídicos. De acuerdo a la descripción del proveedor ('Egg PC | Avanti Polar Lipids' n.d.), el fosfolípido PC de huevo está compuesto aproximadamente por 32,7% C16:0 (ácido palmítico), 32% C18:1 (ácido

oleico), 12.3% C18:0 (ácido esteárico) y 17.1% C18:2 (ácido linoleico), presentando una baja temperatura de transición.

La obtención de liposomas y magnetoliposomas unilaminares se realizó según el protocolo de hidratación del *film* descrito por Clares et al. 2013 con ciertas modificaciones para adecuarlo a las características de las nanopartículas sintetizadas en la presente Tesis Doctoral. Para la síntesis de liposomas, se pesaron 10 mg de PC en una balanza de precisión *Radwag* y se disolvieron en de cloroformo (Carlo Erba) en un matraz de fondo redondo. Una vez se obtuvo una suspensión totalmente homogénea, se llevó a cabo la evaporación del disolvente con ayuda de un rotavapor *Büchi* (Rotavapor-R) en condiciones de vacío, a 37 °C y en agitación a 400 rpm hasta que se formó la película lipídica en el fondo del matraz. A continuación, con el objetivo de eliminar cualquier resto de cloroformo, los matraces estuvieron en condiciones de vacío durante 90 minutos. Posteriormente, se realizó la hidratación de la película lipídica añadiendo 1,67 mL de agua ultrapura ([PC]  $\approx$  6 mg/mL), obteniéndose una suspensión de aspecto lechoso. Para asegurar una correcta suspensión de los mismos, los matraces se dejaron en agitación durante 2 horas a 180-200 rpm a temperatura ambiente y se almacenaron durante 24 horas a 4 °C. A continuación, con ayuda de un extrusor (Avanti Polar Lipids), se redujo el tamaño de los liposomas. Para ello, la solución lipídica se pasó a través de una membrana de policarbonato (Whatman) con un tamaño de poro de 200 y 100 nm. Se realizaron un total de 5 ciclos de extrusión a 45 °C. Por último, la suspensión de liposomas se almacenó en frío para su posterior visualización y análisis. En el caso de la producción de magnetoliposomas, ésta se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito para los liposomas, salvo con la diferencia de que, en este caso, en vez de añadir 1,67 mL de agua ultrapura para la hidratación de la capa lipídica, se añadieron 1,67 mL de la solución de ferrofluido.

En relación a los ratios magnetita:PC, se ensayaron un total de tres ratios: 1:1, 4:1 y 8:1, de los cuales, en base a los resultados obtenidos, se seleccionó el ratio 4:1. De acuerdo con esto, todos los magnetoliposomas sintetizados en este trabajo (cuya composición y nomenclatura se recogen en la Tabla 6) presentaban un ratio magnetita:PC de 4:1, siendo la concentración final de nanopartículas de magnetita en todos los experimentos de 24 mg/mL.

**Tabla 6.** Composición y nomenclatura de los magnetoliposomas sintetizados.

<b>Nomenclatura</b>	<b>Composición</b>
Magnetoliposomas MNPs	Magnetoliposomas compuestos por MNPs
Magnetoliposomas BMNPs	Magnetoliposomas compuestos por BMNPs
Magnetoliposomas 60BMNPs-40MNPs	Magnetoliposomas compuestos por 60% de BMNPs y 40% de MNPs
Magnetoliposomas 25BMNPs-75MNPs	Magnetoliposomas compuestos por 25% de BMNPs y 75% de MNPs

*Todos los magnetoliposomas preparados presentaban una concentración de [PC] = 6 mg/mL y una concentración de [Nanopartículas de magnetita] = 24 mg/mL.*

## **4. Adsorción de diferentes moléculas sobre nanopartículas de magnetita**

### **4.1. Adsorción de aminoácidos sobre MNPs**

La adsorción de los aminoácidos de lisina y arginina sobre MNPs preformadas se realizó mediante interacción de tipo electrostática. Para ello, las MNPs se suspendieron en disoluciones de aminoácidos de lisina (10 mM) y arginina (10 mM), hasta una concentración de 0,3 mg/mL. La reacción se dejó incubar durante 24 horas a 25 °C. A continuación, las nanopartículas con los aminoácidos adsorbidos se concentraron por decantación magnética y se les aplicó el procedimiento de lavado descrito en el apartado 2.4.

### **4.2. Adsorción del anticuerpo monoclonal (mAb) AR-3 y el quimioterápico doxorrubicina (DOXO) sobre BMNPs**

El anticuerpo monoclonal (mAb) AR-3, constituye una inmunoglobulina IgG1 generada frente al carcinoma epidermoide humano A431 (ATCC®, CRL-1555™), específicamente, frente al antígeno denominado CAR-3. Dicho mAb presenta reactividad frente a un biomarcador expresado específicamente en células del carcinoma, tales como las del tracto gastroentérico, pero carece de reactividad frente a células epiteliales

normales, así como de origen mesenquimatoso, tales como fibroblastos, células sanguíneas o sarcomas (Prat et al. 1989, 1985).

La adsorción del mAb AR-3 y del agente quimioterápico doxorubicina (DOXO, Sigma Aldrich) sobre las BMNPs se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente por Iafisco et al. 2013. Brevemente, 5 mg de BMNPs se suspendieron en 1 mg/mL de mAb disuelto en el tampón HEPES dentro de botellas herméticamente cerradas para evitar la oxidación de las nanopartículas. La mezcla se incubó durante 24 horas a 25 °C en agitación suave en una noria. Transcurrido el tiempo de incubación, las nanopartículas funcionalizadas con el mAb se recogieron magnéticamente y se lavaron tres veces con el tampón HEPES. Posteriormente, estas nanopartículas binarias (mAb-BMNPs) se suspendieron en 1 mg/mL de DOXO disuelta en el tampón HEPES. La mezcla se volvió a incubar durante 24 horas a 25 °C en agitación suave en una noria. A continuación, estas nanoformulaciones (DOXO-mAb-BMNPs) se recogieron magnéticamente y se lavaron tres veces con tampón HEPES. El contenido de DOXO y mAb se evaluó mediante espectroscopía UV-Vis ( $\lambda = 490$  y  $280$  nm, respectivamente) a partir de todas las suspensiones con los sobrenadantes y lavados obtenidos utilizando el espectrofotómetro *Libra S12* (Biochrom). La cantidad de DOXO y de mAb adsorbidos a las BMNPs se determinó a partir de la diferencia entre las cantidades obtenidas al medir los sobrenadantes y lavados (cantidades correspondientes a moléculas no adsorbidas) y la concentración de partida de DOXO y mAb al inicio de la incubación. Finalmente, las nanopartículas funcionalizadas se suspendieron en tampón HEPES y se almacenaron a 4 °C hasta su uso (en la Tabla 7 se recogen las diferentes nanoformulaciones desarrolladas y su composición).

**Tabla 7.** Composición y nomenclatura de las nanopartículas y nanoformulaciones sintetizadas.

<b>Nomenclatura</b>	<b>Composición</b>
MNPs (M)	Nanopartículas magnéticas inorgánicas
BMNPs (BM)	Nanopartículas magnéticas biomiméticas de magnetita mediadas por MamC
60BMNPs-40MNPs	Nanoformulación compuesta por 60% de BMNPs y 40% de MNPs
25BMNPs-75MNPs	Nanoformulación compuesta por 25% de BMNPs y 75% de MNPs
DOXO-mAb-BMNPs (TBM)	Nanoformulación compuesta por BMNPs funcionalizadas con mAb AR-3 y DOXO
60 TBM + 40 M	Nanoformulación compuesta por 60% de TBM y 40% de MNPs (M)
25 TBM + 75 M	Nanoformulación compuesta por 25% de TBM y 75% de MNPs (M)

### 4.3. Adsorción de Ff35 sobre BMNPs

#### 4.3.1. Estudio del modelo de unión: cinética e isoterma de adsorción

El compuesto denominado Ff35 es un derivado de la molécula MN58b que forma parte de la familia de los inhibidores simétricos del enzima colina quinasa  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ). Los cambios bioisostéricos introducidos en la estructura inicial de MN58b para la obtención de Ff35, en la cual los átomos de carbono han sido sustituidos por átomos de nitrógeno y azufre, incrementan la solubilidad de la molécula, así como su especificidad por el enzima ChoK $\alpha 1$ .

La cinética de adsorción de la molécula de Ff35 sobre las BMNPs se realizó con el objetivo de determinar el tiempo de adsorción necesario para que la reacción alcance el equilibrio. Para ello, se prepararon diferentes alícuotas compuestas por 5 mg de BMNPs suspendidas en 100  $\mu$ M de Ff35 disuelto en tampón HEPES. Las mezclas se mantuvieron a 25 °C en agitación suave en una noria durante diferentes periodos de tiempo hasta 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las BMNPs funcionalizadas con Ff35 (denominadas Ff35-BMNPs) se recogieron magnéticamente y se lavaron dos veces con

el tampón HEPES. El contenido de Ff35 de todas las suspensiones correspondientes a los sobrenadantes y lavados se evaluó mediante espectroscopía UV-Vis ( $\lambda = 304$  nm) utilizando curvas estándar. La absorptividad molar de Ff35 a  $\lambda = 304$  nm fue de 2677.5 L/mol ( $R^2 = 0.9991$ ), calculada a partir de la pendiente de una recta de calibración elaborada con concentraciones crecientes de Ff35 en tampón HEPES. La cantidad de Ff35 adsorbido a las BMNPs se determinó a partir de la diferencia entre las cantidades obtenidas al medir los sobrenadantes y lavados (cantidades correspondientes a moléculas no adsorbidas) y la concentración inicial de Ff35 al inicio de la incubación. Finalmente, las nanopartículas funcionalizadas se suspendieron en tampón HEPES y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Se realizaron más de tres experimentos independientes para cada uno de los tiempos ensayados.

La isoterma de adsorción de la molécula de Ff35 sobre las BMNPs se realizó con el objetivo de determinar la concentración de saturación de Ff35 adsorbido en las BMNPs. Para ello, se prepararon diferentes alícuotas compuestas por 5 mg de BMNPs suspendidas en concentraciones crecientes de Ff35 disuelto en tampón HEPES (desde 0 a 200  $\mu$ M). Las mezclas se mantuvieron a 25 °C en agitación suave durante 6 horas (tiempo requerido para alcanzar el equilibrio, en base a los resultados de la cinética de adsorción). Transcurrido el tiempo de incubación, las BMNPs funcionalizadas se recogieron y lavaron, así como se realizaron las medidas de espectroscopía UV-Vis de acuerdo a lo explicado anteriormente. Se realizaron más de tres experimentos independientes para cada punto de la isoterma de adsorción y los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Langmuir-Freundlich (LF) utilizando el programa *Origin Pro8* (OriginLab), el cual considera que la energía de adsorción no es la misma para toda la superficie de la nanopartícula (es decir, la superficie es heterogénea) e incluye una condición de adsorción en la que se considera la interacción entre las moléculas de adsorbato (cooperatividad). Este modelo se basa en la Ecuación (4), donde ( $Q$ ) es la cantidad de molécula adsorbida por unidad de masa de adsorbente (BMNPs), ( $C_e$ ) es la cantidad de molécula no adsorbida, ( $Q_{max}$ ) es la capacidad máxima de carga de la molécula, ( $K_{LF}$ ) es la constante de afinidad de LF y ( $r$ ) es el coeficiente de cooperatividad. Los valores de  $r < 1$  indican una cooperatividad negativa, mientras que valores de  $r > 1$  indican una cooperatividad positiva (Langmuir 1918; Rodríguez-Ruiz et al. 2013; Turiel et al. 2003).

$$Q = \frac{Q_{max} (K_{LF} \cdot C_e)^r}{1 + (K_{LF} \cdot C_e)^r} \quad (4)$$

## 4.4. Adsorción de AS-48 sobre BMNPs

### 4.4.1. Estudio del modelo de unión: cinética e isoterma de adsorción

La cinética de adsorción de AS-48 sobre BMNPs se determinó siguiendo el mismo protocolo a lo descrito en el *apartado 4.3.1*. Para ello, se prepararon diferentes alícuotas compuestas por 5 mg de BMNPs suspendidas en 100  $\mu\text{M}$  de AS-48 disuelta en tampón HEPES. Las mezclas se mantuvieron a 25  $^{\circ}\text{C}$  en agitación suave en una noria durante diferentes periodos de tiempo hasta 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las BMNPs funcionalizadas con AS-48 (denominadas AS-48-BMNPs) se recogieron magnéticamente y se lavaron dos veces con el tampón HEPES. El contenido de AS-48 de todas las suspensiones correspondientes a los sobrenadantes y lavados se evaluó mediante espectroscopía UV-Vis ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) para la determinar la cantidad de AS-48 no adsorbida ( $C_e$ ) y la cantidad de AS-48 adsorbida por unidad de masa de adsorbente ( $Q$ ). Se realizaron más de tres experimentos independientes para cada uno de los tiempos ensayados. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de Lagergren (Ecuación (5)), donde ( $\tau$ ) es el tiempo necesario para alcanzar aproximadamente el 63% de la capacidad de carga de las BMNPs ( $Q_{max}$ ) (Lagergren 1898; Rodríguez-Ruiz et al. 2013).

$$Q(t) = Q_{max} \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (5)$$

La isoterma de adsorción de AS-48 sobre BMNPs se determinó siguiendo el mismo protocolo descrito en el *apartado 4.3.1*. Para ello, se prepararon diferentes alícuotas compuestas por 5 mg de BMNPs suspendidas en concentraciones crecientes de AS-48 disuelto en tampón HEPES (desde 0 a 200  $\mu\text{M}$ ), las cuales fueron tratadas siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior. Se realizaron un total de más de tres experimentos independientes para cada punto de la isoterma de adsorción y los datos obtenidos se ajustaron al modelo LF, tal y como se indica en el *apartado 4.3.1*.

### 4.4.2. Estudio del modelo de desunión: cinética de liberación

La estabilidad de los nanosistemas AS-48-BMNPs se evaluó mediante el análisis de la cinética de liberación de la bacteriocina AS-48 adsorbida a las BMNPs a lo largo del tiempo a pH 7,4 (tampón HEPES). Para ello, las suspensiones de AS-48-BMNPs se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$ , en agitación suave, durante diferentes intervalos de tiempo hasta un máximo de 96 horas. En cada tiempo específico de medida, se recogieron y lavaron, así

como se realizaron las medidas de espectroscopía UV-Vis de acuerdo a lo explicado anteriormente. La eficiencia de liberación ( $D_R$ ) se define según la Ecuación (6), como la relación, en porcentaje, entre la cantidad de moléculas adsorbidas liberadas en un tiempo fijo  $t$  ( $Q(t)$ ) y la capacidad de carga de la molécula,  $Q_{max}$  (García Rubia et al. 2018; Rodríguez-Ruiz et al. 2013).

$$D_R = \frac{Q(t)}{Q_{max}} \times 100 \quad (6)$$

## **5. Estudio y caracterización de las formulaciones desarrolladas**

### **5.1. Difractometría de rayos X (XRD)**

La mineralogía de los sólidos obtenidos en cada uno de los experimentos de biomineralización (MNPs, BMNPs, Lys-MNP y Arg-MNP) se determinó mediante el análisis de los sólidos liofilizados usando el difractómetro *Xpert Pro X-ray* (PANalytical) utilizando radiación Cu K $\alpha$ . El rango de escaneo fue de 20 a 60 grados en  $2\theta$  (0,01 grado/paso; 3 segundos por paso). El análisis de los datos y la identificación de los sólidos se realizaron utilizando el programa *XPowder*.

### **5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

El estudio del tamaño y la morfología de las partículas de magnetita obtenidas se realizó empleando un microscopio electrónico de transmisión (TEM del inglés *Transmission Electron Microscopy*) *LIBRA 120 PLUS* (Carl Zeiss SMT) y un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM del inglés *High Resolution Transmission Electron Microscopy*) *TITAN G2 80-300* (FEI).

#### **5.2.1. Preparación de nanopartículas de magnetita**

Las nanopartículas se deshidrataron utilizando etanol absoluto (J.T. Baker) y, posteriormente, se embebieron en resina *EMbed 812* (Fisher Scientific). El bloque de resina resultante se cortó en secciones ultra delgadas (de 50 a 70 nm) con la ayuda de un ultramicrotomo *Reichert Ultracut S* (Leica Microsystems). Las láminas obtenidas se



depositaron sobre una rejilla de cobre de microscopía electrónica. Por último, se procedió al recubrimiento de las rejillas con carbón (Evaporador *EMITECH K975X*) para su metalización. Toda la preparación se realizó en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

### 5.2.2. Preparación de magnetoliposomas y liposomas

Las suspensiones de liposomas y magnetoliposomas se agitaron en un agitador tipo vórtex durante 5 min. A continuación, para cada muestra, se depositaron gotas de la suspensión sobre una rejilla de cobre con película de *formvar* y se tiñeron mediante de tinción negativa con acetato de uranilo (Fisher Scientific). Por último, las rejillas se secaron en un horno de convección. Toda la preparación se realizó en el CIC de la Universidad de Granada.

### 5.2.3. Cálculo de distribución de tamaño

El estudio y análisis del tamaño de las nanopartículas, liposomas y magnetoliposomas sintetizados se realizó a partir de las micrografías de TEM empleando el programa *Image J 1.47*. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, los tamaños de nanopartícula se obtuvieron mediante el uso de múltiples imágenes en las que se midieron, al menos, 1000 partículas por cada experimento. Del mismo modo, con el objetivo de asegurar la reproducibilidad, los tamaños de liposoma/magnetoliposoma se obtuvieron de múltiples imágenes midiendo, al menos, 200 liposomas/magnetoliposomas por experimento. Los datos obtenidos se utilizaron para el cálculo de las curvas de distribución de tamaño.

### 5.2.4. Microscopio electrónico de alta resolución (HR-TEM): difracción de electrones del área seleccionada (SAED)

El estudio de la morfología y el espaciamento  $d$  de los sólidos sintetizados se analizó mediante la técnica de difracción de electrones de área seleccionada (SAED del inglés *Selected Area Electron Diffraction*). Los espaciados  $d$  se midieron utilizando micrografías de HR-TEM tomadas con un aumento de 500 kX, y la dirección cristalográfica se determinó por comparación de los datos recolectados con los datos de magnetita presentes la página web del Proyecto *RRUFF* (<http://rruff.info/ams/amcsd.php>).

### **5.3. Análisis termogravimétrico (TGA)**

Los termogramas de los diferentes tipos de nanopartículas de magnetita se realizaron en un equipo *TGA/DSC1* (Mettler-Toledo) calentando las muestras desde temperatura ambiente hasta 900 °C a una velocidad constante de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de N<sub>2</sub>. Para cada medida, se utilizaron aproximadamente 10 mg de polvo liofilizado de cada muestra.

### **5.4. Carga superficial: potencial- $\zeta$**

La carga superficial de las diferentes nanopartículas y nanosistemas a diferentes pH se analizó mediante medidas de potencial- $\zeta$  utilizando un instrumento de medida de dispersión de luz dinámica *Zetasizer Nano Zs* (Malvern Instruments). Las muestras se prepararon formando suspensiones diluidas de las nanopartículas y nanosistemas en una disolución de NaClO<sub>4</sub> (10 mM, Sigma Aldrich) libre de oxígeno. El pH de las diferentes suspensiones se ajustó a valores enteros de pH comprendidos en el intervalo de 2-9, añadiendo pequeños volúmenes de disoluciones libres de oxígeno de NaOH (0.1 M) y HCl (0.1 M, Scharlau). Las muestras se sonicaron en un baño de ultrasonidos (Selecta) durante 2 minutos antes de cada medición. Cada una de las medidas se realizó por triplicado a 25 °C utilizando cubetas desechables. Los valores de potencial- $\zeta$  se calcularon usando el programa *Malvern Zetasizer* (Malvern Instruments).

### **5.5. Radio hidrodinámico**

El radio hidrodinámico de las diferentes nanopartículas y nanosistemas se analizó utilizando un instrumento de medida de dispersión de luz dinámica *Zetasizer Nano Zs* (Malvern Instruments). Las muestras se prepararon formando suspensiones diluidas de las nanopartículas y nanosistemas en una disolución de NaClO<sub>4</sub> (10 mM, Sigma Aldrich) libre de oxígeno a pH 7,4. Las muestras se sonicaron en un baño de ultrasonidos (Selecta) durante 2 minutos antes de las mediciones. Cada una de las medidas se realizó por triplicado a 25 °C utilizando cubetas desechables.

## 5.6. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

El estudio de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) se llevó a cabo mediante el uso de un espectrómetro *FT-IR 6000* (Jasco), equipado con una ventana de cristal de diamante de reflexión total atenuada (*ATR ProOne*, Jasco). Para ello, una pequeña porción de sólido liofilizado se colocó sobre el cristal de diamante del espectrómetro donde se comprimió para la realización de las medidas. Los espectros se registraron en el intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Los resultados se expresaron como el promedio de 100 acumulaciones.

## 5.7. Propiedades magnéticas

### 5.7.1. Enfriamiento de campo cero (ZFC-W) y enfriamiento de campo (FC-C)

Las medidas de enfriamiento de campo cero (ZFC-W del inglés *Zero-Field Cooling*), así como las medidas de enfriamiento de campo (FC-C del inglés *Field Cooling*), se realizaron en un magnetómetro superconductor de interferencia cuántica (SQUID) *MPMS XL* (Quantum Design). Bajo una corriente suave de Ar, diferentes cantidades de muestra liofilizada (nanopartículas, nanosistemas y/o nanformulaciones) se introdujeron en una cápsula de policarbonato. La cantidad de muestra utilizada varió, dependiendo del experimento, en un intervalo comprendido entre 0.5- 5 mg. Las muestras se enfriaron en ausencia de campo hasta 5 K con el objetivo de preservar la magnetización aleatoria de las muestras. A continuación, se aplicó un campo magnético de 500 Oe y las muestras se calentaron hasta 300 K. Posteriormente, desde este punto, las muestras se enfriaron hasta 5 K manteniendo el campo activo. Todas las curvas obtenidas se normalizaron respecto a la masa (mg) de cada muestra, así como por el valor de magnetización de dicha muestra a 300 K, con el objetivo de poder establecer comparaciones entre las diferentes muestras analizadas. La temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) se definió como aquella en la que se produce la máxima magnetización en las curvas ZFC-W. La temperatura de irreversibilidad ( $T_{irr}$ ) se definió como la temperatura debajo de la cual las nanopartículas superparamagnéticas no se encontraban equilibradas térmicamente (punto en el que se separan las curvas ZFC-W y FC-C).

### **5.7.2. Ciclo de histéresis**

Los ciclos de histéresis se registraron en el mismo magnetómetro superconductor de interferencia cuántica (SQUID) *MPMS XL* (Quantum Design). La preparación de las muestras fue idéntica a la descrita en el apartado 5.7.1. Los ciclos de histéresis magnética se realizaron a 5 y 300 K.

## **5.8. Estabilidad coloidal**

La estabilidad coloidal de las diferentes muestras analizadas (nanopartículas de magnetita, nanosistemas y nanoformulaciones) se determinó mediante el registro óptico del proceso de sedimentación. Para ello, las muestras se agitaron en un agitador tipo vórtex durante 1 minuto (tiempo cero del experimento) y, posteriormente, se dejaron sedimentar. Para cada experimento, se consideró el tiempo final como aquel tiempo en el que toda la muestra se encontraba sedimentada al final de tubo. La recogida de los datos de estabilidad (altura y volumen de muestra) se realizó a partir del análisis y procesado de fotografías obtenidas en diferentes intervalos de tiempo. La estabilidad coloidal se expresó como la fracción de volumen local de muestra sedimentada (comparada con el valor inicial) en función del tiempo.

## **5.9. Hipertermia magnética**

Los experimentos de hipertermia magnética se realizaron utilizando un generador de corriente alterna con una bobina doble de 5 vueltas, 20 mm de diámetro y 50 mm de longitud, compuesta de un tubo de cobre y refrigerada por agua a 20 °C a un flujo de 800 mL/min. Las medidas se realizaron utilizando diferentes frecuencias e intensidades de campo (recogidas en la Tabla 8), medidas en el centro de la bobina con una sonda (NanoScience Laboratories) de 10  $\mu$ T de resolución. El incremento de temperatura de las muestras se midió cada 3 segundos mediante un termómetro *Fotemp-4H* (Optocom) con un sensor de fibra óptica *TS3* con una precisión de 0,2 °C. Todas las muestras se termostataron previamente a la realización de las medidas de hipertermia a una temperatura comprendida entre 34-37 °C.

La tasa de absorción específica (SAR del inglés *Specific Absorption Rate*, W/g) se determinó a partir de la pendiente inicial del incremento de la temperatura con respecto al tiempo ( $dT/dt$ ) utilizando la Ecuación (7):

$$\text{SAR} = \left( \frac{C \cdot V_s}{m} \right) \frac{dT}{dt} \quad (7)$$

donde  $C$  es la capacidad calorífica de la suspensión ( $C_{H_2O} = 4185 \text{ J/g/K}$ ),  $V_s$  es el volumen de la muestra y  $m$  es la masa de sólido magnético en la muestra. Además, dado que el valor SAR depende del cuadrado del campo magnético ( $H_0$  en kA / m) y de su frecuencia ( $f$  en kHz), también se calculó la potencia de pérdida intrínseca (ILP del inglés *Intrinsic Loss Power*,  $\text{nHm}^2 / \text{kg}$ ) utilizando la Ecuación (8):

$$\text{ILP} = \frac{\text{SAR}}{f H_0^2} \quad (8)$$

**Tabla 8.** Características de las muestras utilizadas en los experimentos de hipertermia magnética y los parámetros utilizados en el estudio.

Muestra	Frecuencia (kHz)	Campo (kA/m)	Concentración
MNPs	$197 \pm 5$		
BMNPs	$236 \pm 5$	$18 \pm 0,2$	25 mg/mL
60BMNPs-40MNPs	$280 \pm 5$		
25BMNPs-75MNPs			
ML-BMNPs			
ML-MNPs	$197 \pm 5$	$12 \pm 0,2$	24 mg/mL
ML-60BMNPs-40MNPs			
ML-25BMNPs-75MNPs			
M	$143 \pm 5$		
TBM	$163 \pm 5$	$12.5 \pm 0,2$	30 mg/mL
60 TBM + 40 M	$205 \pm 5$		
25 TBM + 75 M	$273 \pm 5$		

*El volumen de las muestras en todos los experimentos fue de 0,5 mL.*

### **5.9.1. Efecto de la hipertermia magnética en la cinética de liberación de DOXO**

El efecto de la hipertermia magnética en la cinética de liberación del fármaco DOXO adsorbido a las BMNPs se analizó mediante la aplicación de un campo magnético de corriente alterna (AMF del inglés *Alternating Magnetic Field*) a suspensiones de nanoformulaciones DOXO-mAb-BMNPs suspendidas tanto en tampón citrato (pH 5), como en tampón HEPES (pH 7,4). La cinética de liberación de DOXO se evaluó en diferentes periodos de tiempo hasta 75 minutos. Para cada tiempo de medida, las nanoformulaciones DOXO-mAb-BMNPs se recogieron mediante decantación magnética y se volvieron a suspender en tampón fresco para continuar con las siguientes medidas. La intensidad del campo magnético se controló manualmente para garantizar una temperatura constante de  $43,0 \pm 0,5$  °C. Paralelamente, con el objetivo de poder analizar de manera individual el efecto de la hipertermia magnética, se prepararon y procesaron las mismas muestras mantenidas en un baño termostatzado a 43 °C. Se realizaron un total de 3 medidas por experimento. Los sobrenadantes obtenidos se analizaron mediante espectroscopía UV-vis ( $\lambda = 490$  nm).

### **5.9.2. Efecto de la hipertermia magnética en el recubrimiento lipídico de las nanopartículas**

El efecto de la hipertermia magnética en el recubrimiento lipídico de las nanopartículas magnéticas encapsuladas en magnetoliposomas se determinó mediante el análisis de micrografías de TEM. Las diferentes muestras de magnetoliposomas (concentración de [PC] = 6 mg/mL y una concentración de [Nanopartículas de magnetita] = 24 mg/mL) se sometieron a la aplicación de un AMF ( $f = 197$  kHz,  $H_0 = 3 - 12$  kA / m) durante 1, 10 y 30 minutos. Posteriormente, una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, las muestras se prepararon y procesaron, tal y como se describe en el apartado 5.2.2. Las imágenes de TEM obtenidas se compararon con aquellas procedentes de las muestras control (muestras de magnetoliposomas sin AMF aplicado).

## **5.10. Tomografía de sonda atómica**

La caracterización a escala atómica de la composición química de los sólidos de magnetita se realizó empleando la novedosa técnica de tomografía de sonda atómica (APT del inglés *Atom Probe Tomography*), para identificar y cuantificar la presencia de

moléculas orgánicas en el interior de la red cristalina del mineral. Para ello, las muestras (denominadas “puntas de APT”) se fabricaron mediante la técnica de haz de iones focalizados (FIB del inglés *Focused Ion Beam*) descrita previamente en Thompson et al. 2007. Las muestras se analizaron empleando un instrumento *LEAP 5000XS* (Cameca Instruments), equipado con un láser pulsado de fibra de picosegundos de 355 nm. Las muestras analizadas mediante esta metodología fueron las siguientes: magnetosomas purificados de la MTB *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (Bazylnski et al. 1994; Prozorov et al. 2014), MNPs (sintetizadas en ausencia de tampón carbonato), MNPs (sintetizadas en ausencia de tampón carbonato) lavadas con SDS, BMNPs, ML-MNPs y ML- BMNPs.

## 6. Estudios *in vitro*: cáncer

### 6.1. Cultivos celulares

#### 6.1.1. HepG2

Las células HepG2 (ATCC<sup>®</sup> HB-8065<sup>™</sup>) constituyen una línea celular derivada de hepatoblastoma humano. Las células se cultivaron en medio mínimo esencial de *Eagle* (MEM del inglés *Minimum Essential Medium*, Sigma Aldrich), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS del inglés *Fetal Bovine Serum*, Sigma Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma Aldrich), 100 U/mL de penicilina (Sigma Aldrich) y 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich), a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se sub-cultivaron dos veces por semana, cuando presentaban una confluencia de 80-90%.

#### 6.1.2. HT-29

Las células HT-29 (ATCC<sup>®</sup> HTB-38<sup>™</sup>) constituyen una línea celular derivada de adenocarcinoma colorrectal humano. Las células se cultivaron en medio MEM (Sigma Aldrich), suplementado con 10% de FBS (Sigma Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma Aldrich), 100 U/mL de penicilina (Sigma Aldrich) y 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich), a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se sub-cultivaron dos veces por semana, cuando presentaban una confluencia de 80-90%.

## **6.2. Citotoxicidad y proliferación celular**

### **6.2.1. Ensayo colorimétrico mediante Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT)**

El ensayo colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma Aldrich) se basa en la reducción metabólica del compuesto MTT en un compuesto coloreado de color azul (formazán).

Las células HepG2 se sembraron en placas de 96 pocillos ( $10^4$  células/pocillo) durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, el medio se reemplazó por diferentes concentraciones de Ff35 soluble (1, 5 y 10  $\mu$ M, control positivo), BMNPs (300  $\mu$ g/mL) y Ff35-BMNPs (1  $\mu$ M de Ff35 y 300  $\mu$ g/mL de BMNPs), suspendidos en medio fresco. Las muestras se incubaron durante diferentes intervalos de tiempo hasta 48 horas.

Las células HT-29 se sembraron en placas de 96 pocillos ( $10^4$  células/pocillo) durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, el medio se reemplazó por diferentes concentraciones de BMNPs (BM), MNPs (M), TBM, 60 TBM + 40 M y 25 TBM + 75 M (150 y 300  $\mu$ g/mL), suspendidos en medio fresco. Además, las células se incubaron con cantidades equimolares de DOXO soluble adsorbida a los nanosistemas (control positivo). Las muestras se incubaron durante 72 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT. Para ello, se añadieron 20  $\mu$ L de solución de MTT (a una concentración de 5 mg/mL disuelto en tampón fosfato) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. A continuación, los sobrenadantes eliminaron cuidadosamente y se añadieron 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán formados. La absorbancia se midió a  $\lambda = 570$  nm utilizando el lector de multiplaca *Sinergy HTX Microplate Reader* (BioTek Instruments). Se realizaron un total de tres medidas independientes por experimento utilizando tres réplicas por cada muestra ensayada.

En ambos casos, los valores de viabilidad obtenidos en los diferentes tratamientos se normalizaron con respecto a los valores de viabilidad de cultivos control de células no tratadas (100% de viabilidad).



### 6.2.2. Medida de la concentración media inhibitoria del crecimiento (GI<sub>50</sub>)

La GI<sub>50</sub> se define como la concentración de compuesto necesaria para detectar un 50% de inhibición en la proliferación celular. Para su determinación, las células HepG2 se sembraron en placas de 96 pocillos (10<sup>4</sup> células/pocillo) durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, el medio se reemplazó por diferentes concentraciones de Ff35 soluble (0, 5 y 10 μM) y las muestras se incubaron durante diferentes intervalos de tiempo hasta 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT descrito en el *apartado 6.2.1*. El cálculo de la GI<sub>50</sub> se realizó utilizando una curva de dosis-respuesta sigmoidea (programa *ED50plus 1.0.*) construida a partir de los datos de viabilidad obtenidos para las diferentes concentraciones del inhibidor.

### 6.2.3. Estudio del efecto de la hipertermia magnética en la viabilidad celular

Las células HepG2 se sembraron en placas de 96 pocillos (10<sup>4</sup> células/pocillo) durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, el medio se reemplazó por diferentes concentraciones de BMNPs (300 μg/mL) y Ff35-BMNPs (1 μM de Ff35 y 300 μg/mL de BMNPs), suspendidos en medio fresco. Las muestras se incubaron durante 24 horas y, transcurrido el tiempo de incubación, se expusieron a un AMF ( $f = 197$  kHz,  $H_0 = 21$  kA / m) durante diferentes intervalos de tiempo hasta 3 horas.

Las células HT-29 se sembraron en placas de 96 pocillos (10<sup>4</sup> células/pocillo) durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, el medio se reemplazó por diferentes concentraciones de MNPs (M), TBM y 25 TBM + 75 M (300 μg/mL), suspendidos en medio fresco. Las muestras se incubaron durante 24 horas y, transcurrido el tiempo de incubación, se expusieron a un AMF ( $f = 197$  kHz,  $H_0 = 21$  kA / m) durante 2 horas.

Finalmente, se evaluó el efecto de la hipertermia magnética en la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT descrito en el *apartado 6.2.1*. En ambos casos, se realizaron un total de tres medidas independientes por experimento utilizando tres réplicas por cada muestra ensayada.

### **6.3. Estudio de la interacción celular de las formulaciones: internalización, mecanismo de acción y especificidad**

#### **6.3.1. Internalización celular**

El estudio de la internalización celular de las nanopartículas y los nanosistemas se llevó a cabo mediante TEM. Para ello, las células HepG2 se sembraron en placas de 6 pocillos (aproximadamente  $10^6$  células/pocillo) durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, el medio se reemplazó por diferentes concentraciones de BMNPs (300 µg/mL) y Ff35-BMNPs (1 µM de Ff35 y 300 µg/mL de BMNPs) suspendidos en medio fresco, así como en el caso de los controles (células sin tratar), se reemplazó por medio fresco. Las muestras se incubaron durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron cuidadosamente con tampón fosfato fresco, se tripsinizaron y centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. El sedimento de células obtenido se fijó utilizando una mezcla compuesta por 2,5% de glutaraldehído y 2% de paraformaldehído disueltos en tampón cacodilato 0,05 M durante 4 horas a 4 °C. Seguidamente, las células se lavaron tres veces con tampón cacodilato y se fijaron en una solución acuosa compuesta por 1% de OsO<sub>4</sub> y 1% de ferrocianuro de potasio a durante 4 horas 4 °C en oscuridad. Posteriormente, las células se sometieron a diferentes lavados secuenciales utilizando 15% de ácido tánico disuelto en tampón cacodilato, tampón cacodilato y, por último, agua. Las muestras se mantuvieron durante dos horas en una disolución compuesta por 2% de acetato de uranilo y, seguidamente, se lavaron abundantemente con agua. Tras esto, se procedió a la deshidratación de las muestras con soluciones crecientes de etanol (de 50% al 100%) a 4 °C. Finalmente, las muestras se incluyeron en resina *EMbed* y el bloque de resina resultante se cortó en secciones ultra delgadas (de 50 a 70 nm) con la ayuda de un ultramicrotomo *Reichert Ultracut S*. Las láminas obtenidas se depositaron sobre una rejilla de cobre de microscopía electrónica y se tiñeron con acetato de uranilo y con citrato de plomo. Las muestras preparadas se analizaron usando el microscopio electrónico *LIBRA 120 PLUS*.

#### **6.3.2. Inhibición del enzima colina quinasa $\alpha 1$ (ChoK $\alpha 1$ )**

El efecto del quimioterápico Ff35 sobre el enzima colina quinasa  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ) se evaluó utilizando el enzima ChoK $\alpha 1$  y siguiendo el protocolo descrito previamente por Schiaffino-Ortega et al. 2016. Este protocolo se basa en la determinación de la tasa de

incorporación de  $^{14}\text{C}$  procedente del compuesto ( $^{14}\text{C}$ )-metil-colina en el compuesto fosfocolina, tanto en ausencia (control) como en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor (Ff35). Para ello, se preparó el tampón de reacción (Tris 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, ATP 10 mM, 20 ng de ChoK $\alpha$ 1 purificada, pH 8,5) y la reacción se inició añadiendo 1 mM de ( $^{14}\text{C}$ )-metil-colina y se dejó incubar durante 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, el ensayo se detuvo mediante la inmersión de los tubos de reacción en agua hirviendo durante 3 minutos. Las alícuotas obtenidas se resolvieron por cromatografía en capa fina utilizando placas de sílice como soporte y como fase móvil el tampón compuesto por metanol / 0,6% NaCl / 28%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Sigma Aldrich) en agua (50:50:5, v/v/v). Además, como control, se resolvieron en paralelo estándares sintéticos de fosfocolina (0,1 mg) y colina (0,1 mg). Finalmente, la fosfocolina se visualizó bajo exposición al vapor de yodo y los puntos correspondientes se rasparon y transfirieron a viales de centelleo para medir la radiactividad utilizando un contador de centelleo líquido *Beckman 6000-TA* (Beckman). El cálculo de las concentraciones medias inhibitorias  $\text{IC}_{50}$  se realizó utilizando una curva de dosis-respuesta sigmoidea (programa *ED50plus 1.0.*) construida a partir de los datos de porcentaje de actividad enzimática obtenidos para las diferentes concentraciones del inhibidor.

### 6.3.3. Inhibición de la absorción celular de colina

El efecto del quimioterápico Ff35 y del nanosistema Ff35-BMNPs sobre la toma de colina se evaluó utilizando el enzima ChoK $\alpha$ 1 y siguiendo el protocolo descrito previamente por Jiménez-López et al. 2002. Para ello, las células HepG2 se sembraron a 37 °C en medio MEM que presentaba concentraciones de Ff35 soluble (0,5 y 1  $\mu\text{M}$ ), BMNPs (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y Ff35-BMNPs (0,5  $\mu\text{M}$  de Ff35 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BMNPs o 1  $\mu\text{M}$  de Ff35 y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BMNPs). Las muestras se incubaron durante diferentes intervalos de tiempo hasta 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se expusieron inmediatamente después a un pulso de ( $^{14}\text{C}$ )-metil-colina (16  $\mu\text{M}$ , 31 Ci / mol por pocillo) durante 5 minutos a 37 °C. Para detener la incorporación de colina, los sobrenadantes se eliminaron cuidadosamente y las células se lavaron dos veces con tampón fosfato frío que contenía colina 580  $\mu\text{M}$ . Finalmente, las células se solubilizaron en NaOH 0.1 N y se tomaron alícuotas para determinar la cantidad total de colina radiomarcada absorbida mediante la técnica de centelleo líquido utilizando un contador *Beckman 6000-TA* (Beckman).

## 7. Estudios *in vitro*: enfermedades infecciosas

### 7.1. Cepas y condiciones de cultivo

Las bacterias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Klebsiella pneumoniae* LMG20218 y *Escherichia coli* LMG15862 y las bacterias Gram-positivas *E. faecalis* S-47 (Gálvez et al. 1989), *E. faecium* LMG 16003 and *Staphylococcus aureus* CECT 239 se cultivaron a 37 °C en medio Caldo Tripticaseína de Soja (TSB, VWR) o en Agar Tripticaseína de Soja (TSA, 2 % agar).

### 7.2. Citotoxicidad *in vitro* en cultivos plantónicos

#### 7.2.1. Determinación de la actividad antibacteriana a largo plazo

El estudio de la actividad antimicrobiana de las muestras y condiciones detalladas en la Tabla 9, se efectuó tal y como se describe a continuación, utilizando las cepas bacterianas enumeradas en el apartado 7.1.

Para su desarrollo, se partió de un cultivo crecido durante toda la noche en medio TSA para la preparación de una suspensión de NaCl estéril al 0.9%, cuya turbidez se ajustó a 0,5 de la escala de McFarland. Dicha suspensión se diluyó 100 veces en medio TSB y se incubó en paralelo a 37 °C y 45 °C en TSB sin BMNPs (*Culture37* y *Culture45*, respectivamente) y con 10 mg/mL de BMNPs a 37 y 45 °C (*BMNP37* y *BMNP45*, respectivamente). Además, esta suspensión bacteriana se mezcló con 10 mg/mL de BMNPs y se expuso a un AMF para alcanzar una temperatura de 45 °C, temperatura a la cual se mantuvo durante todo el experimento (*BMNP + AMF*). Todas las condiciones descritas anteriormente se utilizaron como controles de crecimiento.

Las suspensiones bacterianas se trataron con 10 mg/mL de AS-48-BMNPs y se incubaron a 37 °C (*AS-48-BMNP37*) o a 45 °C (*AS-48-BMNP37*). Por último, otra alícuota de la suspensión bacteriana tratada con 10 mg/mL de AS-48-BMNPS se expuso a un AMF para alcanzar una temperatura de 45 °C, temperatura a la cual se mantuvo durante todo el transcurso del experimento (*AS-48-BMNP + AMF*).

Por otro lado, se utilizó una cámara termográfica *FLIR 60* (FLIR Systems) para la realización de la medida de la temperatura alcanzada por las nanopartículas y los

nanosistemas en aquellas suspensiones expuestas a un AMF ( $f = 140$  kHz,  $H_0 = 22$  kA / m). Dicha cámara presenta una resolución IR de 320 x 240 píxeles y una sensibilidad térmica de  $< 0.045$  °C.

**Tabla 9.** Descripción y nomenclatura de las condiciones ensayadas en los experimentos de citotoxicidad en cultivos plantónicos.

<b>Nomenclatura</b>	<b>Descripción</b>
Culture37	Suspensión bacteriana diluida en medio TSB (T = 37 °C)
Culture45	Suspensión bacteriana diluida en medio TSB (T = 45 °C)
BMNP37	Suspensión bacteriana diluida en medio TSB y mezclada con 10 mg/mL de BMNPs (T = 37 °C)
BMNP45	Suspensión bacteriana diluida en medio TSB y mezclada con 10 mg/mL de BMNPs (T = 45 °C)
BMNP + AMF	Suspensión bacteriana diluida en medio TSB y mezclada con 10 mg/mL de BMNPs expuesta a AMF (T = 45 °C)
AS-48-BMNP37	Suspensión bacteriana diluida en medio TSB y mezclada con 10 mg/mL de AS-48-BMNPs (T = 37 °C)
AS-48-BMNP45	Suspensión bacteriana diluida en medio TSB y mezclada con 10 mg/mL de AS-48-BMNPs (T = 45 °C)
AS-48-BMNP + AMF	Suspensión bacteriana diluida en medio TSB y mezclada con 10 mg/mL de AS-48-BMNPs expuesta a AMF (T = 45 °C)

En todas las condiciones ensayadas, los cultivos bacterianos se trataron durante 90 minutos. Durante el desarrollo del experimento, se retiraron alícuotas de 10 uL en los intervalos de 0, 15, 30, 60 y 90 minutos. Estas muestras se diluyeron en NaCl estéril al 0,9% y se sembraron en TSA por triplicado. Transcurridas 24 horas de incubación a 37 °C, se realizó el recuento de las colonias obtenidas. En todos los casos, se realizaron un total de, al menos, tres medidas independientes por experimento.

### 7.2.2. Determinación del efecto de la hipertermia a corto plazo

Con el objetivo de evaluar el efecto de la hipertermia magnética sobre las bacterias Gram-negativas, se prepararon diferentes suspensiones de estas bacterias, tal y como se describe en el apartado 7.2.1., y se mezclaron con 10 mg/mL de BMNPs. Dichas mezclas se expusieron a un AMF ( $f = 140$  kHz,  $H_0 = 22$  kA / m) durante 30 minutos. A

continuación, se añadieron de manera inmediata dos concentraciones diferentes de AS-48 (5 y 50  $\mu\text{M}$ ) o medio TSB (utilizado como control negativo). Posteriormente, los cultivos se incubaron durante 5 minutos adicionales y se sembraron en placas de TSA. En todos los casos, se realizaron un total de tres medidas independientes por experimento.

## **8. Análisis estadísticos**

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se procesaron y analizaron mediante el estadístico ANOVA monofactorial o bifactorial, seguido de la realización de la prueba de Tuckey, Bonferroni y/o Scheffé para comparaciones múltiples entre grupos. Los análisis se realizaron utilizando los programas *GraphPad Prism 5* (GraphPad) u *Origin Pro8* (OriginLab). Las diferencias estadísticas entre los distintos experimentos se consideraron significativas cuando los valores de  $p$  fueron  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) o  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

# **CAPÍTULO I**





*Este artículo se ha publicado en la revista indexada en JCR: Crystal Growth & Design*

*(<https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b01590>)*

## **Protein Conservation Method Affects MamC-Mediated Biomineralization of Magnetic Nanoparticles**

Ylenia Jabalera<sup>1</sup>, Salvador Casares Atienza<sup>2</sup>, Antonia Fernández-Vivas<sup>1</sup>, Ana Peigneux<sup>1</sup>, Ana I. Azuaga Fortes<sup>\*2</sup>, and Concepción Jimenez-Lopez<sup>\*1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Química-Física. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18071 Granada, Spain

\*Corresponding authors

### **Abstract**

Magnetite nanoparticles in the magnetosomes formed by magnetotactic bacteria present unique magnetic properties that make them the ideal nanoparticle with potential use in several biotechnological applications. These magnetoliposomes are organelles formed by crystals of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) or greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) surrounded by a lipid bilayer. However, scaling-up the production of these nanoparticles cannot be achieved currently because of the slow growth and the strict physiological characteristics of the magnetotactic bacteria. An alternative to solve this problem is the biomimetic approach, which involves the *in vitro* production of magnetite nanoparticles mediated by magnetosome membrane proteins, expressed as recombinant. MamC-mediated magnetite nanoparticles (BMNPs) have been recently proposed as some of the best biomimetic (magnetosome-like) nanoparticles for potential use in targeted drug delivery and hyperthermia treatments. However, the production of these crystals still needs to be scaled up. One of the critical steps in this scaling-up process is to find a method to keep the protein used as a template, MamC, fully functional over time, so that large amounts of protein could be purified at

once. Since it has been previously demonstrated that the function of MamC in producing nanoparticles with optimal conditions is strictly linked to its structure, much care needs to be paid to ensure that such a structure is not affected by the protein preservation method. In the present study, MamC was produced and preserved under different conditions (lyophilization, cryoconservation and refrigeration) for different time intervals. The efficiency of each preservation treatment was evaluated by studying MamC conformation and oligomerization state and by analyzing the biomimetic crystals formed in the presence of this specific protein. Among all the methodologies assayed, only cryopreservation was able to keep the correct MamC structure and oligomerization state and, therefore, its activity.

## Introduction

One of the biomineralization processes that has emerged as highly interesting in the nanotechnological sector is magnetosome production by magnetotactic bacteria. These microorganisms are a heterogeneous group able to form magnetosomes, which are organelles consisting of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) or greigite ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) crystals surrounded by a lipid bilayer.<sup>1-4</sup> The crystals resulting from this genetically controlled process present magnetic, chemical, and physical features (narrow size distribution, high chemical purity, single magnetic domain and/or biocompatibility) that make them the ideal magnetic nanoparticle.<sup>5-7</sup> Because of this, several studies have highlighted the potential of magnetosomes as, among other applications, contrast agents for magnetic resonance image (MRI),<sup>8,9</sup> hyperthermia agents,<sup>10</sup> drug delivery systems,<sup>9,11</sup> DNA extraction reagents,<sup>12</sup> biosensors<sup>12-14</sup> and agents for cell separation.<sup>12</sup>

However, one of the main drawbacks for the use of magnetosomes in biotechnology is the problem of producing them on a large scale, due to the slow growth conditioned by the strict physiological characteristics of magnetotactic bacteria.<sup>15</sup> One of the alternatives to overpass this bottleneck is biomimetics, *i.e.*, the *in vitro* production of magnetosome-like magnetic nanoparticles. This approach involves the use of magnetosome proteins, expressed as recombinant, that *in vivo* seem to control the size and morphology of the crystals for the *in vitro* production of magnetite nanoparticles. Some of the proteins used so far to more or less extent are Mms5, Mms6, Mms7, MamR, MamC, MamF, MamS and MmsF.<sup>16-24</sup> One interesting feature common to all of them is

the presence of acidic regions with the potential to bind iron cations and mediate the formation of magnetite crystals through an ionotropic effect. In this context, much research has been done with Mms6,<sup>25–29</sup> although other magnetosome proteins have been proposed to also mediate *in vitro* the formation of magnetite: MamC,<sup>19,30–32</sup> MamP,<sup>33</sup> and MmsF.<sup>21</sup> Among them, MamC-mediated magnetite nanoparticles (BMNPs) are some of the largest superparamagnetic biomimetic magnetic nanoparticles that also present some of the largest magnetic moments per particle, which allows an efficient transport to the desired site following upon the application of an external magnetic field. They are cytocompatible, and MamC changes the surface charge of the nanoparticles, so that they can be functionalized by means of electrostatic interactions with different molecules, the loading and release of the relevant molecule being pH dependent.<sup>19,30,31,34</sup>

Recent studies have demonstrated that MamC controls magnetite crystal shape and size by both ionotropic and template effects. On the one hand, the acidic regions located at MamC C-terminal and loop (residues Leu57 to Gly77) can bind iron cations and create local high supersaturation areas with respect to magnetite, thus favouring the nucleation of such a phase (ionotropic effect).<sup>19,35,36</sup> On the other hand, Nudelman and co-workers<sup>31,32</sup> as well as Lopez-Moreno and co-workers<sup>30</sup> proposed a template effect based on the fact that the distance between two amino acids located at protein loop (Asp70 and Glu66) is coincident with the distance between iron atomic planes in several magnetite faces.<sup>31,37</sup> In fact, Nudelman and colleagues<sup>32</sup> demonstrated that, if the structure of MamC is somehow altered, the resulting BMNPs are indistinguishable from those produced in the absence of the protein.

Despite the advantages highlighted for these novel BMNPs, their scaled-up production is still not optimized. One of the bottlenecks in this process is the need to obtain MamC as recombinant protein every time a new batch of BMNPs is required. Indeed, obtaining these BMNPs would be much more effective if MamC could be massively produced and then efficiently and safely stored. Proteins, like any other biological reagent, are sensitive to rough handling. The extent of storage is remarkably variable and depends on the properties of the protein and the storage conditions. Therefore, finding an appropriate method to store massive amounts of MamC while keeping it functional is crucial to potentially use these BMNPs as biotechnological tools as an alternative to magnetosomes. In the present study, several conventional protein preservation methods (lyophilization, cryoconservation and refrigeration) were tested and

the adequacy of each one was evaluated by analyzing MamC conformation and oligomerization state as well as the morphology and size of the biomimetic crystals obtained in its presence.

## Experimental Section

### Expression and Purification of MamC Protein

MamC was expressed and purified as a recombinant protein following the protocol described by Valverde-Tercedor and colleagues.<sup>19</sup> *Escherichia coli* TOP10 cells were grown in 750 mL of LB broth supplemented with ampicillin (0.05 mg/mL, Sigma-Aldrich) until an optical density at 600 nm of 0.6 was obtained. Then, protein expression was induced by adding isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 2 mM for 5 h at 37 °C. Cells were harvested by centrifugation (4650 g for 15 min at 4 °C), resuspended in guanidinium lysis buffer (guanidinium hydrochloride 6 M, sodium phosphate 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.8), disrupted by sonication and ultracentrifuged (75600 g for 30 min at 4 °C). Protein purification was carried out by using a HiTrap chelating HP column (GE Healthcare) and an ÄKTA Prime Plus FPLC System (GE Healthcare). Fractions containing the protein were dialyzed against 1 L of denaturing buffer A (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, urea 6 M, pH 8.5) and diluted stepwise with buffer B (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.5) every 5 h. Finally, the eluate was dialyzed overnight against buffer B.

### MamC Conservation Methods

After purification, three conservation methods were evaluated: lyophilization, cryoconservation and refrigeration. Data obtained from these experiments were compared to those in which a sample of fresh, just purified, MamC was used (here referred as MamC control). The protocol to preserve MamC by the three different conservation methods listed above is as follows: (1) for lyophilization, MamC aliquots were frozen in liquid N<sub>2</sub> and then lyophilized for 12 h. After lyophilization, the MamC powder was stored at 4 °C. These samples are here referred as MamC Lyo. (2) For cryoconservation, MamC aliquots were frozen in liquid N<sub>2</sub> and then stored at -80 °C straightaway. These samples are here referred as MamC N<sub>2</sub>. (3) For the refrigeration method, MamC aliquots were stored at 4 °C for 15, 30, and 60 days. These samples are here referred as MamC 15 days, MamC 30 days and MamC 60 days, respectively.

## Analysis of MamC Conformation and Aggregation State

The refolding state of MamC was analyzed using circular dichroism (CD). CD analyses were carried out by using a JASCO J-715 spectropolarimeter (JASCO, Japan) equipped with a Peltier-based temperature control module. The temperature was set to 25 °C for all samples tested. Far-UV spectra (190–260 nm) were recorded using a 0.1 cm path length cuvette and the following parameters: step resolution of 2 nm, response of 1 s, bandwidth of 2 nm, scan rate of 100 nm/min, and five accumulations. A blank spectrum of the protein buffer (buffer B) was also recorded in the far-UV ranges to correct for background effects. Dynamic light scattering (DLS) measurements were recorded with a DynaPro MS-X instrument (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA) also equipped with a Peltier-based temperature control element, using a thermostated 30  $\mu$ L quartz cuvette. The temperature was set to 25 °C for all measurements. DLS data were acquired every five seconds until saturation of the signal. Dynamics v6 software was used for data collecting and processing to obtain the particle size distribution of each protein sample.

## Biom mineralization Experiments

All reagents used in the biom mineralization experiments were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions of NaOH (1 M), Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (0.5 M), FeCl<sub>3</sub> (1 M), and NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.15 M/0.15 M) were prepared using deoxygenated water. The deoxygenation process was carried out by boiling nanopurified water for 1 h and then cooling in an ice bath while continuously sparging with ultrapure N<sub>2</sub>. After that, the solution was immediately placed inside an anaerobic chamber (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI) filled with 4% H<sub>2</sub> under an N<sub>2</sub> atmosphere. The stock solution of MamC was also deoxygenated with ultrapure N<sub>2</sub>. Magnetite precipitation experiments were carried out in the anaerobic chamber following the protocol described by Perez-Gonzalez and colleagues<sup>38</sup> to avoid a potential oxidation of the product. The final reaction mixture from which magnetite precipitated was 12.5 mM NaOH, 2.78 mM Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5.56 mM FeCl<sub>3</sub>, and 3.5 mM NaHCO<sub>3</sub>/3.5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The protein was added to this reaction mixture to a final concentration of 10  $\mu$ g/mL. Each experiment was run inside the anaerobic chamber for 30 days, and afterward, the particles were concentrated with a magnet and the clean supernatant was discarded. Then, deoxygenated Milli-Q water was added, the particles were resuspended and magnetically concentrated again, and the

supernatant was discarded. This rinsing procedure was repeated three times. Finally, the particles were concentrated in 1-2 mL of oxygen-free Milli-Q water, hermetically sealed, and stored at 20 °C inside the anaerobic chamber until its analysis.

## Analysis of the Precipitates

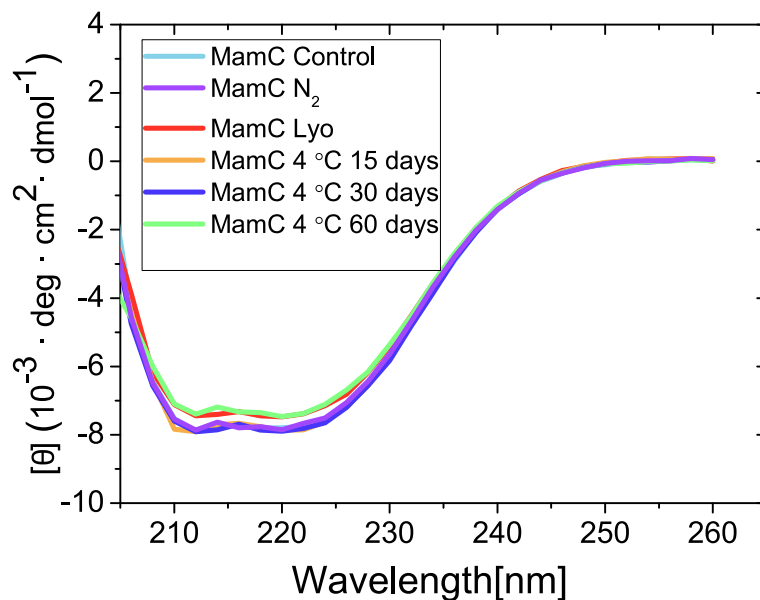
Both the morphology and the size of the precipitates were studied by transmission electron microscopy (TEM, LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss SMT electron microscope, Germany). Magnetic nanoparticles were resuspended in ethanol and embedded in Embed 812 resin. Ultrathin sections (50–70 nm) were prepared using a Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), and after that, those sections were deposited onto copper grids. The size of the crystals was measured by using the ImageJ v1.47 computer program, and the size distribution curves were determined from those measurements by using the Origin pro v9 analysis software. To ensure the reproducibility of these results, the sizes were evaluated on multiple images with an excess of 1000 nanoparticles measured for each experiment. In addition, statistical significance of the results obtained was tested using a Tukey test with a fixed value of  $\alpha < 0.05$ .

## Results and Discussion

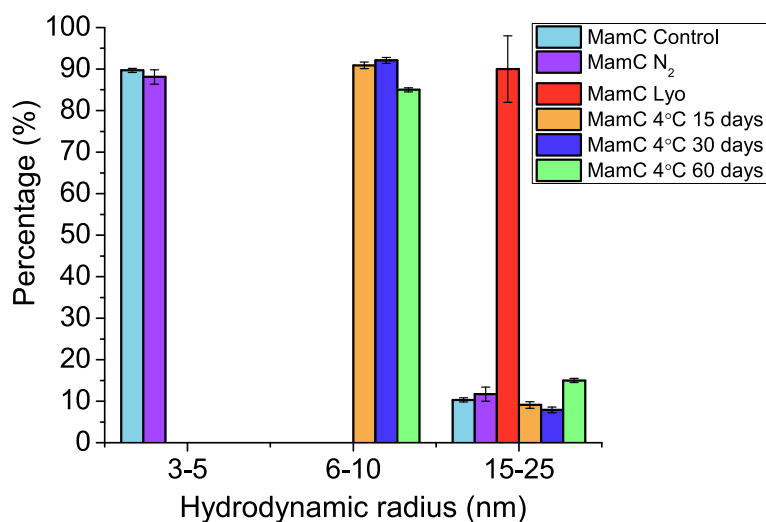
Protein purification was evaluated by electrophoresis. The purity grade was higher than 95% and was similar to that obtained previously by Lopez-Moreno and colleagues<sup>30</sup> and Valverde-Tercedor and colleagues<sup>19</sup> (Figure S1). Circular dichroism spectra of all samples (Figure 1) show that MamC retains its native secondary structure conformation in all cases, irrespective of the selected preservation method; moreover, it is nearly identical with that of the MamC control. In particular, there is a minimum at 220-222 nm typical of an  $\alpha$ -helical conformation. This conformation is consistent with the predicted model structure of MamC, in which the protein displays two transmembrane helices connected by a loop that adopts an  $\alpha$ -helix structure.<sup>36</sup>

However, DLS analysis shows different states of protein aggregation (Figure 2). In the case of MamC control and MamC N<sub>2</sub> protein samples, 90% of the observed species display sizes of 3-5 nm and only a low percentage (~10%) shows larger sizes (15-25 nm). With respect to MamC Lyo experiments, these species fall within the range of 15-25 nm.

Finally, in the case of the refrigeration conservation method, the detected species are larger than those from MamC control sample. In fact, 90% of the particles display sizes of 6-10 nm and a low percentage (~10%) show larger sizes (15-25 nm).



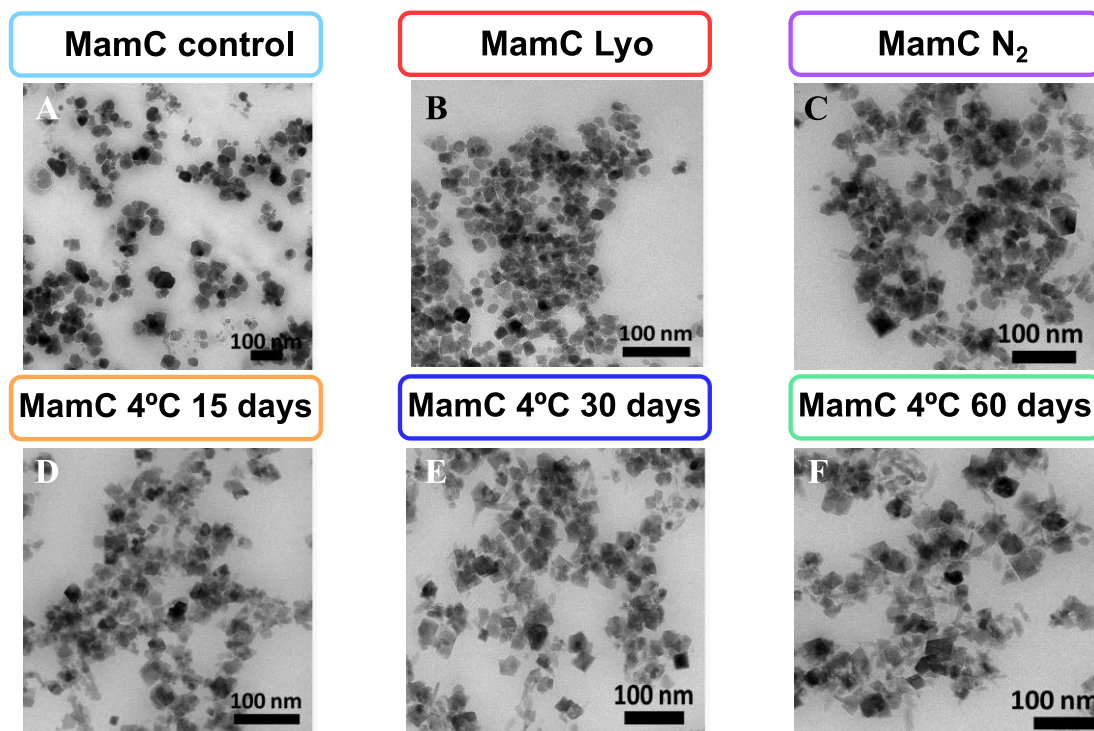
**Figure 1.** Circular dichroism spectra of MamC purified and conserved at different methods (lyophilization, cryoconservation, and refrigeration).



**Figure 2.** Dynamic light scattering diagrams of the size and percentage of MamC protein particles.

TEM images of the magnetite crystals obtained in the presence of the different types of MamC samples show differences in size and morphology in comparison to those crystals obtained from the MamC control experiments (Figures 3 and 4). Magnetite

nanoparticles resulting from MamC control experiments display well-faceted faces with rhombic, rectangular and square two-dimensional morphologies and an average size of  $36 \pm 8$  nm. These particles exhibit sizes within the range 10-70 nm, most in the size range of 30-40 nm. Magnetite nanoparticles obtained in the presence of MamC Lyo show well-defined faces, but these particles are smaller with an average size of  $16 \pm 7$  nm. This size is similar to those displayed by crystals resulted from free-protein experiments.<sup>19,30</sup> Identically, nanoparticles obtained in the presence of MamC N<sub>2</sub> display sizes equal to those of magnetite crystals obtained in the presence of MamC control. In particular, the size of these particles is within the 10-70 nm range, with most of them around 30-40 nm, showing an average size of  $37 \pm 8$  nm. Statistical analysis (Figure 5 and Table S1) reveals that there are no significant differences between this average size and that exhibited by magnetites formed in the presence of MamC control.

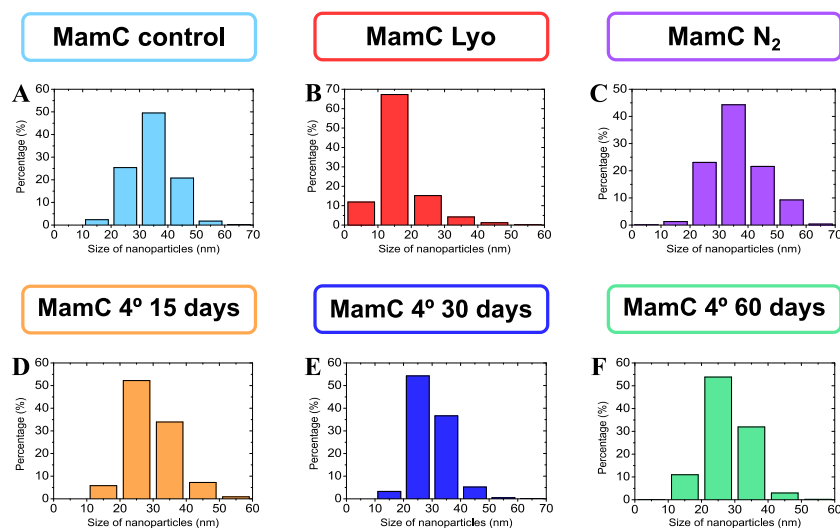


**Figure 3.** TEM images of biomimetic magnetite nanoparticles obtained in the presence of MamC conserved by different methods (lyophilization, cryoconservation, and refrigeration).

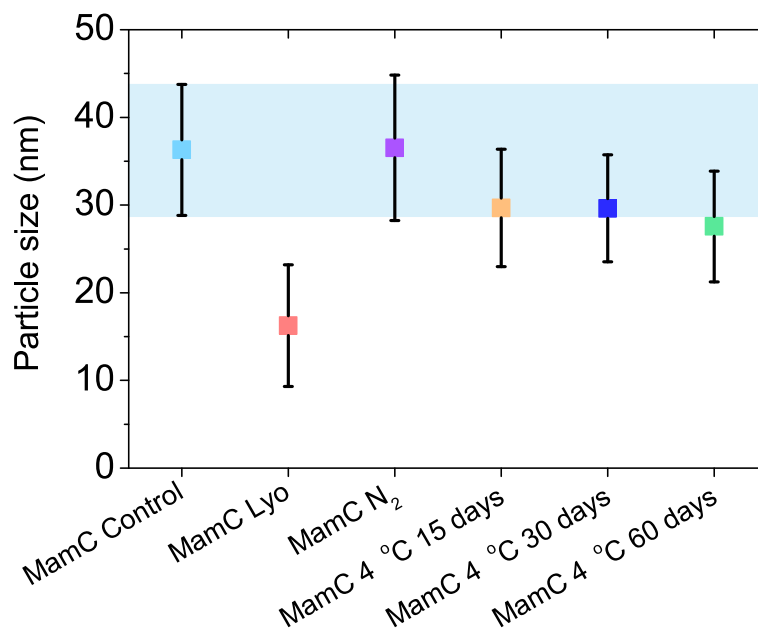
In contrast, magnetite crystals formed in the presence of MamC 15 days, MamC 30 days, and MamC 60 days show morphologies similar to that exposed by crystals formed in the presence of MamC control. However, the former crystals are smaller than



those obtained in the presence of MamC control ( $30 \pm 7$ ,  $30 \pm 6$  and  $28 \pm 6$  nm, respectively). Although these differences are not significant among them, they are significant in comparison to the MamC control experiment.



**Figure 4.** Size distribution of biomimetic magnetite nanoparticles obtained in the presence of MamC conserved by different methods (lyophilization, cryoconservation, and refrigeration).



**Figure 5.** Histogram analyses and size distribution box plot. The blue square refers to the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of nanoparticles obtained in a control experiment.

Differences in the MamC mediation on crystal formation can be related to changes in the aggregation state of MamC that occur during the preservation process, as our results

indicate (Figure 2), which is also consistent with the results of Lopez-Moreno and colleagues.<sup>30</sup> This is important because the different aggregation states could affect (or even suppress) the template effect exerted by MamC on magnetite nucleation and growth in different ways: (1) by varying the spatial orientation of the acidic residues Glu66 and Asp70, (2) by hiding these residues, and/or (3) by avoiding the loop interaction with magnetite surface by steric impediments. Previously, Nudelman and co-workers<sup>31,32</sup> and Lopez-Moreno and colleagues<sup>30</sup> demonstrated the importance of conserving the spatial orientation of Glu66 and Asp70, since these two residues should be within a distance of 8 Å to allow the template effect exerted by MamC during the processes of magnetite nucleation and growth. In fact, it has been demonstrated that those MamC peptides that expose an Asp70-Glu66 distance similar to but different from 8 Å are not able to interact with magnetite and, therefore, they do not form the characteristic crystals of MamC<sup>32</sup>.

DLS analysis (Figure 2) shows different protein aggregation states depending on the preservation method used. Following the study by Wilkins and colleagues<sup>39</sup> and considering a globular shape for monomeric MamC protein (as a simple model, previously proposed by Lopez-Moreno and co-workers<sup>30</sup>), the hydrodynamic radius varies from 2 nm in a compact conformation to 3.6 nm in an extended conformation. According to that, protein species with hydrodynamic radii of 3-5, 6-10 and 15-25 nm can be considered as monomers, dimers, and trimers, respectively. Those protein species observed when cryoconservation was used as a storage method are mainly monomers, similarly to what was found with the MamC control sample. It is precisely in the presence of these samples in which the largest crystals precipitated. These results are in agreement with the conclusions of Lopez-Moreno and co-workers<sup>30</sup> who observed that larger crystals are formed when MamC protein is in a monomeric active state. In this state, the protein displays the optimal functional folding for magnetite precipitation exposing the acidic amino acids Glu66 and Asp70 correctly as well as exhibiting an extended surface involved in magnetite formation. As a consequence, this preservation method was able to keep the correct MamC conformation and aggregation state. The cryoconservation method has been proposed by other authors<sup>40,41</sup> as a good alternative for the long-term storage of proteins, since the application of rapid cooling rates decreases protein stress.<sup>42</sup>

The case for MamC Lyo is different. Crystals formed in the presence of this protein were the smallest observed ( $16 \pm 7$  nm; Figure 5). DLS analysis of MamC Lyo revealed that the protein was aggregated, forming trimers. Probably, in this aggregation

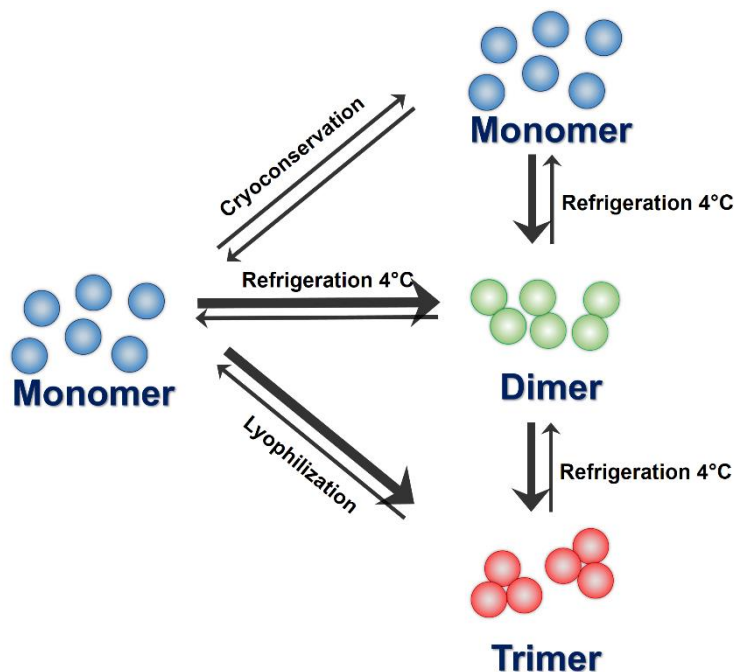
state, the MamC loop environment is compromised and, therefore, the template role exerted by MamC on magnetite nucleation and growth is suppressed. Lyophilization has also been proposed as a good alternative for improving protein stability on long-term storage.<sup>43</sup> However, several parts of the process (freezing, primary drying and secondary drying) could induce protein stress. In fact, several authors have observed that events such as solute concentration occurring during the process of lyophilization facilitate second-order reactions, including the formation of ice crystals, pH shifts, protein aggregation, and even structural changes.<sup>41,43-45</sup> Among these processes, special attention should be paid to the secondary drying process. Different from the primary drying in which the frozen water of the buffer is eliminated, it is the remaining water strongly bonded to the protein that is removed in the secondary drying process. Therefore, the elimination of those structural water molecules could modify reversibly or irreversibly the native state of the protein, causing denaturation, altering the protein native conformation, or even giving rise to aggregation.<sup>43,44</sup> As shown by DLS experiments (Figure 2) the refolding of the protein after lyophilization produces a shift in the aggregation state toward a trimeric state which is not able to form magnetites with a size comparable to that resulting from the MamC control experiments.

In the context of the refrigeration method, most of the protein species found were aggregates, essentially as dimers (Figure 2). However, although the magnetite particles obtained using that dimeric protein were larger than those obtained in the presence of the Lyo sample, they were smaller than those obtained using MamC N<sub>2</sub> and MamC control samples. These results show that in the dimeric state the environment of the MamC loop that allows MamC to mediate by templating magnetite nucleation and growth is partially compromised. This is consistent with previous studies in which MamC protein was refolded in the presence of dodecyl  $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM) detergent, forming dimers, which lead to larger magnetite nanoparticles in comparison to those obtained from the protein-free experiment.<sup>30</sup> Nevertheless, the size of the magnetite particles produced in the presence of the MamC refrigerated samples decreases with the refrigeration time, as a result of an increase in the oligomerization state of the protein over time and, therefore, a subsequent loss of its biological activity. Consequently, the refrigeration method is only valid for short-term storage if the protein is stored without a stabilizer, which is in agreement with the conclusions drawn from other studies.<sup>46</sup> Hence, the lack of that stabilizer and the highly hydrophobic nature of the MamC transmembrane

protein caused the MamC monomers to aggregate with time, possibly through their hydrophobic transmembrane helices. In fact, our results show that the number of protein aggregates increased with time, possibly compromising MamC loop environment and inactivating some of the former extended surfaces for the template effect. As a consequence, refrigeration is not an option to preserve MamC, due to the progressive loss of the functional aggregation state.

The results from these experiments are then summarized in Figure 6. MamC is a transmembrane protein, and in aqueous solution, the trend is to shield the hydrophobic amino acids present in its structure. The protein exists in equilibrium among different association states that vary from monomeric to trimeric (Figures 2 and 6). The use of one or another preservation method determines a shift among the different association states. Therefore, while during cryoconservation the protein exposes a monomeric state, during the lyophilization process, probably due to the different dehydration steps (steps I and II), an equilibrium displacement occurs toward the inactive trimeric species. In the case of refrigeration at 4 °C, the protein shifts from a monomeric initial state to a dimeric state over time and, finally, to a trimeric state, which seems to be the most stable association state for MamC in an aqueous medium in the absence of any detergent/stabilizer. Different processes occurring in the refrigeration and lyophilization methods induce different states of association of the protein, and this fact is related to the hydrophobicity of MamC. At 4 °C, MamC mainly dimerizes with time, while it trimerizes following lyophilization. Those hydrophobic solvent-exposed residues of the protein promote a self-rearrangement of the water molecules around them in highly ordered structures known as clathrates. Despite the high and negative enthalpy associated with the establishment of the multiple hydrogen bonds supporting these structures, they are essentially unstable, since a high and negative entropic contribution counteracts that high enthalpy term. The system therefore evolves, promoting the protein self-association and freeing these water molecules up to the bulk of the solvent, making the overall entropy of the system high and positive. At 25 °C, the thermal energy of the system is higher than at 4 °C and, therefore, it is much easier to disrupt that hydrogen bond framework supporting those clathrate structures, liberating all those water molecules and letting the protein to oligomerize to a dimeric state. Lyophilized protein that is further rehydrated will be in a condition of nonordered water and high salt concentration that may trigger the aggregation of the protein to a higher oligomeric state (trimers). All these oligomerization

processes seem to be kinetically controlled, the conservation method at 4 °C being the slowest of all of them. Due to that, this method allows the existence of an equilibrium among all possible association states.



**Figure 6.** Schematic representation of the evolution of the oligomerization state of MamC protein as a function of the different preservation methods used.

## Conclusions

The present study demonstrates that among all preservation methodologies tested, cryoconservation using liquid nitrogen was the only effective approach to safely store MamC to retain a correct, fully functional structure as well as to keep the protein aggregation state active and monomeric. Both lyophilization and refrigeration, either directly or indirectly, triggered changes in both the structure and the aggregation state of MamC. Therefore, the present study offers experimental evidence of the necessary process to follow in the process of scaling up the production of biomimetic magnetic nanoparticles by eliminating one of the bottlenecks of the process.

## Acknowledgments

We want to acknowledge a FPU2016 grant (ref. FPU16\_04580) from the Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte y Competitividad (Spain) and Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 of the University of Granada. Thanks go to the CIC personnel of the University of Granada for technical assistance in the TEM.

## References

- (1) Balkwill, D. L.; Maratea, D.; Blakemore, R. P. Ultrastructure of a Magnetotactic Spirillum. *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 1399–1408.
- (2) Gorby, A.; Beveridge, T. J.; Blakemore, R. P. Characterisation of the Bacterial Magnetosome. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 834–841.
- (3) Komeili, A.; Vali, H.; Beveridge, T. J.; Newman, D. K. Magnetosome Vesicles Are Present before Magnetite Formation, and MamA Is Required for Their Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 3839–3844.
- (4) Bazylinski, D. A.; Frankel, R. B.; Heywood, B. R.; Mann, S.; King, J. W.; Donaghay, P. L.; Hanson, K. Controlled Biomineralization of Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) and Greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) in a Magnetotactic Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3232–3239.
- (5) Bazylinski, D. A.; Garratt-Reed, A. J.; Frankel, R. B. Electron Microscopic Studies of Magnetosomes in Magnetotactic Bacteria. *Microsc. Res. Tech.* **1994**, *27*, 389–401.
- (6) Thomas-Keprta, K. L.; Bazylinski, D. A.; Kirschvink, J. L.; Clemett, S. J.; McKay, D. S.; Wentworth, S. J.; Vali, H.; Gibson, E. K.; Romanek, C. S. Elongated Prismatic Magnetite Crystals in ALH84001 Carbonate Globules: Potential Martian Magnetofossils. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, *64*, 4049–4081.
- (7) Schübbe, S.; Kube, M.; Wawer, C.; Heyen, U.; Meyerdierks, A.; Madkour, M. H.; Mayer, F.; Reinhardt, R.; Schu, D. Characterization of a Spontaneous Nonmagnetic Mutant of Magnetospirillum Gryphiswaldense Reveals a Large Deletion Comprising a Putative Magnetosome Island. *Society* **2003**, *185*, 5779–5790.
- (8) Goldhawk, D. E.; Rohani, R.; Sengupta, A.; Gelman, N.; Prato, F. S. Using the Magnetosome to Model Effective Gene-Based Contrast for Magnetic Resonance Imaging. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2012**, *4*, 378–388.
- (9) Mathuriya, A. S. Magnetotactic Bacteria for Cancer Therapy. *Biotechnol Lett.* **2015**, *32*, 491–498.

- (10) Alphandéry, E. Applications of Magnetosomes Synthesized by Magnetotactic Bacteria in Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2014**, *2*, 1–6.
- (11) Sun, J.; Li, Y.; Liang, X.-J.; Wang, P. C. Bacterial Magnetosome: A Novel Biogenetic Magnetic Targeted Drug Carrier with Potential Multifunctions. *J. Nanomater.* **2011**, *2011*, 1–13.
- (12) Arakaki, A.; Nakazawa, H.; Nemoto, M.; Mori, T.; Matsunaga, T. Formation of Magnetite by Bacteria and Its Application. *J. R. Soc., Interface* **2008**, *5*, 977–999.
- (13) Matsunaga, T.; Ueki, F.; Obata, K.; Tajima, H.; Tanaka, T.; Takeyama, H.; Goda, Y.; Fujimoto, S. Fully Automated Immunoassay System of Endocrine Disrupting Chemicals Using Monoclonal Antibodies Chemically Conjugated to Bacterial Magnetic Particles. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *475*, 75–83.
- (14) Tanaka, T.; Takeda, H.; Ueki, F.; Obata, K.; Tajima, H.; Takeyama, H.; Goda, Y.; Fujimoto, S.; Matsunaga, T. Rapid and Sensitive Detection of 17 $\beta$ -Estradiol in Environmental Water Using Automated Immunoassay System with Bacterial Magnetic Particles. *J. Biotechnol.* **2004**, *108*, 153–159.
- (15) Prozorov, T.; Bazylinski, D. A.; Mallapragada, S. K.; Prozorov, R. Novel Magnetic Nanomaterials Inspired by Magnetotactic Bacteria: Topical Review. *Mater. Sci. Eng., R* **2013**, *74*, 133–172.
- (16) Arakaki, A.; Yamagishi, A.; Fukuyo, A.; Tanaka, M.; Matsunaga, T. Co-Ordinated Functions of Mms Proteins Define the Surface Structure of Cubo-Octahedral Magnetite Crystals in Magnetotactic Bacteria. *Mol. Microbiol.* **2014**, *93*, 554–567.
- (17) Arakaki, A.; Webb, J.; Matsunaga, T. A Novel Protein Tightly Bound to Bacterial Magnetic Particles in Magnetospirillum Magneticum Strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8745–8750.
- (18) Scheffel, A.; Gärdes, A.; Grünberg, K.; Wanner, G.; Schüler, D. The Major Magnetosome Proteins MamGFDC Are Not Essential for Magnetite Biomineralization in Magnetospirillum Gryphiswaldense but Regulate the Size of Magnetosome Crystals. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 377–386.
- (19) Valverde-Tercedor, C.; Montalbán-López, M.; Perez-Gonzalez, T.; Sanchez-Quesada, M. S.; Prozorov, T.; Pineda-Molina, E.; Fernandez-Vivas, M. A.; Rodriguez-Navarro, A. B.; Trubitsyn, D.; Bazylinski, D. A.; Jimenez-Lopez, C. Size Control of in Vitro Synthesized Magnetite Crystals by the MamC Protein of Magnetococcus Marinus Strain MC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5109–5121.
- (20) Lohße, A.; Borg, S.; Raschdorf, O.; Kolinko, I.; Tompa, É.; Pósfai, M.; Faivre, D.; Baumgartner, J.; Schüler, D. Genetic Dissection of the MamAB and Mms6 Operons Reveals a Gene Set Essential for Magnetosome Biogenesis in Magnetospirillum Gryphiswaldense. *J. Bacteriol.* **2014**, *196*, 2658–2669.
- (21) Rawlings, A. E.; Bramble, J. P.; Walker, R.; Bain, J.; Galloway, J. M.; Staniland, S. S. Self-Assembled MmsF Proteinosomes Control Magnetite Nanoparticle

- Formation in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 16094–16099.
- (22) Murat, D.; Falahati, V.; Bertinetti, L.; Csencsits, R.; Körnig, A.; Downing, K.; Faivre, D.; Komeili, A. The Magnetosome Membrane Protein, MmsF, Is a Major Regulator of Magnetite Biomineralization in *Magnetospirillum Magneticum* AMB-1. *Mol. Microbiol.* **2012**, *85*, 684–699.
- (23) Murat, D.; Quinlan, A.; Vali, H.; Komeili, A. Comprehensive Genetic Dissection of the Magnetosome Gene Island Reveals the Step-Wise Assembly of a Prokaryotic Organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 5593–5598.
- (24) Komeili, A. Molecular Mechanisms of Compartmentalization and Biomineralization in Magnetotactic Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 232–255.
- (25) Amemiya, Y.; Arakaki, A.; Staniland, S. S.; Tanaka, T.; Matsunaga, T. Controlled Formation of Magnetite Crystal by Partial Oxidation of Ferrous Hydroxide in the Presence of Recombinant Magnetotactic Bacterial Protein Mms6. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5381–5389.
- (26) Prozorov, T.; Mallapragada, S. K.; Narasimhan, B.; Wang, L.; Palo, P.; Nilsen-Hamilton, M.; Williams, T. J.; Bazylinski, D. A.; Prozorov, R.; Canfield, P. C. Protein-Mediated Synthesis of Uniform Superparamagnetic Magnetite Nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 951–957.
- (27) Bird, S. M.; El-Zubir, O.; Rawlings, A. E.; Leggett, G. J.; Staniland, S. S. A Novel Design Strategy for Nanoparticles on Nanopatterns: Interferometric Lithographic Patterning of Mms6 Biotemplated Magnetic Nanoparticles. *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 3948–3955.
- (28) Bird, S. M.; Rawlings, A. E.; Galloway, J. M.; Staniland, S. S. Using a Biomimetic Membrane Surface Experiment to Investigate the Activity of the Magnetite Biomineralisation Protein Mms6. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 7356.
- (29) Staniland, S. S.; Rawlings, A. E. Crystallizing the Function of the Magnetosome Membrane Mineralization Protein Mms6. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 883–890.
- (30) Lopez-Moreno, R.; Fernández-Vivas, A.; Valverde-Tercedor, C.; Azuaga Fortes, A. I.; Casares Atienza, S.; Rodriguez-Navarro, A. B.; Zarivach, R.; Jimenez-Lopez, C. Magnetite Nanoparticles Biomineralization in the Presence of the Magnetosome Membrane Protein MamC: Effect of Protein Aggregation and Protein Structure on Magnetite Formation. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 1620–1629.
- (31) Nudelman, H.; Valverde-tercedor, C.; Kolusheva, S.; Perez, T.; Widdrat, M.; Grimberg, N.; Levi, H.; Nelkenbaum, O.; Davidov, G.; Faivre, D.; Jimenez-Lopez, C.; Zarivach, R. Structure – Function Studies of the Magnetite-Biomineralizing Magnetosome-Associated Protein MamC. *J. Struct. Biol.* **2016**, *194*, 244-252.
- (32) Nudelman, H.; Perez Gonzalez, T.; Kolushiva, S.; Widdrat, M.; Reichel, V.;



- Peigneux, A.; Davidov, G.; Bitton, R.; Faivre, D.; Jimenez-Lopez, C.; Zarivach, R. The Importance of the Helical Structure of a MamC-Derived Magnetite-Interacting Peptide for Its Function in Magnetite Formation. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **2018**, *74*, 10–20.
- (33) Jones, S. R.; Wilson, T. D.; Brown, M. E.; Rahn-Lee, L.; Yu, Y.; Fredriksen, L. L.; Ozyamak, E.; Komeili, A.; Chang, M. C. Y. Genetic and Biochemical Investigations of the Role of MamP in Redox Control of Iron Biomineralization in *Magnetospirillum Magneticum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 3904–3909.
- (34) García Rubia, G.; Peigneux, A.; Jabalera, Y.; Puerma, J.; Oltolina, F.; Colangelo, D.; Gómez Morales, J.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C. PH-Dependent Adsorption-Release of Doxorubicin on MamC-Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Langmuir* **2018**, *34*, 13713-13724.
- (35) Kashyap, S.; Woehl, T.; Valverde-Tercedor, C.; Sánchez-Quesada, M.; Jiménez López, C.; Prozorov, T. Visualization of Iron-Binding Micelles in Acidic Recombinant Biomineralization Protein, MamC. *J. Nanomater.* **2014**, *2014*, 1–7.
- (36) Nudelman, H.; Zarivach, R. Structure Prediction of Magnetosome-Associated Proteins. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 9.
- (37) Subagyo, A.; Sueoka, K. Correlation between Surface Structure and Charge Ordering in Magnetite(001) Studied by Scanning Tunneling Microscopy and Spectroscopy. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2007**, *61*, 1102–1106.
- (38) Perez-Gonzalez, T.; Rodriguez-Navarro, A.; Jimenez-Lopez, C. Inorganic Magnetite Precipitation at 25 °C: A Low-Cost Inorganic Coprecipitation Method. *J. Supercond. Novel. Magn.* **2011**, *24*, 549–557.
- (39) Wilkins, D. K.; Grimshaw, S. B.; Receveur, V.; Dobson, C. M.; Jones, J. A.; Smith, L. J. Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16424–16431.
- (40) Carpenter, J. F.; Prestrelski, S. J.; Arakawa, T. Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins Using Stress-Specific Stabilization: I. Enzyme Activity and Calorimetric Studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 456–464.
- (41) Pikal-Cleland, K. A.; Carpenter, J. F. Lyophilization-Induced Protein Denaturation in Phosphate Buffer Systems: Monomeric and Tetrameric  $\beta$ -Galactosidase. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1255–1268.
- (42) Bhatnagar, B. S.; Bogner, R. H.; Pikal, M. J. Protein Stability during Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization. *Pharm. Dev. Technol.* **2007**, *12*, 505–523.
- (43) Manning, M. C.; Chou, D. K.; Murphy, B. M.; Payne, R. W.; Katayama, D. S. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 544-575.
- (44) Roy, I.; Gupta, M. N. Freeze-Drying of Proteins: Some Emerging Concerns.

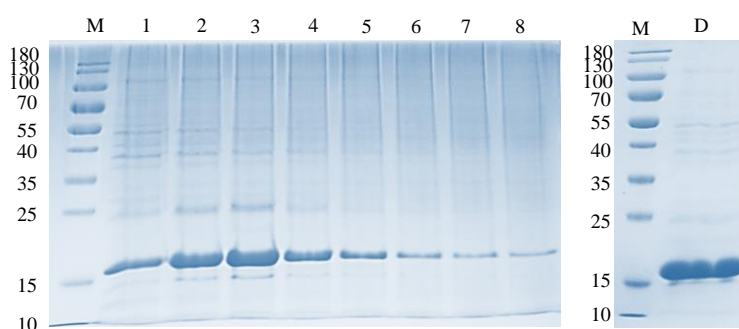
*Biotechnol. Appl. Biochem.* **2004**, 39, 165.

- (45) Wang, W. Lyophilization and Development of Solid Protein Pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **2000**, 203, 1-60.
- (46) Carpenter, J. F.; Manning, M. C.; Randolph, T. W. Long-Term Storage of Proteins. In *Current Protocols in Protein Science*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2002; Chapter 4, pp 4.6.1-4.6.6.

## Supporting Information

**Table S1.** ANOVA test of magnetite nanoparticles. The difference between averages is significant when  $\alpha < 0.05$ .

Samples		Probability	<i>Alpha</i>	Significance
MamC Control	MamC Lyo	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC Control	MamC N <sub>2</sub>	0.97553	0.05	0
MamC Control	MamC 15 days	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC Control	MamC 30 days	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC Control	MamC 60 days	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC Lyo	MamC N <sub>2</sub>	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC Lyo	MamC 15 days	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC Lyo	MamC 30 days	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC Lyo	MamC 60 days	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC N <sub>2</sub>	MamC 15 days	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC N <sub>2</sub>	MamC 30 days	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC N <sub>2</sub>	MamC 60 days	$4.44089 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MamC 15 days	MamC 30 days	0.99999	0.05	0
MamC 15 days	MamC 60 days	$9.95903 \cdot 10^{-11}$	0.05	1
MamC 30 days	MamC 60 days	$2.15415 \cdot 10^{-10}$	0.05	1



**Figure S1.** SDS-PAGE gel stained with Coomassie Brilliant Blue R250 of purified MamC protein (17.4 kDa). (Lane 1-9) Protein fractions obtained after purification process and (Lane D) protein fraction obtained after the refolding process.



*Este artículo se ha publicado en la revista indexada en JCR: Crystal Growth & Design*

*(<https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00169>)*

# **Lysine as Size Control Additive in a Bioinspired Synthesis of Pure Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles**

Rafael Contreras-Montoya<sup>#,1</sup>, Ylenia Jabalera<sup>#,2</sup>, Víctor Blanco<sup>1</sup>, Juan Manuel Cuerva<sup>1</sup>, Concepcion Jimenez-Lopez<sup>\*,2</sup>, Luis Alvarez de Cienfuegos<sup>\*,1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18002 Granada, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18002 Granada, Spain

\*Corresponding authors

#These authors contributed equally to this work.

## **Abstract**

Magnetite nanoparticles (MNPs) are being used in a number of nanotechnological applications, especially biomedical, both in diagnosis and in therapeutics such as hyperthermia agents and as drug nanocarriers for targeted chemotherapy. However, the development of efficient methodologies to produce novel MNPs with the specific requirements needed for biomedical applications is still challenging. In this context, biomimetic approaches taking use of magnetosome proteins expressed as recombinant and/or polyamino acids are becoming of great interest. In fact, these protocols give rise to magnetite nanoparticles of adequate size, magnetic properties and surface functionalization that make them compatible for biomedical applications. In this respect, herein we show for the first time that lysine (Lys), unlike other amino acids like arginine (Arg), is able to exert a control over the size of MNPs produced in water and at room temperature. This control occurs through the stabilization of the magnetite nuclei by the lateral ammonium group of Lys. The strength of such stabilization allows a further release

of these previously bonded nuclei to allow the further growth of the larger ones, thus resulting in larger crystals compared to those obtained by using Arg or no amino acids at all. MNPs obtained by the mediation of this amino acid are fairly large (30 nm) while being superparamagnetic at room temperature. They present an isoelectric point of 4, which may allow the coupling/release of these MNPs to other molecules based on electrostatic interaction, a large magnetic moment per particle and high magnetization saturation. This study highlights the effects that biological additives have in the process of magnetite biomineralization and goes along the line of previous reports using magnetosome proteins and polyamino acids.

## Introduction

Nanoparticles have proven to be efficient multifunctional devices for targeted chemotherapy that can simultaneously carry different type of molecules such as drugs, peptides and antibodies.<sup>1,2</sup> Among them, magnetic nanoparticles (MNPs), especially magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), display further intrinsic properties, since they can be manipulated by external magnetic fields toward the target<sup>3-6</sup> and/or they can mediate hyperthermia (through alternating magnetic field) that induces apoptosis in tumor cells.<sup>7,8</sup> MNPs have been also used in many other fields besides oncology, such as in magnetic resonance imaging (MRI),<sup>9</sup> tissue engineering and cell replacement therapy,<sup>10</sup> cell tracking and bioseparation,<sup>11</sup> and DNA isolation and purification.<sup>12</sup>

Other than being biocompatible, certain specifications are important for the nanocarrier. One of them is size, which, for superparamagnetic pure crystalline magnetite determines the magnetic moment per particle that, in turn, turns on how efficiently the nanoparticle responds to an external magnetic field during the guiding process and/or when trying to be concentrated at the target site.<sup>5,13,14</sup> For *in vivo* biomedical applications, it has been shown that MNPs of sizes smaller than 150 nm are required to be able to reach the target by means of the EPR effect.<sup>15</sup> It is also important that the MNPs are superparamagnetic at room temperature and above; *i.e.*, at this temperature, they should behave as nonmagnetic in the absence of an external magnetic field, thus preventing aggregation, but, once a magnetic field is applied, they must respond efficiently. That allows their use in clinics, as they could be injected intravenously and then guided and/or concentrated at the target site by using external magnets. Size is also important when

hyperthermia treatments are in play, as the heating power generated per particle unit mass upon application of an alternating external magnetic field is directly related to the amount of iron in the nanoparticles.<sup>1,2,8</sup> In this context, using MNPs with the adequate size (< 150 nm) to be able to efficiently raise the temperature is crucial because it would allow one to reduce the MNPs doses.

Finally, another important requirement for biomedical MNPs is that they should provide at their surface functional groups (*i.e.*, carboxylic acids) capable of promoting stable colloidal suspensions and favoring the electrostatic coupling/release of relevant molecules based on external stimuli, such as changes in the environmental pH.<sup>16,17</sup>

MNPs are generally produced by two different strategies: (i) coprecipitation of iron salts in basic aqueous media, being then stabilized by biocompatible surfactants/polymers, and (ii) thermal decomposition of organometallic precursors in high-boiling nonpolar organic solvents at elevated temperatures (~200–360 °C), which allows a great control of the size of the MNPs, their monodispersity and uniformity.<sup>17</sup> However, thermal decomposition methods have some drawbacks, associated with the use of high temperature and organic solvents and the generation of a significant amount of toxic byproducts.<sup>2,18,19</sup> Fortunately, MNPs can also be obtained by green methods, that is, water as a reaction media and at room temperature. Among the green methods, the aqueous coprecipitation is one of the most preferred for the production of MNPs, since it is cost- and time-effective, scalable for industrial applications and eco-friendly. However, the control of the size of the MNPs by this method and, thus, the magnetic properties is limited. MNPs resulting from coprecipitation at room temperature are highly polydisperse with an average crystal size ranging from 5 to 20 nm and lack functionalizable surfaces and many of them are too small to display a large magnetic moment per particle.<sup>1,5,17</sup> Therefore, there is still a need for novel aqueous coprecipitation methods that allow the tuning of the particle size and magnetic properties and provide the nanoparticles with modified surfaces that allow functionalization.

In this context, a promising alternative is the biomimetic green approach, which makes use of bacterial magnetosome proteins (MAPs), or quimera containing the relevant peptides, as additives to control the size of the crystals.<sup>20–25</sup> The ability of some of these MAPs, expressed as recombinant proteins, to *in vitro* control magnetite nucleation and/or crystal growth has been shown by several authors. In this context, much work has been

done by using Mms6 (either full length expressed as recombinant protein or synthetic peptides) from *Magnetospirillum magneticum* AMB-1,<sup>22,26,27</sup> MamC from *Magnetococcus marinus* MC-1<sup>20,25</sup> and MmsF from *M. magneticum* AMB-1<sup>28</sup> have also been studied, although in a much less extent. The studies mentioned above, among others, have demonstrated that the C-terminal of Mms6 from AMB-1 controls the size and morphology of *in vitro* synthesized magnetite. Acidic amino acids are claimed to be responsible for such a control through iron binding. Different is the case of MamC, as not only an ionotropic effect but also a template effect have been claimed to explain the role of this protein in the nucleation and growth of magnetite *in vitro*.<sup>23, 24</sup>

Bioinspired approaches using polyamino acids as additives, instead of proteins, have also shown an effect in the morphology, size, aggregation and magnetic properties of the resulting MNPs.<sup>26,29-31</sup> In fact, it has been proven that changing the proportion of amino acids composition of the polyamino acid backbones fine tunes the size and properties of the resulting MNPs.<sup>29</sup>

In this scenario, we focused our attention on the possibility of using simple amino acids as biological additives to produce MNPs under bioinspired conditions and to test if they were able to modify the size and properties of the resulting crystals. Although in the literature there are protocols that use amino acids as additive to obtain MNPs, these protocols are based on direct aqueous coprecipitation following by a thermal treatment in which the period of incubation of the amino acids with the iron salts is short. These protocols have shown the adsorption of the amino acids over the MNPs but an influence on the size of the MNPs has not been reported.<sup>32-35</sup> Nevertheless, in the present manuscript we have followed an approach previously developed to produce biomimetic magnetite nanoparticles mediated by MamC in which the additives and the inorganic salts are incubated for a month.<sup>25</sup> Of all known accessible amino acids, we selected specifically Lys and Arg based on the following criteria:

(1) On one hand, these two amino acids have a pKa2 close to pH 9 (Lys 9.04, Arg 8.95), which is the pH of our mineralization experiments. This means, that at pH 9, both amino acids are zwitterionic, having the  $\alpha$ -amino group neutral, the carboxylic group anionic and the amine (Lys) and guanidine (Arg) lateral groups cationic. At this pH, both amino acids could interact weakly with iron cations using both the amine, in its neutral state, and the anionic carboxylic group. This type of interaction is known as “glycine-like



coordination type” and has been previously described for the formation of metal complexes of amino acids in water.<sup>36–38</sup> If this would be the case, both amino acids could have the possibility to remove iron cations from the system modifying the supersaturation of the system with respect to magnetite, which, in turn, would affect the size of the resulting MNPs.

(2) On the other hand, these two amino acids, at a pH value of 9, have a positively charged lateral group. The ammonium group, in the case of Lys, and the guanidinium group, in the case of Arg, could interact electrostatically with the negatively charged iron (oxyhydr)oxide crystal surface, and therefore, they could also modify the properties of the resulting MNPs. The effects of the positive groups in the final properties of MNPs have already been proven and reported for the case of polylysine<sup>29</sup> and polyarginine.<sup>31</sup>

In the present manuscript, the production of MNPs mediated by Lys and Arg is explored to provide novel magnetic nanoparticles.

## Experimental Section

### Materials

All reagents used in the biomineralization experiments were purchased from Sigma-Aldrich including L-lysine hydrochloride, ref W384712, and L-arginine monohydrochloride, ref A5131. The deoxygenated water used in these experiments was prepared by boiling nanopurified water for 1 h and then cooling in an ice bath while continuously sparging with ultrapure N<sub>2</sub>. After that, it was immediately placed inside an anaerobic chamber (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI) filled with 4% H<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>, and used to prepare the stock solutions: NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.15 M/0.15 M), NaOH (1 M), Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (0.5 M), and FeCl<sub>3</sub> (1 M).

### Precipitation of Inorganic Magnetite

Experiments were carried out in an anaerobic COY chamber to avoid potential oxidation of the product. Inorganic magnetite was precipitated from solutions in free-drift experiments held at 25 °C and 1 atm total pressure, following the protocol described by Perez-Gonzalez et al.<sup>39</sup> Magnetite synthesis was produced after mixing the stock solutions to a final concentration of Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (2.78 mM), FeCl<sub>3</sub> (5.56 mM) and NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

(3.5 mM/3.5 mM). NaOH was used to reach a pH value of 9. This is here referred to as the master solution for magnetite precipitation. For comparison, experiments were also run at pH values ranging from 7 to 11 following an identical precipitation protocol.

### **Preparation of Magnetite in the Presence of Amino Acids**

Solid amino acids were accurately weighted, deoxygenated by blowing argon and immediately placed in the COY chamber where a stock solution for each one of the three concentrations used per amino acid was prepared: 0.2, 4 and 20 mM of Lys or Arg. To prepare 10 mL of reaction final volume, 5 mL of each amino acid stock solution was mixed with the solution for magnetite precipitation to reach the final concentration of the master solution, here referred as Lys or Arg0.1-MNP, Lys or Arg2-MNP, and Lys or Arg10-MNP, respectively. In any case the concentrations of the amino acids did not modify the pH of the medium that remained always constant at pH = 9 throughout the whole incubation period of 30 days. An inorganic (amino acid-free) experiment was used as control (here referred as MNP-control).

The reaction was allowed to proceed for 30 days. After that, magnetic solids were magnetically concentrated and the clear supernatants were removed. Samples were taken from this supernatant, centrifuged and no noticeable pellet formed. TEM images of non-washed and washed samples are virtually identical showing no evidence of magnetic materials. The magnet was removed and the solids were resuspended in deoxygenated water, concentrated again with the magnet, and the clear supernatant discarded. Solids from each experiment were washed three times this way.

### **Analyses of the Precipitates**

Powder samples of the precipitates were analyzed with an Xpert Pro X-ray diffractometer (PANalytical; The Netherlands) using the Cu K $\alpha$  radiation, with the scan range set from 20 to 60° in 2 $\theta$  (0.01°/step; 3 s per step). Identification of the precipitates was performed by using the X Powder software.

The synthesized magnetic powders were dehydrated with ethanol and embedded in Embed 812 resin. Ultrathin sections (50–70 nm) were prepared using a Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) after which the sections were deposited onto 300-mesh copper grids. The morphology and particle size of synthesized nanocrystals were analyzed by TEM (LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss,

Germany) and by high resolution TEM (HRTEM, FEI TITAN G2, The Netherlands). The size of the crystals was measured from TEM images using ImageJ 1.47 software, and size distribution curves and statistical analyses were determined from these measurements using Origin pro 9. To ensure reproducibility of results, a minimum of 1000 particles per sample were measured manually on the TEM images on crystals in which the borders were clearly visualized, discarding those that were aggregated and in which the borders were not evident.

The surface charge of magnetite nanoparticles was evaluated by measuring the  $\zeta$ -potential at different pHs using a Nano Zs, Zetasizer Instrument (Malvern). For this aim, both MNP-control nanoparticles and Lys and Arg-mediated nanoparticles were suspended in 10 mM solutions of  $\text{NaClO}_4$ . Then, for each of the magnetite nanoparticles, in order to determine their isoelectric point, the pH of the suspensions was adjusted at the specific pH value (from 3 to 8) by using 0.1 M solutions of NaOH or HCl. Measurements, in triplicate for each sample, were carried out at 25 °C using disposable plastic cuvettes.

The thermograms of the magnetite nanoparticles were recorded on a METTLER-TOLEDO TGA/DSC1. Approximately 10 mg of sample were placed on a TGA cell and subject to decomposition by heating the sample to 900 °C at a constant rate of 10 °C/min under nitrogen atmosphere.

Zero-field cooling (ZFC-W) and field cooling (FC-C) measurements were carried out by using a superconducting quantum interference device (SQUID) 5 T magnetometer (Quantum Design MPMS XL, USA). Under gentle argon flow, a given amount of each specimen powder was placed in a double-walled polycarbonate capsule. The samples were immediately cooled in a zero applied field to 5 K to preserve randomized magnetization of the nanocrystals, after which a 500 Oe magnetic field was applied and samples were heated up to 300 K and then from 300 K without turning the field off. To allow comparison among the different complexes, the  $M(T)$  curves were normalized by the amount (g) of each sample analyzed and by the magnetization value of the specific sample at 300 K. Hysteresis cycles were run at 5 and 300 K. No distinction between the terms of “superparamagnetic” or “single magnetic domain” will be done in this work. Blocking temperature ( $T_B$ ) was determined as that at which the maximum in magnetization occurred in ZFC curves while irreversibility temperature ( $T_{irr}$ ), was such

temperature below the “blocking” of the superparamagnetic particles which are no longer thermally equilibrated.

### **Adsorption of Lys and Arg on Previously Formed MNPs**

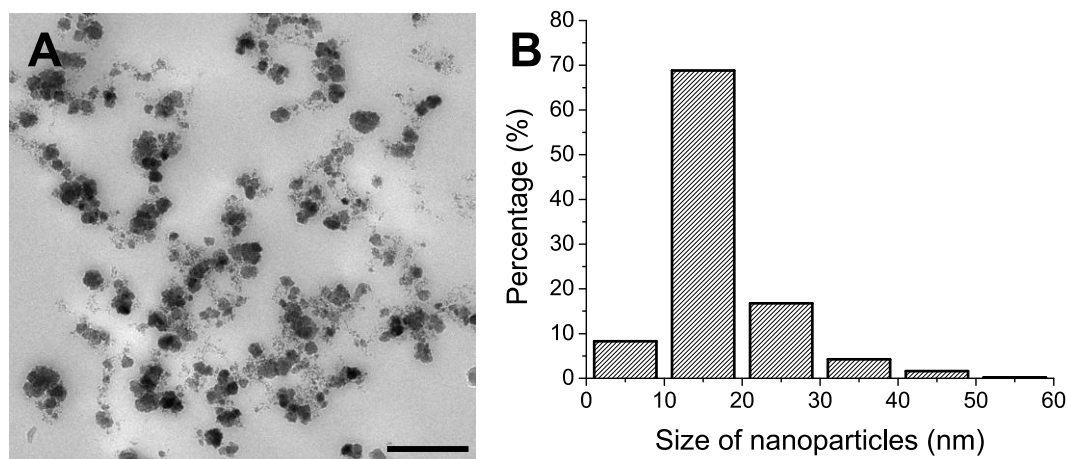
A concentration of 0.3 mg/mL of previously synthesized MNPs were added with either Lys (10 mM) or Arg (10 mM) and the reaction was kept for 24 h. Then after, the MNPs were magnetically concentrated and rinsed just as explained above. The solids were measured by TGA following an identical procedure as stated above.

## **Results and Discussion**

The solids formed in all mineralization experiments were identified as being > 95% magnetite. TEM analysis of the magnetite particles produced in the MNP-control experiments (Figure 1) were isomorphs showing an average crystal size of  $17 \pm 7$  nm. As the concentration of Lys in the experiments increased from 0.1 mM to 10 mM, the average crystal size also increased from  $21 \pm 7$  to  $29 \pm 7$  nm (Figure 2), being these differences statistically significant according to the ANOVA tests. Moreover, not only was the average size was higher but also better-defined crystal faces were observed (Figure 2, parts 2C and E) in magnetites collected from Lys-bearing experiments, where rhombic and hexagonal two-dimensional morphologies were displayed. On the contrary, when Arg was used as additive, no effect was observed on the size and morphology of the nanoparticles under any Arg concentration tested (MNPs of  $16 \pm 7$ ,  $17 \pm 6$  and  $19 \pm 6$  nm for [Arg] = 0.1, 2, and 10 mM respectively), being this size not statistically different from that of the nanoparticles from the MNP-control experiment (Figure 3). This result shows that Lys is able to modify the size of MNPs while Arg is not.

Many surfaces could serve as sites for magnetite nucleation especially if electrostatic interactions between negatively charged functional groups and Fe cations and/or between positively charged functional groups and negatively charged mineral surfaces are at play. The study of Bereczk-Tompa et al.<sup>40</sup> highlights this fact and goes deeper into magnetite nucleation demonstrating that iron binding by negatively charged amino acids (in extended surfaces) is a less specific process than the binding of previously formed nuclei, suggesting that magnetite nucleation under their conditions occurs by charge accumulation (ionotropic effect). Although this seems to be the case for other

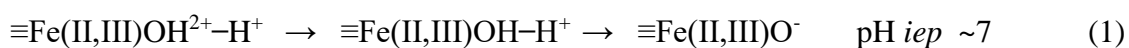
protein mediated magnetite nanoparticles,<sup>20</sup> our observations suggest that in the case of Lys- and Arg-mediated magnetite nucleation, the ionotropic effect by iron binding might not be the key role controlling magnetite nucleation, but instead nuclei stabilization by the basic lateral chain of these amino acids.

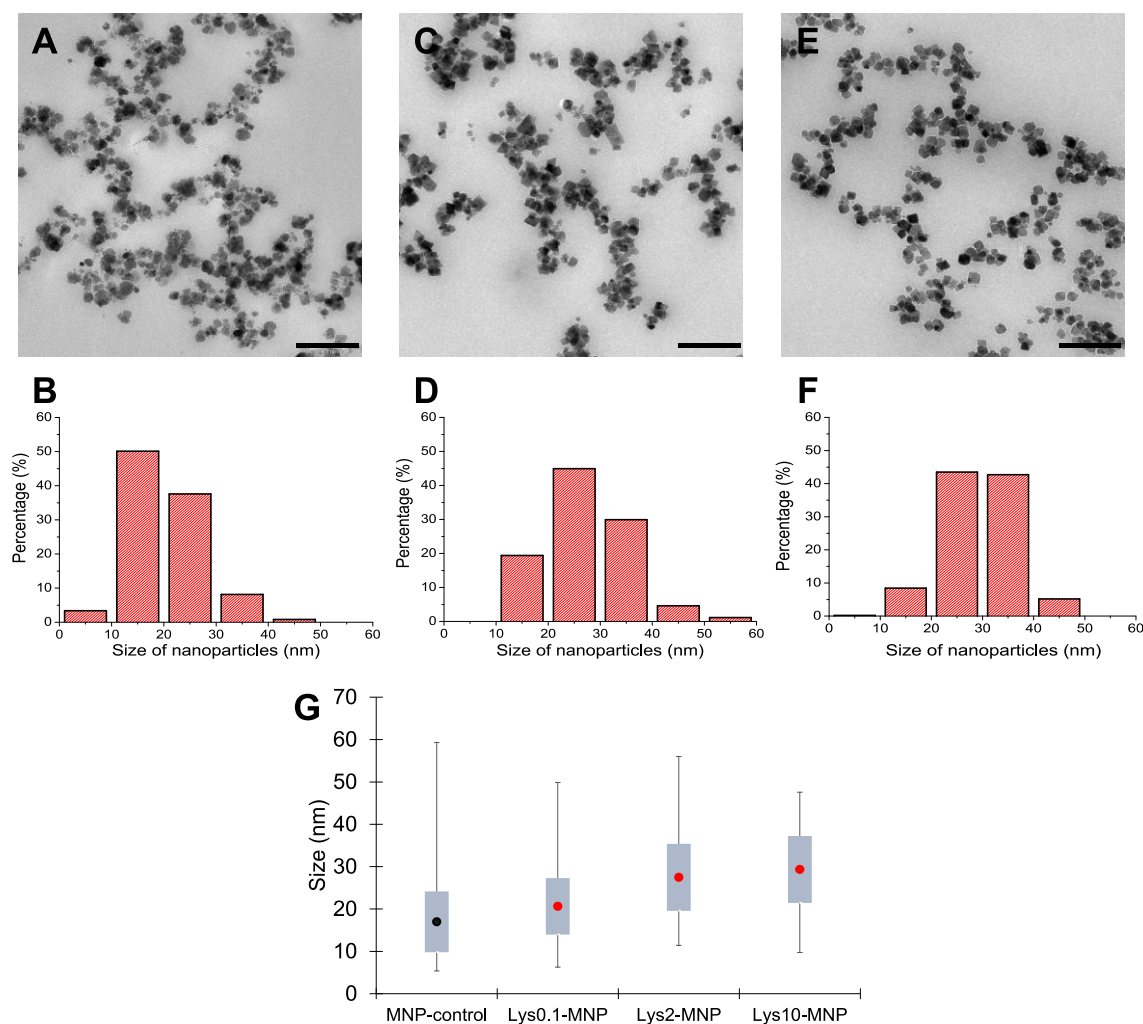


**Figure 1.** TEM images (A) and size distribution (B) of MNP-control. Scale-bar corresponds to 200 nm.

As we have stated in the introduction, these two amino acids could influence the process of magnetite mineralization by two different mechanisms of action. On one hand, they could sequester iron cations through the formation of iron complexes between the  $\alpha$ -amine and the carboxylic groups. Our calculations of  $\Delta G$  for the water-ligand exchange reaction between  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6$  and Lys or Arg show that both reactions are essentially isoenergetic meaning that the  $\Delta G$  for the complexation of both amino acids to iron cations is virtually identical (see Supporting Information). This process, therefore, cannot account for the differences observed on the magnetite mediated by these amino acids.

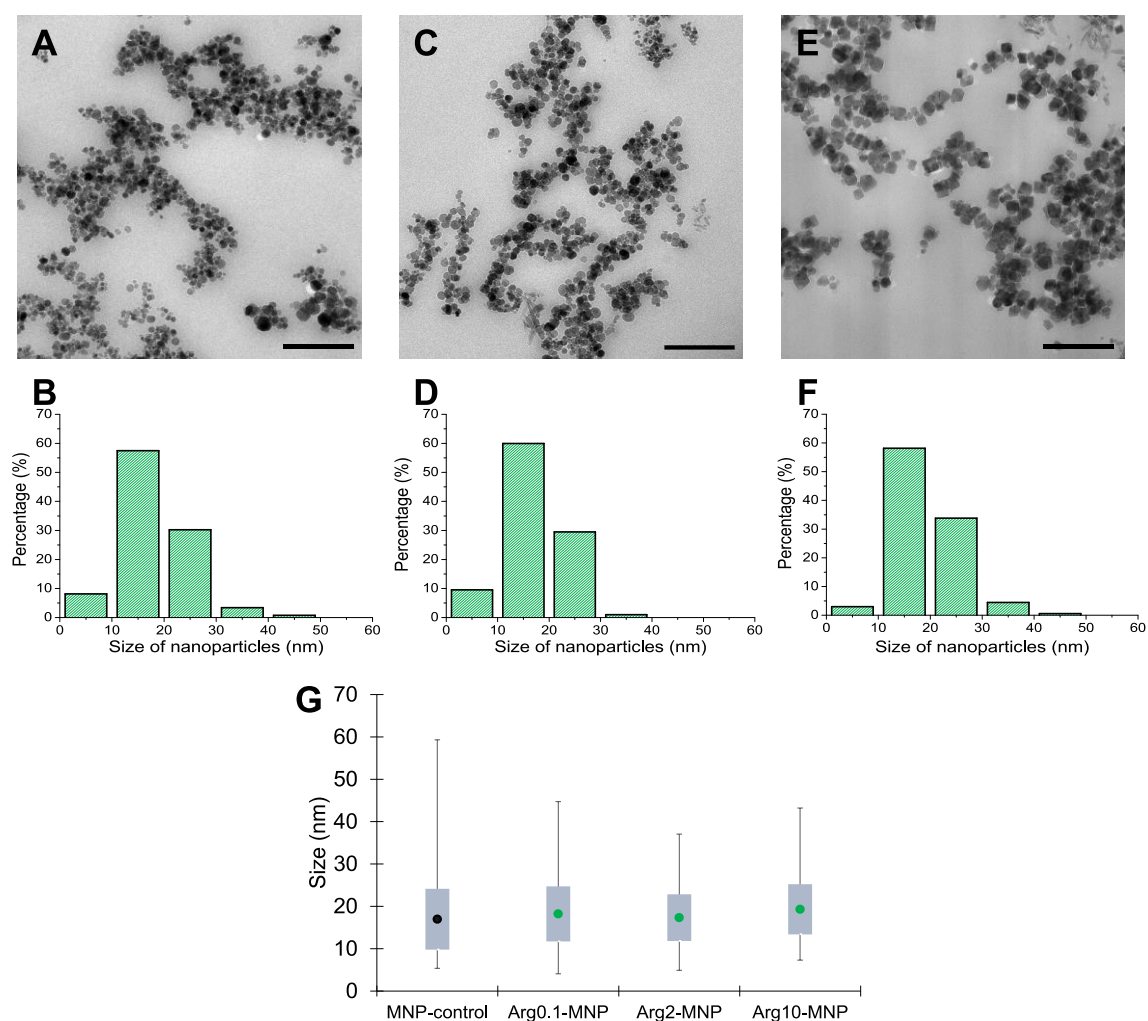
On the other hand, Lys and Arg could exert a stabilization effect over the magnetite nuclei mediated by their cationic lateral groups. In fact, while the hydrated surface of magnetite remain basically uncharged at physiological pH as a consequence of the dominant neutral surface species  $\equiv\text{Fe}(\text{II,III})\text{OH}$  at this pH (*eq. 1*), as pH value increases,  $\text{Fe}(\text{II,III})\text{OH}$  becomes dominant, and, at even higher pH values (as occurs under the condition at which our magnetite forms), the dominant species are  $\text{Fe}(\text{II,III})\text{O}^-$ , being, in these conditions, the surface of magnetite negatively charged:<sup>41</sup>





**Figure 2.** TEM images and size distribution of (A, B) Lys0.1-MNP, (C, D) Lys2-MNP, and (E, F) Lys10-MNP. Scale-bar corresponds to 200 nm. (G) Size distribution box plot. Statistical significance of alterations from Lys-bearing experiments among themselves and compared to the MNP-control was tested using the ANOVA test ( $P < 0.006$ ). Dots represent the average size; box represent the average  $\pm$  standard deviation and bars represent the minimum and maximum values.

In fact, TGA data of our experiments of incubation of Lys and Arg with previously formed MNPs show that Lys and Arg are adsorbed on the MNPs to a degree that is comparable to that measured in the MNPs that were synthesized in the presence of those amino acids (see Supporting Information; MNPs incubated with Lys and Arg showed 7.6 and 8.0 wt% loss, respectively) (Figure S2, Supporting Information). These results suggest that Lys and Arg, in the biomineralization experiments, are not being incorporated into the magnetite crystals but rather are exerting a surface interaction with the nuclei, as previous experiments are showing.



**Figure 3.** TEM images and size distribution of (A, B) Arg0.1-MNP, (C, D) Arg2-MNP, and (E, F) Arg10-MNP. Scale-bar corresponds to 200 nm. (G) Size distribution box plot. Statistical significance of alterations from Arg-bearing experiments among themselves and compared to the MNP-control was tested using the ANOVA test ( $P < 0.006$ ). Dots represent the average size; box represent the average  $\pm$  standard deviation and bars represent the minimum and maximum values.

Nevertheless, since the basicity of the ammonium group of Lys is significantly lower than that of the guanidinium group of the Arg, the electrostatic stabilization of the nuclei using these two amino acid is expected to be different. Moreover, it is also known that the guanidinium group of Arg is also able to form stable H-bonds with oxyanions groups.<sup>42-44</sup> Such a binding of previously formed nuclei may also determine the kinetics of crystal growth based on the strength of the binding, as it may allow or not, the subsequent release of the previously attached smaller nuclei to allow the growth of larger ones. Particularly, in our closed Fe-limited system, these Arg- strongly stabilized nuclei

do, probably, not re-dissolve easily in the time scale of the mineralization experiment and, therefore, the resulting crystals would have a size similar (or even smaller) compared to that of the crystals already formed by a direct coprecipitation in the absence of any amino acid, which is actually what we observe in our experiments. On the contrary, the weaker stabilization effect mediated by lysine could, probably, make it possible the re-dissolution of smaller nuclei in favor of the larger ones as the supersaturation of the system decreases during the time scale of the experiment.

To study how the pH of the media can modulate the effects of the amino acids in the magnetite mineralization, we have performed experiments at pH of 7, 8, 10, and 11 using Lys and Arg at 10 mM concentration. At pH = 7 and 8, in both cases, we did not observe the formation of magnetite; instead, goethite was the main mineral phase of the solid. Therefore, these experiments were not further considered. On the contrary, at pH = 10 and 11, MNPs of smaller sizes than those obtained at pH 9 were formed in the presence of Lys ( $16 \pm 4$  and  $15 \pm 4$  nm respectively, Figure S1, Supporting Information). This result reinforces again the key role that the lateral ammonium group is playing in stabilizing and releasing the magnetite nuclei at the specific pH = 9. At higher pH this group becomes neutral and can no longer interact with the magnetite nuclei and therefore cannot interfere in the re-dissolution-mineralization process. Moreover, as the ammonium group becomes neutral it turns into a primary amine that can also interact with iron cations favoring the formation of a greater number of nuclei that no longer are stabilized, ending up in MNPs of smaller sizes.

On the contrary, MNPs formed at higher pH values in the case of Arg were only slightly smaller (differences not significant) than those formed at pH value of 9 (Figure S1, Supporting Information). This result also points to the key role that lateral chain plays, since, as occurs at pH = 9, at pH values of 10 and 11 the guanidinium lateral group is still positively charged, thus behaving identically within this pH interval.

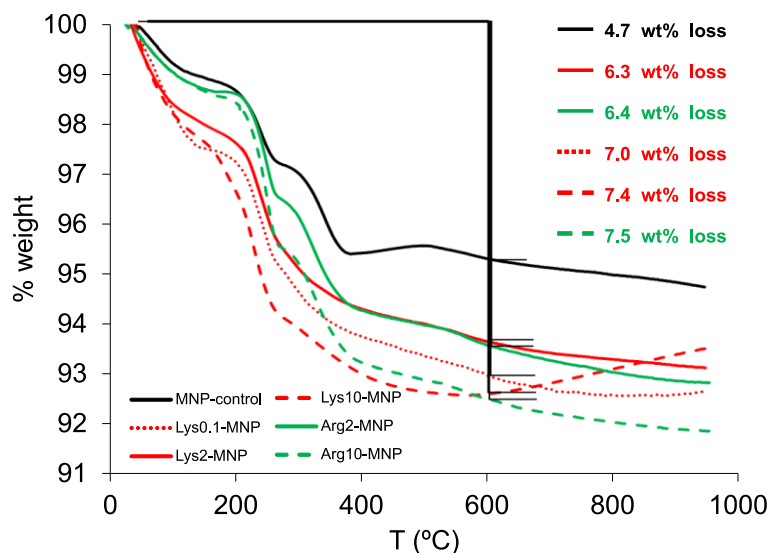
Moreover, in all cases, TGA analyses show that the MNPs formed in the presence of both Lys and Arg have greater wt% losses compared to those of MNPs formed in the absence of any amino acid (Figure 4), thus indicating their adsorption of these nanoparticles. In fact, wt% losses of Lys0.1-MNP, Lys2-MNP and Lys10-MNP, Arg2-MNP and Arg10-MNP were 7.0, 6.3 (6.4 for Arg2-MNP), and 7.4 (7.5 for Arg10-MNP) wt% respectively at 600 °C vs 4.7 wt% loss of MNPs control crystals, the latter due to



water release (Figure 4). These results show that both amino acids adsorb on the surface of the MNPs at all concentrations, reaching a maximum of 2.7-2.8 wt% adsorbed on the MNPs. The small differences on the amount of Lys and Arg adsorbed on the surface of the MNPs in the whole range of concentrations tested suggest that at some point, these amino acids saturate the surface of the MNPs and no significant further adsorption occurs, which is in agreement with a previous report.<sup>45</sup> These results are in line with those observed by other authors on MamC adsorption/incorporation on biomimetic magnetite nanoparticles.<sup>46</sup> As in this previous study, such a strong adsorption of amino acids on MNPs surface should have changed their surface properties with respect to those of the MNPs control.

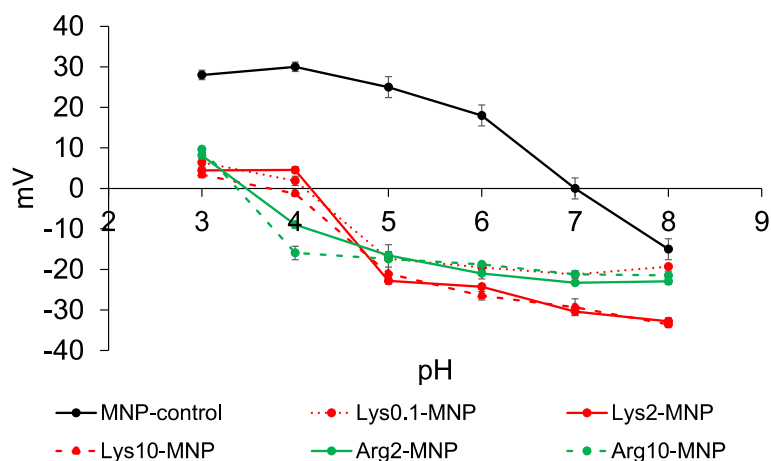
To test that, the electrophoretic mobility measurements and  $\zeta$ -potential determinations were performed (Figure 5). The  $\zeta$ -potential of all the samples from the Lys-bearing experiments showed that magnetite nanoparticles were negatively charged at pH 7.4 (-20 to -31 mV), displaying the isoelectric point (*iep*) at a pH value of  $\sim 4$  (with slight differences between samples), in contrast with that of the magnetite nanoparticles from the MNP-control experiment, in which the *iep* occurred at a pH of 7 (Figure 5). Similarly, the  $\zeta$ -potential of all the Arg samples also showed that the particles were strongly negatively charged at pH 7.4 ( $\sim -20$  mV), displaying the *iep* at a pH value of  $\sim 3.5$  (Figure 5). Therefore, while TGA data demonstrates that both amino acids interact with magnetite,  $\zeta$ -potential shows that such an interaction is probably through the basic amino acids with then expose the negatively charged groups, turning magnetite surface negatively charged. In fact, the negative values of  $\zeta$ -potential of the MNPs at pH values above 4 suggest that Lys and Arg are interacting with the surface of the MNPs through their cationic groups, thus exposing the carboxylic groups to the aqueous medium, which reinforces our statement of the role of the lateral group of Lys and Arg controlling the nucleation and growth of magnetite. Therefore, our results show that the nucleation of magnetite *in vitro* in the presence of Lys and Arg is controlled by the electrostatic interaction between the positively charged lateral group (ammonium group, in the case of Lys, and guanidinium group, in the case of Arg) and the negatively charged magnetite nuclei. Such an interaction modifies the kinetics of growth and results in the attachment of the amino acid to the magnetite nanoparticles, as shown by TGA and  $\zeta$ -potential data. As the supersaturation of the system decreases, and following an Ostwald step rule, the smaller nuclei dissolve in favor of the larger ones. However, in the presence of amino

acids, these nuclei are stabilized by the amino acids, and are not free to dissolve. Only in the case of Lys, in which the interaction between its ammonium group and the surface of the nuclei is weaker than that between the guanidinium group and the surface of magnetite, do the previously stabilized smaller nuclei dissolve, thus resulting in the formation of larger magnetite crystals.



**Figure 4.** TGA analyses of the magnetites precipitated in the MNP-control experiment, Lys, and Arg-bearing experiments.

By exposing the  $\text{COO}^-$  to the aqueous medium, the nanoparticle is strongly negatively charged at physiological pH values ( $-30$  mV) and this is important for several reasons. On one hand, because it may improve the colloidal stability of the nanoparticles by favouring electrostatic repulsion among them.<sup>47</sup> On the other hand, it provides functional groups that might be used for further coupling of these nanoparticles with other molecules based on electrostatic interactions, as occurs with other biomimetic MNPs.<sup>46,48</sup> Moreover, since Lys and Arg-bearing magnetite crystals become uncharged at acidic pH values, the release of the coupled molecules is expected to occur in response to changes in the environmental pH values toward acidic values, which occurs naturally in, for instance, tumor tissues. This opens the door for the potential applications of these nanoparticles as drug carriers for a targeted chemotherapy. The negatively charged surface is also important to minimize the potential interaction of these MNPs with plasma and blood cells, also negatively charged, favouring their circulation through the bloodstream.<sup>49</sup>

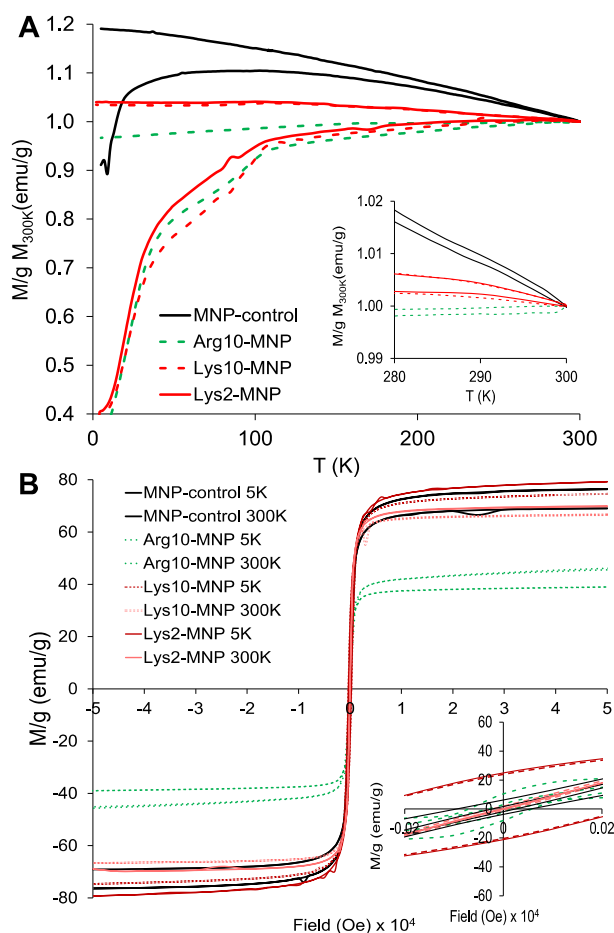


**Figure 5.**  $\zeta$ -potential of the magnetites precipitated in the MNP-control experiment and Lys and Arg-bearing experiments.

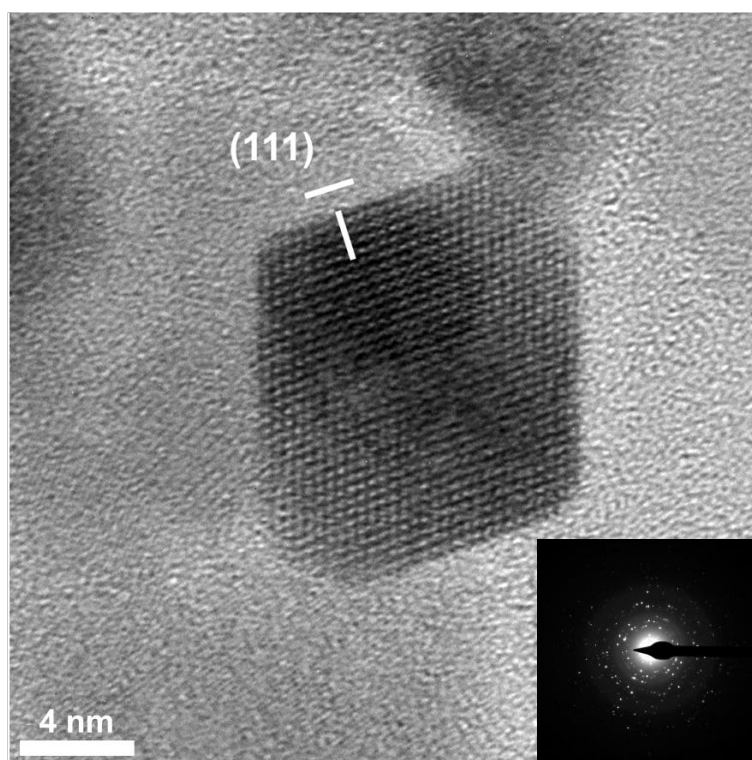
Since the size of the MNPs changed in the presence of Lys, the magnetic properties of these magnetites were determined by means of the zero field cooling-field cooling (ZFC-FC) curves and the hysteresis cycle and compared with the results obtained for Arg10-MNP. ZFC-FC curves at 500 Oe show differences between the different magnetic nanoparticles (Figure 6A). The slowest increase in magnetization was found in Lys10-MNP while the faster increase occurred in MNP-control experiment. In fact, the blocking temperature ( $T_B$ ) was 103 K for MNP-control, 270 K for Lys2-MNP, and 280 K for Lys10-MNP and Arg10-MNP. According to Prozorov et al.,<sup>5</sup> this slow magnetization increase and higher  $T_B$  is consistent with particles with high crystallinity and a large magnetic moment per particle in the case of Lys-bearing magnetites, particularly Lys10-MNP nanoparticles. The hysteresis loop of MNP-control and those from Lys- and Arg-bearing experiments shows a typical ferromagnetic behaviour at 5 K while, at 300 K, these nanoparticles show zero coercivity, which indicates their superparamagnetic character (Figure 6B). All these findings are important. On one hand, the higher  $T_B$  of Lys-bearing nanoparticles indicates larger crystals resulting from the mediation of Lys, which is in accordance with TEM observations (Figure 2). However, once an external magnetic field is applied, the MNPs respond efficiently, displaying a relatively high magnetization value (Figure 6). The magnetization saturation ( $M_s$ ) for MNP-control and Lys-bearing MNPs at 300 K is comparable, being 67 emu/g for Lys10-MNP and 70 emu/g for MNP-control and Lys2-MNP. The slight decrease of  $M_s$  for Lys10-MNP is probably due to a shielding of the magnetic core by the amino acid coating. The much lower  $M_s$  values for Arg10-MNPs are notable, which could also be associated

with the shielding of the magnetic core and to the small sizes of the MNPs resulting from these experiments.  $M_s$  values reported in the literature range from 83 to 92 emu/g for MNPs of sizes ranging from 12 to 45 nm and synthesized at high temperatures and in the presence of organic solvents.<sup>50,51</sup> The slightly lower magnetization of our MNPs compared to those of the literature could be due to the fact that at lower temperatures, monodispersity cannot be as well controlled as it is at higher temperatures, and some aggregation of MNPs may occur.<sup>52</sup>

Finally, the quality and morphology of the MNPs grown in the presence of Lys was determined by HR-TEM. These magnetite crystals displayed well-defined 2-D shapes such as hexagons and rhombs bounded by (111) crystal faces (Figure 7). In some cases, rounded corners were detected that can correspond to incipient (110) crystal faces, but in most cases, samples contained well-faceted crystals of very homogeneous size. Fast Fourier transform (FFT) images of the samples also demonstrated that the particles were single crystals of magnetite (Figure 7 detail), in line with that determined by XRD.



**Figure 6.** (A) ZFC-FC and (B) hysteresis cycles of MNP-control, Lys2-MNP, Lys10-MNP, and Arg10-MNP.



**Figure 7.** HR-TEM analyses of the crystal growth in the presence of Lys (Lys0.1-MNP) and Fast Fourier transform (FFT) (detail).

## Conclusions

In conclusion, in the present work we have studied the influence of Lys and Arg in the process of magnetite mineralization under bioinspired conditions. In both cases, magnetite crystals with well-defined morphologies have been obtained, displaying sizes that comprise values from 10 to 20 nm (similar to those of the inorganic control) when the MNPs were produced in the presence of Arg, while most of the magnetic nanoparticles had a larger size (20-40 nm) when the MNPs were produced in the presence of 10 mM of Lys. These amino acids adsorbed on the MNPs significantly changing the surface properties of the MNPs. In this context, MNPs coated with Lys and Arg are negatively charged at physiological pH (7.4) having *iep* at pH values close to 4 vs MNPs control that have an *iep* close to 7. These results show that the amino acids are interacting with the lateral positive groups to the surface of the magnetite exposing the negative carboxylic

groups to the water media. Presumably, these MNPs negatively charged at physiological pH are more biocompatible, since their plasma half-life is probably increased and might also have applications as drug delivery agents in which the drug release could be pH-dependent. Remarkably, we have shown that increasing amounts of Lys, on the contrary to Arg, are able to exert a control over the size of the resulting MNPs. The different basic and structural characters between the ammonium group of Lys and the guanidinium group of the Arg imply a different degree of stabilization of the preformed nuclei that, in the time scale of the mineralization experiment, could evolve differently, ending up in magnetite crystals of different sizes. Finally, Lys-bearing MNPs are superparamagnetic at room temperature and present a large magnetic moment per particle and high magnetization saturation values, properties that make them attractive for targeted-drug delivery and hyperthermia treatments.

## Acknowledgments

We want to thank “Unidad de Excelencia Química aplicada a Biomedicina y Medioambiente”, Ministerio de Educación, Ciencia, Deporte y Competitividad for FPU-grant (FPU16\_04580) and Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 of the University of Granada. Support from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain is acknowledged through the following projects: CGL2016-76723-P and FIS2017-85954-R (Ministerio de Economía y Competitividad from SPAIN and Agencia Estatal de Investigación, AEI, Spain, cofunded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, ERDF, European Union) and from Junta de Andalucía (Spain) projects P12-FQM-2721 and P12-FQM-790. Thanks go to the CIC personnel of the University of Granada for technical assistance. Finally, we would like to thank the Editor and reviewers whose suggestions greatly improved the manuscript.

## References

- (1) Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
- (2) Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222–1244.

- (3) Shubayev, V. I.; Pisanic, T. R.; Jin, S. Magnetic Nanoparticles for Theragnostics. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 467–477.
- (4) Arakaki, A.; Yamagishi, A.; Fukuyo, A.; Tanaka, M.; Matsunaga, T. Co-Ordinated Functions of Mms Proteins Define the Surface Structure of Cubo-Octahedral Magnetite Crystals in Magnetotactic Bacteria. *Mol. Microbiol.* **2014**, *93*, 554–567.
- (5) Prozorov, T.; Bazylnski, D. A.; Mallapragada, S. K.; Prozorov, R. Novel Magnetic Nanomaterials Inspired by Magnetotactic Bacteria: Topical Review. *Mater. Sci. Eng., R* **2013**, *74*, 133–172.
- (6) Mody, V. V.; Cox, A.; Shah, S.; Singh, A.; Bevins, W.; Parihar, H. Magnetic Nanoparticle Drug Delivery Systems for Targeting Tumor. *Appl. Nanosci.* **2014**, *4*, 385–392.
- (7) Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R167–R181.
- (8) Alphandéry, E.; Faure, S.; Seksek, O.; Guyot, F.; Chebbi, I. Chains of Magnetosomes Extracted from AMB-1 Magnetotactic Bacteria for Application in Alternative Magnetic Field Cancer Therapy. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6279–6296.
- (9) Lisy, M. R.; Hartung, A.; Lang, C.; Schüler, D.; Richter, W.; Reichenbach, J. R.; Kaiser, W. A.; Hilger, I. Fluorescent Bacterial Magnetic Nanoparticles as Bimodal Contrast Agents. *Invest. Radiol.* **2007**, *42*, 235–241.
- (10) Bulte, J. W. M.; Douglas, T.; Witwer, B.; Zhang, S.; Strable, E.; Lewis, B. K.; Zywicke, H.; Miller, B.; Moskowitz, B. M.; Duncan, I. D.; Frank, J. A. et al. Magnetodendrimers Allow Endosomal Magnetic Labeling and In Vivo Tracking of Stem Cells. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1141–1147.
- (11) Gupta, A. K.; Naregalkar, R. R.; Vaidya, V. D.; Gupta, M. Recent Advances on Surface Engineering of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 23–39.
- (12) Ota, H.; Lim, T. K.; Tanaka, T.; Yoshino, T.; Harada, M.; Matsunaga, T. Automated DNA Extraction from Genetically Modified Maize Using Aminosilane-Modified Bacterial Magnetic Particles. *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 361–368.
- (13) Lenders, J. J. M.; Altan, C. L.; Bomans, P. H. H.; Arakaki, A.; Bucak, S.; De With, G.; Sommerdijk, N. A. J. M. A Bioinspired Coprecipitation Method for the Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 5561–5568.
- (14) Goya, G. F.; Berquó, T. S.; Fonseca, F. C.; Morales, M. P. Static and Dynamic Magnetic Properties of Spherical Magnetite Nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2003**, *94*, 3520–3528.

- (15) Maeda, H. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189–207.
- (16) Arruebo, M.; Fernández-pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. *Nano Today* **2007**, *2*, 22–32.
- (17) El-Boubbou, K. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles as Drug Carriers: Preparation, Conjugation and Delivery. *Nanomedicine* **2018**, *13*, 929–952.
- (18) Kolhatkar, A. G.; Jamison, A. C.; Litvinov, D.; Willson, R. C.; Lee, T. R. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 15977–16009.
- (19) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (20) Nudelman, H.; Valverde-Tercedor, C.; Kolusheva, S.; Perez Gonzalez, T.; Widdrat, M.; Grimberg, N.; Levi, H.; Nelkenbaum, O.; Davidov, G.; Faivre, D.; Jimenez-Lopez, C.; Zarivach, R. Structure-Function Studies of the Magnetite-Biomining Magnetosome-Associated Protein MamC. *J. Struct. Biol.* **2016**, *194*, 244–252.
- (21) Prozorov, T.; Mallapragada, S. K.; Narasimhan, B.; Wang, L.; Palo, P.; Nilsen-Hamilton, M.; Williams, T. J.; Bazylinski, D. A.; Prozorov, R.; Canfield, P. C. Protein-Mediated Synthesis of Uniform Superparamagnetic Magnetite Nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 951–957.
- (22) Amemiya, Y.; Arakaki, A.; Staniland, S. S.; Tanaka, T.; Matsunaga, T. Controlled Formation of Magnetite Crystal by Partial Oxidation of Ferrous Hydroxide in the Presence of Recombinant Magnetotactic Bacterial Protein Mms6. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5381–5389.
- (23) Ubago-Rodríguez, A.; Casares Atienza, S.; Fernández-Vivas, A.; Peigneux, A.; Jabalera, Y.; De La Cuesta-Rivero, M.; Jimenez-Lopez, C.; Azuaga Fortes, A. I. Structure-Function of MamC Loop and Its Effect on the in Vitro Precipitation of Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 2927–2935.
- (24) Lopez-Moreno, R.; Fernández-Vivas, A.; Valverde-Tercedor, C.; Azuaga Fortes, A. I.; Casares Atienza, S.; Rodriguez-Navarro, A. B.; Zarivach, R.; Jimenez-Lopez, C. Magnetite Nanoparticles Biomining in the Presence of the Magnetosome Membrane Protein MamC: Effect of Protein Aggregation and Protein Structure on Magnetite Formation. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 1620–1629.
- (25) Valverde-Tercedor, C.; Montalbán-López, M.; Perez-Gonzalez, T.; Sanchez-Quesada, M. S.; Prozorov, T.; Pineda-Molina, E.; Fernandez-Vivas, M. A.; Rodriguez-Navarro, A. B.; Trubitsyn, D.; Bazylinski, D. A.; Jimenez-Lopez, C. Size Control of in Vitro Synthesized Magnetite Crystals by the MamC Protein of Magnetococcus Marinus Strain MC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5109–5121.



- (26) Arakaki, A.; Masuda, F.; Amemiya, Y.; Tanaka, T.; Matsunaga, T. Control of the Morphology and Size of Magnetite Particles with Peptides Mimicking the Mms6 Protein from Magnetotactic Bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *343*, 65–70.
- (27) Bird, S. M.; Rawlings, A. E.; Galloway, J. M.; Staniland, S. S. Using a Biomimetic Membrane Surface Experiment to Investigate the Activity of the Magnetite Biomineralisation Protein Mms6. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 7356–7363.
- (28) Rawlings, A. E.; Bramble, J. P.; Walker, R.; Bain, J.; Galloway, J. M.; Staniland, S. S. Self-assembled MmsF proteinosomes control magnetite nanoparticle formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 16094–16099..
- (29) Lenders, J. J. M.; Zope, H. R.; Yamagishi, A.; Bomans, P. H. H.; Arakaki, A.; Kros, A.; De With, G.; Sommerdijk, N. A. J. M. Bioinspired Magnetite Crystallization Directed by Random Copolypeptides. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 711–719.
- (30) Lenders, J. J. M.; Bawazer, L. A.; Green, D. C.; Zope, H. R.; Bomans, P. H. H.; de With, G.; Kros, A.; Meldrum, F. C.; Sommerdijk, N. A. J. M. Combinatorial Evolution of Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 711–719.
- (31) Baumgartner, J.; Antonietta Carillo, M.; Eckes, K. M.; Werner, P.; Faivre, D. Biomimetic Magnetite Formation: From Biocombinatorial Approaches to Mineralization Effects. *Langmuir* **2014**, *30*, 2129–2136.
- (32) Nosrati, H.; Salehiabar, M.; Attari, E.; Davaran, S.; Danafar, H.; Manjili, H. K. Green and One-Pot Surface Coating of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with Natural Amino Acids and Biocompatibility Investigation. *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, *32*, e4069.
- (33) Zhang, C.; Shan, C.; Jin, Y.; Tong, M. Enhanced Removal of Trace Arsenate by Magnetic Nanoparticles Modified with Arginine and Lysine. *Chem. Eng. J.* **2014**, *254*, 340–348.
- (34) Durmus, Z.; Kavas, H.; Toprak, M. S.; Baykal, A.; Altınçekiç, T. G.; Aslan, A.; Bozkurt, A.; Coşgun, S. L-Lysine Coated Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Structural and Conductivity Characterization. *J. Alloys Compd.* **2009**, *484*, 371–376.
- (35) Patel, D.; Chang, Y.; Lee, G. H. Amino Acid Functionalized Magnetite Nanoparticles in Saline Solution. *Curr. Appl. Phys.* **2009**, *9*, S32–S34.
- (36) Aliyu, H. N.; Na'aliya, J. Potentiometric Studies on Transition Metal(II) Essential Amino Acid Complexes. *Glob. Adv. Res. J. Microbiol.* **2012**, *1*, 72–78.
- (37) Yamauchi, O.; Odani, A. Stability Constants of Metal Complexes of Amino Acids with Charged Side Chains - Part I: Positively Charged Side Chains. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 469–496.

- (38) Flynn, S. M.; Clydesdale, F. M.; Zajicek, O. T. Complexation, Stability and Behavior of L-Cysteine and L-Lysine with Different Iron Sources. *J. Food Prot.* **1984**, *47*, 36–40.
- (39) Perez-Gonzalez, T.; Rodriguez-Navarro, A.; Jimenez-Lopez, C. Inorganic Magnetite Precipitation at 25 °C: A Low-Cost Inorganic Coprecipitation Method. *J. Supercond. Novel Magn.* **2011**, *24*, 549–557.
- (40) Bereczk-Tompa, É.; Vonderviszt, F.; Horváth, B.; Szalai, I.; Pósfai, M. Biotemplated Synthesis of Magnetic Filaments. *Nanoscale* **2017**, *9*, 15062–15069.
- (41) Sun, Z. X.; Su, F. W.; Forsling, W.; Samskog, P. O. Surface Characteristics of Magnetite in Aqueous Suspension. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *197*, 151–159.
- (42) Baker, H. M.; Anderson, B. F.; Baker, E. N. Bioinorganic Chemistry Special Feature. Dealing with Iron: Common Structural Principles in Proteins That Transport Iron and Heme. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **2003**, *100*, 3579–3583.
- (43) Li, L.; Vorobyov, I.; Allen, T. W. The Different Interactions of Lysine and Arginine Side Chains with Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 11906–11920.
- (44) Vazdar, M.; Jungwirth, P.; Mason, P. E. Aqueous Guanidinium-Carbonate Interactions by Molecular Dynamics and Neutron Scattering: Relevance to Ion-Protein Interactions. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 1844–1848.
- (45) Schwaminger, S. P.; García, P. F.; Merck, G. K.; Bodensteiner, F. A.; Heissler, S.; Günther, S.; Berensmeier, S. Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 23032–23041.
- (46) García Rubia, G.; Peigneux, A.; Jabalera, Y.; Puerma, J.; Oltolina, F.; Elert, K.; Colangelo, D.; Gómez Morales, J.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C. pH-Dependent Adsorption Release of Doxorubicin on MamC-Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Langmuir* **2018**, *34*, 13713–13724.
- (47) Park, J. Y.; Choi, E. S.; Baek, M. J.; Lee, G. H. Colloidal Stability of Amino Acid Coated Magnetite Nanoparticles in Physiological Fluid. *Mater. Lett.* **2009**, *63*, 379–381.
- (48) Kitadai, N.; Yokoyama, T.; Nakashima, S. ATR-IR Spectroscopic Study of L-Lysine Adsorption on Amorphous Silica. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *329*, 31–37.
- (49) Madden, V. J.; Napier, M. E.; Luft, J. C.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Gratton, S. E. A.; DeSimone, J. M. The Effect of Particle Design on Cellular Internalization Pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **2008**, *105*, 11613–11618.
- (50) Guardia, P.; Labarta, A.; Batlle, X. Tuning the Size, the Shape, and the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 390–396.

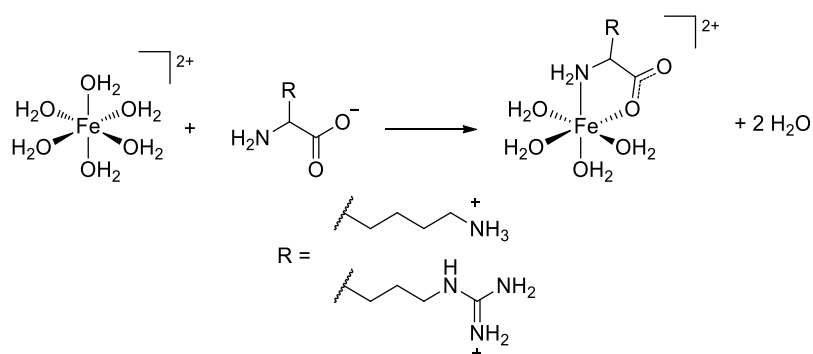
- (51) Caruntu, D.; Caruntu, G.; O'Connor, C. J Magnetic Properties of Variable-Sized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Synthesized from Non- Aqueous Homogeneous Solutions of Polyols. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2007**, *40*, 5801–5809.
- (52) Li, J.; Huang, Y.; Liu, X.; Lin, Y.; Bai, L.; Li, Q. Effect of Aggregates on the Magnetization Property of Ferrofluids: A Model of Gaslike Compression. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2007**, *8*, 448–454.

## Supporting Information

### Theoretical Calculations

DFT theoretical calculations were performed with Gaussian 09.<sup>S1</sup> The calculations were carried out at the UB3LYP/6-311<sup>++</sup>G(d,p) level using an ultra-fine integration grid.<sup>S2</sup> The calculations were done in water using the polarizable continuum model with the integral equation formalism (IEFPCM) included in Gaussian 09.<sup>S3</sup> Frequency calculations were performed to confirm the optimized structures corresponded to an energy minimum.

Gibbs Free Energy ( $\Delta G$ ) for the water-ligand exchange reactions between lysine (Lys) or arginine (Arg) and hexacoordinated  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  complexes to form the corresponding amino acid complexes (Scheme S1) were calculated as the difference between the calculated G values for products and reactants.<sup>S4</sup> A bidentate coordination mode was considered for the amino acids. High and low spin systems were calculated, being the high spin complexes more stable. The side chains of the amino acids have been considered in its protonated state. Counterions were not included in the calculations. The calculated  $\Delta G$  values are shown in Table S1.



**Figure S1.** . Water-ligand exchange reactions studied.

**Table S1.** Calculated  $\Delta G$  for the water-ligand exchange reaction between  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6$  and Lys or Arg  $\Delta G_{\text{r}} = G(\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4\text{L}) + 2G(\text{H}_2\text{O}) - G(\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6) - G(\text{L})$

	Complex	$\Delta G$ (kcal/mol)
Low spin	$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Lys}]^{2+}$	-34.264
	$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Arg}]^{2+}$	-34.617
High spin	$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Lys}]^{2+}$	-25.961
	$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Arg}]^{2+}$	-25.369

The structure, atomic coordinates and energy values obtained for the different species are shown in Tables S2-S10. C–H hydrogen atoms are omitted for clarity in the structures. Color code: C: gray, O: red, N: blue, H: white, Fe: orange.

**Table S2.** Atomic coordinates for the DFT optimized structure of  $\text{H}_2\text{O}$

Atom	X	Y	Z
O	0	0	0.117975
H	0	0.762116	-0.471901
H	0	-0.762116	-0.471901

Charge = 0; multiplicity = 1; (0 imaginary frequencies)

Zero-point correction = 0.021198 (Hartree/Particle)

Thermal correction to Energy = 0.024034

Thermal correction to Enthalpy = 0.024978

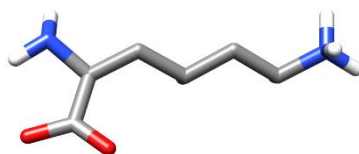
Thermal correction to Gibbs Free Energy = 0.003548

Sum of electronic and zero-point Energies = -76.445281

Sum of electronic and thermal Energies = -76.442445

Sum of electronic and thermal Enthalpies = -76.441501

Sum of electronic and thermal Free Energies = -76.462930

**Table S3.** Atomic coordinates for the DFT optimized structure of lysine

Atom	X	Y	Z
N	2.668532	1.649845	-0.163466
H	3.611451	1.357628	0.079018
C	1.748119	0.584619	0.279607
H	1.624488	0.603053	1.377166
C	0.363538	0.798730	-0.349275
C	2.404342	-0.799747	-0.017662
H	0.165028	1.877806	-0.360490
H	0.390180	0.474409	-1.395088
C	-0.783837	0.099201	0.386392
O	3.655236	-0.855727	0.143707
O	1.655224	-1.751374	-0.353157
H	-0.581189	-0.973638	0.422757
H	-0.819565	0.457154	1.423005
C	-2.143335	0.348935	-0.280169
H	-2.344154	1.425355	-0.323222
H	-2.117597	-0.016338	-1.313032
C	-3.263911	-0.349367	0.476783
H	-3.118837	-1.428447	0.512999
H	-3.366782	0.026077	1.494283
N	-4.603803	-0.126771	-0.191258
H	-4.604344	-0.475640	-1.152794
H	-5.356329	-0.605676	0.308541
H	-4.844568	0.866776	-0.225950
H	2.475938	2.512541	0.337405

Charge = 0; multiplicity = 1; (0 imaginary frequencies)

Zero-point correction = 0.212795 (Hartree/Particle)

Thermal correction to Energy = 0.224693

Thermal correction to Enthalpy = 0.225637

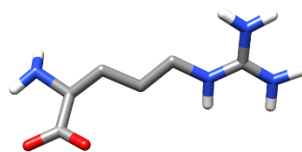
Thermal correction to Gibbs Free Energy = 0.172944

Sum of electronic and zero-point Energies = -496.984339

Sum of electronic and thermal Energies = -496.972441

Sum of electronic and thermal Enthalpies = -496.971497

Sum of electronic and thermal Free Energies = -497.024190

**Table S4.** Atomic coordinates for the DFT optimized structure of arginine.

Atom	X	Y	Z
N	-3.514084	1.572901	-0.225098
H	-4.439587	1.189383	-0.397165
C	-2.540650	0.480952	-0.416061
H	-2.409069	0.252943	-1.488665
C	-1.174321	0.902172	0.143332
C	-3.131553	-0.827878	0.196401
H	-1.014163	1.955191	-0.118843
H	-1.203926	0.850363	1.236611
C	0.000478	0.077309	-0.390563
O	-4.370356	-0.995516	0.024418
O	-2.345400	-1.621590	0.771920
H	-0.166338	-0.975503	-0.152101
H	0.049524	0.170757	-1.481937
C	1.330248	0.532115	0.206572
H	1.520499	1.579666	-0.048579
H	1.297980	0.442629	1.297429
N	2.426188	-0.297377	-0.316980
H	2.173949	-1.070750	-0.915489
C	3.716665	-0.135355	-0.032889
N	4.108393	0.827407	0.806548
N	4.635183	-0.927278	-0.604689
H	3.442889	1.436339	1.253187
H	5.085514	0.999040	0.982869
H	4.356084	-1.695034	-1.194624
H	5.594221	-0.913140	-0.295726
H	-3.356492	2.309513	-0.906892

Charge = 0; multiplicity = 1; (0 imaginary frequencies)

Zero-point correction = 0.220079 (Hartree/Particle)

Thermal correction to Energy = 0.234945

Thermal correction to Enthalpy = 0.235889

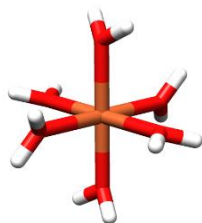
Thermal correction to Gibbs Free Energy = 0.176481

Sum of electronic and zero-point Energies = -606.542084

Sum of electronic and thermal Energies = -606.527218

Sum of electronic and thermal Enthalpies = -606.526274

Sum of electronic and thermal Free Energies = -606.585682

**Table S5.** Atomic coordinates for the DFT optimized structure of  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  (low spin).

Atom	X	Y	Z
Fe	-0.000005	-0.000032	0.000001
O	-1.658853	0.354011	1.091271
H	-2.355307	-0.312184	1.010632
O	-1.159792	-1.255944	-1.070012
H	-1.377635	-1.082285	-1.995227
O	0.532791	-1.631925	1.058362
H	1.455182	-1.905573	0.960876
O	1.159719	1.255880	1.070024
H	0.931247	2.192916	0.999418
O	-0.532710	1.632014	-1.058325
H	-0.302515	1.732429	-1.991381
O	1.658893	-0.353997	-1.091297
H	1.608976	-0.603413	-2.023419
H	1.377597	1.082493	1.995281
H	0.302492	-1.732413	1.991371
H	-1.608985	0.603459	2.023384
H	-1.455086	1.905719	-0.960730
H	-0.931397	-2.193019	-0.999673
H	2.355180	0.312385	-1.010727

Charge = 2; multiplicity = 1; (0 imaginary frequencies)

Zero-point correction = 0.155028 (Hartree/Particle)

Thermal correction to Energy = 0.170344

Thermal correction to Enthalpy = 0.171288

Thermal correction to Gibbs Free Energy = 0.116755

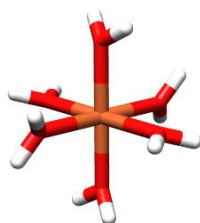
Sum of electronic and zero-point Energies = -1722.107703

Sum of electronic and thermal Energies = -1722.092387

Sum of electronic and thermal Enthalpies = -1722.091443

Sum of electronic and thermal Free Energies = -1722.145976



**Table S6.** Atomic coordinates for the DFT optimized structure of  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  (high spin).

Atom	X	Y	Z
Fe	0.000359	0.000251	0.000437
O	-1.224889	0.294087	-1.711231
H	-2.114144	0.667458	-1.664620
O	-1.804394	0.148464	1.171246
H	-2.470669	-0.545760	1.246608
O	0.239010	2.124976	0.198819
H	0.836238	2.489092	0.864785
O	1.803126	-0.146786	-1.172308
H	1.907858	-0.728612	-1.935194
O	-0.239610	-2.124388	-0.199830
H	-0.245444	-2.731607	0.551194
O	1.225215	-0.296359	1.711705
H	0.922276	-0.379404	2.624558
H	2.473014	0.544142	-1.245657
H	0.247352	2.730877	-0.553195
H	-0.921545	0.375555	-2.624097
H	-0.839653	-2.486960	-0.864083
H	-1.907251	0.727192	1.936754
H	2.114971	-0.668451	1.664357

Charge = 2; multiplicity = 5; (0 imaginary frequencies)

Zero-point correction = 0.146198 (Hartree/Particle)

Thermal correction to Energy = 0.166239

Thermal correction to Enthalpy = 0.167184

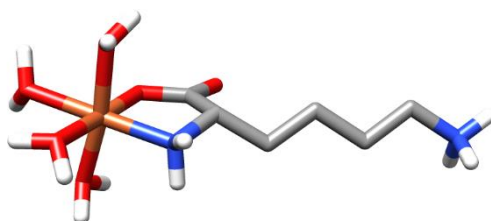
Thermal correction to Gibbs Free Energy = 0.097658

Sum of electronic and zero-point Energies = -1722.157720

Sum of electronic and thermal Energies = -1722.137678

Sum of electronic and thermal Enthalpies = -1722.136734

Sum of electronic and thermal Free Energies = -1722.206260

**Table S7.** Atomic coordinates for the DFT optimized structure of  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Lys}]^{2+}$  (low spin).

Atom	X	Y	Z
Fe	-2.338856	-0.133723	-0.011427
O	-3.541135	-1.802894	0.034416
H	-3.363950	-2.575460	-0.516479
O	-2.365320	-0.255653	2.023937
H	-1.729140	0.241159	2.553248
O	-4.110052	0.894400	0.196681
H	-4.295732	1.533071	-0.503896
O	-2.588411	0.169372	-2.014590
H	-1.991101	0.834455	-2.382565
H	-4.206133	1.365559	1.034572
H	-2.443780	-1.133053	2.420185
H	-4.478173	-1.591898	-0.076465
H	-2.639763	-0.551512	-2.655183
C	0.071176	1.280352	0.039412
O	0.900719	2.189159	-0.019315
C	0.526750	-0.187538	0.221831
H	0.613258	-0.338790	1.302831
N	-0.581983	-1.084994	-0.235129
H	-0.510233	-1.977784	0.249528
H	-0.445547	-1.304047	-1.221624
C	1.873190	-0.531972	-0.433989
H	1.922555	-1.621024	-0.545970
H	1.903943	-0.107043	-1.443196
C	3.093023	-0.066274	0.370357
H	3.031844	1.012554	0.526852
H	3.069755	-0.539229	1.359206
C	4.412713	-0.415424	-0.329737
H	4.466145	-1.495355	-0.506977
H	4.450072	0.075957	-1.308091
C	5.608000	0.022015	0.505437
H	5.610757	1.096851	0.683176
H	5.646729	-0.493817	1.464087
N	6.910102	-0.291690	-0.196779
H	6.983947	0.206721	-1.087093
H	7.715437	-0.021654	0.372395

H	6.997674	-1.290979	-0.396631
O	-1.208835	1.453360	-0.001297

Charge = 2; multiplicity = 1; (0 imaginary frequencies)

Zero-point correction = 0.320648 (Hartree/Particle)

Thermal correction to Energy = 0.343501

Thermal correction to Enthalpy = 0.344445

Thermal correction to Gibbs Free Energy = 0.270201

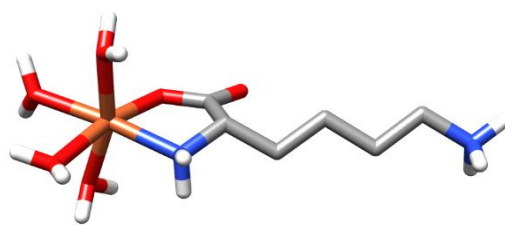
Sum of electronic and zero-point Energies = -2066.248462

Sum of electronic and thermal Energies = -2066.225610

Sum of electronic and thermal Enthalpies = -2066.224665

Sum of electronic and thermal Free Energies = -2066.298909

**Table S8.** Atomic coordinates for the DFT optimized structure of  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Lys}]^{2+}$  (high spin).



Atom	X	Y	Z
Fe	-2.384359	-0.068413	0.049958
O	-3.597188	-1.769825	-0.646445
H	-3.292518	-2.685641	-0.632634
O	-2.443011	-0.920924	2.087448
H	-2.365077	-0.349715	2.861717
O	-4.363835	0.757766	0.462919
H	-4.692710	1.389070	-0.189643
O	-2.949741	0.741662	-1.988084
H	-2.411380	1.460903	-2.341418
H	-4.679932	1.047254	1.327416
H	-1.995948	-1.746099	2.312567
H	-4.511570	-1.777168	-0.334797
H	-3.069468	0.112070	-2.710013
C	0.182951	1.251341	0.259109
O	1.018822	2.150407	0.330733
C	0.631483	-0.227706	0.121321
H	0.698991	-0.601229	1.149500
N	-0.464370	-1.003094	-0.525926
H	-0.360487	-1.989760	-0.301839
H	-0.373245	-0.938935	-1.538720

C	1.991077	-0.426318	-0.568483
H	2.053781	-1.475701	-0.877833
H	2.024692	0.176134	-1.483019
C	3.201575	-0.103056	0.315965
H	3.153287	0.942979	0.624438
H	3.153899	-0.711616	1.226821
C	4.529614	-0.374106	-0.403497
H	4.592718	-1.432406	-0.680758
H	4.571363	0.207437	-1.330913
C	5.714376	-0.006430	0.478868
H	5.725820	1.054668	0.725374
H	5.729628	-0.582704	1.403204
N	7.025989	-0.291927	-0.217660
H	7.114991	0.243926	-1.084441
H	7.823562	-0.050026	0.374518
H	7.114159	-1.281598	-0.460150
O	-1.096174	1.434626	0.334319

Charge = 2; multiplicity = 5; (0 imaginary frequencies)

Zero-point correction = 0.314421 (Hartree/Particle)

Thermal correction to Energy = 0.340348

Thermal correction to Enthalpy = 0.341292

Thermal correction to Gibbs Free Energy = 0.256752

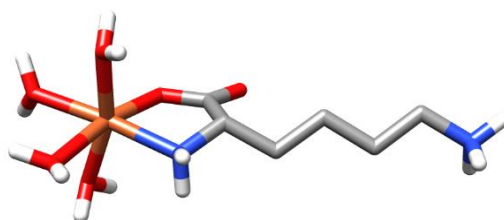
Sum of electronic and zero-point Energies = -2066.288292

Sum of electronic and thermal Energies = -2066.262365

Sum of electronic and thermal Enthalpies = -2066.261421

Sum of electronic and thermal Free Energies = -2066.345961

**Table S9.** Atomic coordinates for the DFT optimized structure of  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Arg}]^{2+}$  (low spin).



Atom	X	Y	Z
Fe	-2.997023	-0.112716	0.048541
O	-4.210041	-1.559759	0.866568
H	-4.022750	-2.501295	0.764285
O	-3.056140	0.746728	1.895889
H	-2.407642	1.415472	2.148877

O	-4.761379	0.889165	-0.293014
H	-4.927556	1.119886	-1.216236
O	-3.209320	-0.803495	-1.860888
H	-2.592175	-0.404305	-2.488641
H	-4.867173	1.701011	0.219863
H	-3.168891	0.156999	2.652683
H	-5.144527	-1.437923	0.650249
H	-3.270561	-1.741788	-2.080753
C	-0.576561	1.148111	-0.555950
O	0.261860	1.911087	-1.038003
C	-0.134234	-0.050352	0.317944
H	-0.051093	0.341166	1.337020
N	-1.246020	-1.053366	0.347037
H	-1.189417	-1.586984	1.212513
H	-1.098745	-1.733995	-0.397831
C	1.207466	-0.683232	-0.081804
H	1.256264	-1.676603	0.378003
H	1.226311	-0.833084	-1.166738
C	2.433826	0.123931	0.359243
H	2.398847	1.118954	-0.087162
H	2.413679	0.244318	1.448597
C	3.729870	-0.577466	-0.043970
H	3.765835	-1.581275	0.392428
H	3.776289	-0.672786	-1.132789
O	-1.854341	1.285208	-0.685623
C	6.155921	-0.047584	0.081435
N	6.462578	-1.104328	-0.676261
N	7.129087	0.775904	0.490675
H	8.099975	0.541130	0.359871
H	6.919364	1.607472	1.019259
H	7.408758	-1.265742	-0.983349
H	5.773025	-1.797120	-0.917278
H	4.717927	0.955777	1.061276
N	4.889215	0.200277	0.413260

Charge = 2; multiplicity = 1; (0 imaginary frequencies)

Zero-point correction = 0.327436 (Hartree/Particle)

Thermal correction to Energy = 0.353544

Thermal correction to Enthalpy = 0.354488

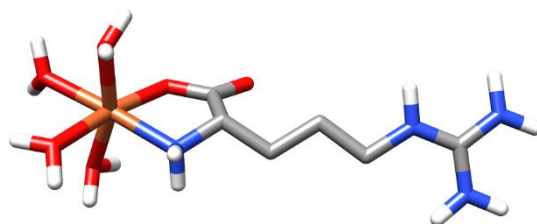
Thermal correction to Gibbs Free Energy = 0.272312

Sum of electronic and zero-point Energies = -2175.805840

Sum of electronic and thermal Energies = -2175.779732

Sum of electronic and thermal Enthalpies = -2175.778788

Sum of electronic and thermal Free Energies = -2175.860964

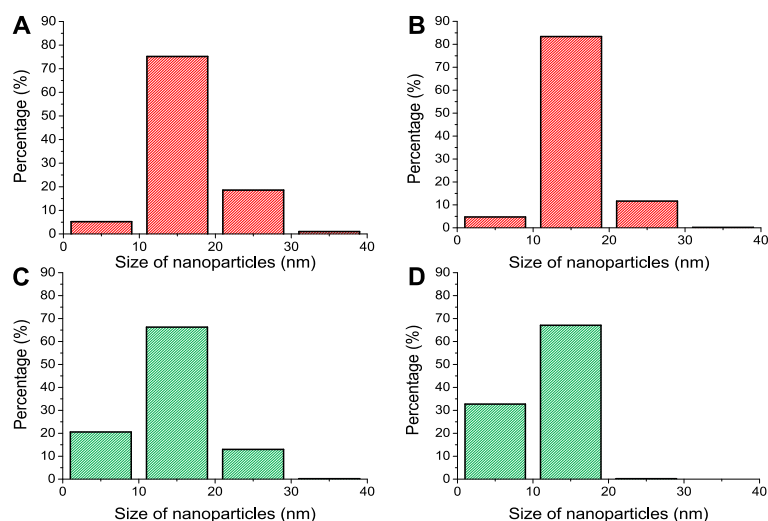
**Table S10.** Atomic coordinates for the DFT optimized structure of  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Arg}]^{2+}$  (high spin).

Atom	X	Y	Z
Fe	3.058465	0.026522	0.045992
O	4.243332	1.601705	1.024419
H	4.050360	2.542689	0.928934
O	3.169502	-0.930326	2.050201
H	2.772606	-1.797536	2.198663
O	5.010173	-0.884495	-0.250246
H	5.406736	-0.882511	-1.130212
O	3.570901	0.943634	-1.944504
H	3.126120	0.542851	-2.702234
H	5.285538	-1.697941	0.189780
H	2.989074	-0.408300	2.841698
H	5.203823	1.508721	0.980221
H	3.541612	1.897311	-2.090870
C	0.474304	-1.053122	-0.698057
O	-0.374479	-1.736071	-1.269121
C	0.041175	0.072769	0.278798
H	-0.022393	-0.409557	1.260623
N	1.138943	1.073976	0.380492
H	1.067669	1.574057	1.263271
H	1.027013	1.778019	-0.347354
C	-1.316294	0.715911	-0.050643
H	-1.372809	1.664036	0.495009
H	-1.348945	0.960914	-1.117879
C	-2.529425	-0.141997	0.326982
H	-2.492948	-1.087212	-0.216961
H	-2.494828	-0.369920	1.398497
C	-3.836657	0.582307	0.010761
H	-3.892447	1.521142	0.572005
H	-3.881252	0.815495	-1.057289
O	1.751051	-1.225543	-0.811021
C	-6.256407	0.025608	0.096395
N	-6.574881	1.181400	-0.493547
N	-7.224100	-0.840683	0.425150
H	-8.187937	-0.650967	0.200800
H	-6.997278	-1.776837	0.721259

H	-7.534899	1.413346	-0.693554
H	-5.888256	1.905061	-0.631193
H	-4.796496	-1.122890	0.862242
N	-4.983414	-0.267497	0.358693

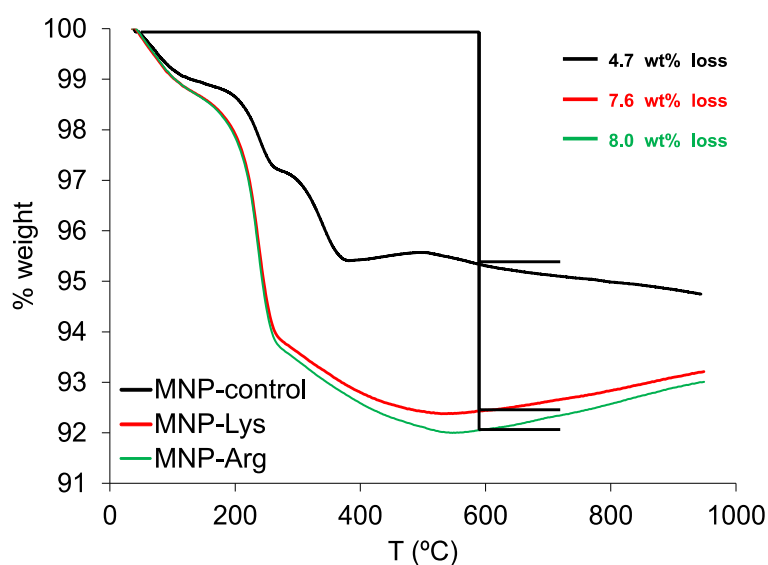
Charge = 2; multiplicity = 5; (0 imaginary frequencies)  
 Zero-point correction = 0.321769 (Hartree/Particle)  
 Thermal correction to Energy = 0.350612  
 Thermal correction to Enthalpy = 0.351557  
 Thermal correction to Gibbs Free Energy = 0.260381  
 Sum of electronic and zero-point Energies = -2175.845123  
 Sum of electronic and thermal Energies = -2175.816279  
 Sum of electronic and thermal Enthalpies = -2175.815335  
 Sum of electronic and thermal Free Energies = -2175.906510

### Biom mineralization Experiments at pH = 10 and pH = 11



**Figure S1.** Size distribution of magnetite nanoparticles in the presence of Lys 10 mM at pH = 10 (A) and pH = 11 (B). Size distribution of magnetite nanoparticles in the presence of Arg 10 mM at pH = 10 (C) and pH = 11 (D).

## TGA Experiments



**Figure S2.** TGA analyses of the magnetites precipitated using previously formed MNP-control particles incubated with Lys and Arg at 10 mM conc. during 24 h.

## References

- S1 Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision B.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT **2010**.
- S2 A similar theory level has been previously employed for similar Fe complexes with aminoacids, see: Mandado, M.; Cordeiro, N. D. S. On the stability of metal–aminoacid complexes in water based on water–ligand exchange reactions and electronic properties: Detailed study on iron–glycine hexacoordinated complexes. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 2735.
- S3 Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999.
- S4 Ochterski, J. W. Thermochemistry in Gaussian. *Gaussian, Inc.*, **2000**.



## **CAPÍTULO II**



*Este artículo se ha publicado en la revista indexada en JCR: Pharmaceutics*

*(<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080408>)*

## **Biomimetic Magnetic Nanocarriers Drive Choline Kinase Alpha Inhibitor inside Cancer Cells for Combined Chemo-Hyperthermia Therapy**

Ylenia Jabalera<sup>#,1</sup>, Alberto Sola-Leyva<sup>#,2</sup>, Ana Peigneux<sup>1</sup>, Federica Vurro<sup>3</sup>, Guillermo R. Iglesias<sup>4</sup>, Jesus Vilchez-Garcia<sup>1</sup>, Inmaculada Pérez-Prieto<sup>2</sup>, Francisco J. Aguilar-Troyano<sup>5</sup>, Luisa C. López-Cara<sup>5</sup>, María P. Carrasco-Jiménez<sup>\*,2</sup> and Concepcion Jimenez-Lopez<sup>\*,1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>3</sup>Department of Neurosciences, Biomedicine and Movement Sciences, Anatomy and Histology Section, University of Verona, 37134 Verona, Italy

<sup>4</sup>Department of Applied Physics, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>5</sup>Department of Pharmaceutical and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Campus of Cartuja, 18071 Granada, Spain

\*Corresponding authors

#These authors contributed equally to this work.

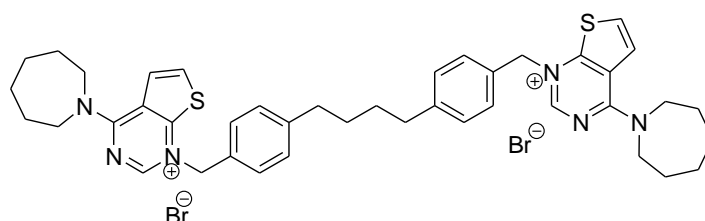
## Abstract

Choline kinase  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ) has become an excellent antitumor target. Among all the inhibitors synthesized, the new compound Ff35 shows an excellent capacity to inhibit ChoK $\alpha 1$  activity. However, soluble Ff35 is also capable of inhibiting choline uptake, making the inhibitor not selective for ChoK $\alpha 1$ . In this study, we designed a new protocol with the aim of disentangling whether the Ff35 biological action is due to the inhibition of the enzyme and/or to the choline uptake. Moreover, we offer an alternative to avoid the inhibition of choline uptake caused by Ff35, since the coupling of Ff35 to novel biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs) allows it to enter the cell through endocytosis without interacting with the choline transporter. This opens the possibility of a clinical use of Ff35. Our results indicate that Ff35-BMNPs nanoassemblies increase the selectivity of Ff35 and have an antiproliferative effect. In addition, we demonstrate the effectiveness of the tandem Ff35-BMNPs and hyperthermia.

## Introduction

Chemoresistance to cancer is a major concern [1,2] that has prompted the development of new effective therapies. Among them, those that affect lipid metabolism, whose alteration occurs in many types of cancer [3,4], have gained great attention. Particularly, the metabolism of choline has been associated with tumor onset and progression. In this context, choline kinase  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ) isoform has been considered as biomarker of tumor progression and carcinogenesis [5–7], and it has emerged as one of the most promising therapeutic target enzymes in cancer. ChoK catalyzes the phosphorylation of choline to generate phosphocholine that, through cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) [8], produces phosphatidylcholine. ChoK $\alpha$  also regulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K/AKT) signaling pathways [9]. Extensive efforts have been made to synthesize and improve ChoK $\alpha 1$  inhibitors in order to use them as chemotherapeutic agents [10,11], since it is well known that ChoK $\alpha 1$  inhibitors have antiproliferative effect on several tumor cell lines [12]. Hemicholinium-3 was the first one used in clinics, but it has multiple side effects, mainly due to the inhibition of choline uptake and the impediment of the synthesis of acetylcholine [13]. Afterward, bis-pyridinium and bis-quinolinium derivatives, namely MN58b and RSM-932A, respectively, were also produced with high

capacity to inhibit ChoK $\alpha$ 1 activity and cell proliferation [14], and, even more recently, several other compounds have been synthesized based on the chemical structure of the former compounds [12]. In particular one of them, here referred as Ff35 (Figure 1), contains bioisoteric rings of the quinoline, where carbon atoms have been replaced by nitrogen and sulphur atoms, and the same spacer as that of the compound MN58b [15]. These changes would lead, on one hand, to an increase of the polarity (and solubility) of the compound and, on the other hand, to an increase of the specificity of the drug. The latter is due to the increasing number of free electron pairs that these modifications induce, which can form hydrogen bonds or dipole–dipole type junctions between the molecule and the enzyme, thus increasing the antiproliferative effect of the drug.



**Figure 1.** Chemical structure of choline kinase  $\alpha$ 1 (ChoK $\alpha$ 1) inhibitor Ff35.

However, it has been described that certain inhibitors of ChoK $\alpha$ 1, besides hemicholinium-3, are also capable of inhibiting choline uptake, thus making it more difficult, if not impossible, for their use in systemic clinical treatments [16]. For this reason, firstly, for any newly synthesized inhibitor of ChoK $\alpha$ 1 and before proposing it as antitumoral drug, it is imperative to design protocols to discern whether the resulting inhibition of tumor cell proliferation is due to the inhibition of the enzyme (which would allow the potential use of the compound in clinics) or whether it is caused by the inhibition of the choline uptake (which may prevent its potential use). Moreover, if the latter is the case, it is also crucial to design strategies to avoid the inhibition of choline uptake. A possibility to prevent such inhibition is to use carriers to introduce the specific ChoK $\alpha$ 1 inhibitor in the cell without interacting with the choline transporters. In this context, one alternative is to couple the compound with nanoparticles that could enter the cell by endocytosis, as we propose for the first time in the present study.

Among the potential nanocarriers, magnetic nanoparticles are preferred because of their biocompatibility and their magnetic properties, which, on one hand, allow their guidance to the target site and their concentration therein by the application of external

magnetic fields and, on the other, they allow the nanoparticle itself to be used as hyperthermia agent [17]. Biomimetic magnetic nanoparticles, BMNPs, mediated by *Magnetococcus marinus* MC-1 magnetosome membrane protein MamC, have demonstrated themselves to be promising nanocarriers, able to couple with drugs forming stable nanoassemblies at physiological pH, while efficiently releasing the drug in acidic (tumor) environments in response to pH changes. In fact, these BMNPs present novel features compared to other nanoparticles produced inorganically and/or other biomimetic nanoparticles [18]: (1) They are superparamagnetic (single magnetic domain) at room and body temperature, behaving as nonmagnetic in the absence of an external magnetic field (thus minimizing aggregation), while they present a large magnetic moment per particle under the influence of an external magnetic field, thus optimizing their guidance and concentration at the target site. Such behaviour is due to the fact that these BMNPs are larger than most commercial and/or other biomimetic magnetic nanoparticles. (2) the BMNPs are cytocompatible and even more, (3) they are produced by means of an eco-friendly, cost effective, easily scalable method.

To our understanding, this is the first study that explores the functionalization of BMNPs with a ChoK $\alpha$ 1 inhibitor, such as Ff35, with the goal of obtaining a potential nanoassembly suitable for a targeted chemotherapy that avoids possible side effects related to the inhibition of the choline uptake. Moreover, the simultaneous use of hyperthermia is explored to optimize the effect of the targeted chemotherapy in terms of increasing the cytotoxic effect of the nanoassembly. The *in vitro* antitumor activity and the internalization of these complexes were investigated in the human hepatoblastoma cell line, HepG2.

## Experimental Section

### Expression and Purification of MamC. Synthesis and Characterization of the BMNPs by Transmission Electron Microscopy

MamC expression and purification was performed as previously described by Valverde-Tercedor et al. [19]. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) were transformed with the pTrcHis-TOPO plasmid (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) carrying the MamC protein coding gene (Mmc1\_2265). These cells were grown at

37 °C and MamC overproduction was induced with isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG). Afterwards, a HiTrap chelating HP column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) in an ÄKTA Prime Plus FPLC System (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) was used to purify the protein under denaturing conditions (6 M urea). Lastly, dialysis was performed for a gradual removal of urea, which allowed MamC to refold progressively and the purity was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis.

BMNPs were synthesized from the following master solution: 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of the recombinant MamC,  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  (2.78 mM),  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3.5 mM/3.5 mM),  $\text{FeCl}_3$  (5.56 mM), pH 9, elaborated from oxygen-free stock concentrated solutions of the individual compounds [20]. The master solution was incubated for 30 days in an anaerobic COY chamber at 25 °C and 1 atm total pressure. After this time, BMNPs were concentrated by using a magnet and the supernatant was discarded. Subsequently, the precipitates were washed three times with Milly-Q deoxygenated water, suspended in HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) buffered saline solution (0.01 M HEPES, pH 7.2, 0.15 M NaCl), and sterilized at 121 °C for 21 min in an autoclave before their use.

The BMNPs used in the present study have been previously characterized in García-Rubia et al. [18], and, therefore, only basic mineral characterization is included in the present manuscript. According to these results, the BMNPs used in the present study are superparamagnetic magnetic nanoparticles at 300 K, composed of ~95 wt% of magnetite and ~5 wt% of MamC, with an isoelectric point of 4.4 and specific surface area of 90  $\text{m}^2/\text{g}$ .

For transmission electron microscopy (TEM) analyses of the BMNPs, a STEM Philips Model CM20 microscope was used. BMNPs were embedded into Embed 812 resin and then, ultrathin sections (50–70 nm) were cut with a Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). ImageJ 1.47 software was used to measure particle sizes on multiple micrographs with over 1000 nanoparticles measured for each experiment to ensure reproducibility.

Hysteresis cycles and zero field cooling-field cooling (ZFC-FC) curves were carried out by using a superconducting quantum interference device (SQUID) 5 T magnetometer (Quantum Design MPMS XL, San Diego, CA, USA). Blocking

temperature ( $T_B$ ) was calculated as the temperature at which the maximum in magnetization occurred in ZFC curve.

### Formation of Ff35-BMNPs Nanoassemblies

The kinetics of Ff35 adsorption on the magnetic nanoparticles was studied to determine the time required for this adsorption to reach equilibrium. In these experiments, an aliquot of 5 mg of BMNPs was mixed with 1 mL of Ff35 100  $\mu$ M in HEPES buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.2) for several time intervals up to 48 h. After the incubation time, the Ff35-BMNPs nanoassemblies (here referred as Ff35-BMNPs) were collected with a magnet and washed twice with HEPES buffer. Then, the supernatants were measured by UV-Vis spectroscopy at a wavelength of 304 nm and these measurements were used to calculate the percentage of the absorbed compound. The molar absorptivity of Ff35 in HEPES buffer at 304 nm was determined as 2677.5 L mol<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0.9991$ ) from the slope of a standard calibration straight line. More than three replicas were performed per experiment. The standard deviation of the absorbance measurements was used to calculate the error in the concentration of Ff35 in the supernatant ( $[Ff35]_{sn}$ ).

The adsorption isotherm to calculate the saturation concentration of Ff35 adsorbed on the BMNPs was determined by mixing an aliquot of 5 mg of BMNPs with 1 mL of several concentrations of Ff35 (ranging from 0 up to 200  $\mu$ M) in HEPES buffer. These preparations were incubated at 25 °C under continuous stirring for 6 h (time needed to reach equilibrium, according to the kinetics experiments). Three replicas were performed per each measurement. After the incubation time, supernatants were harvested, particles were washed, and UV-Vis spectroscopy measurements of all supernatants were performed as described above. The data were fitted to the model of Langmuir-Freundlich (LF) by using Origin 8. The LF model is based on Equation (1), where ( $Q$ ) is the amount of adsorbed drug per mass unit of adsorbent, ( $C_e$ ) is the amount of nonadsorbed compound, ( $K_{LF}$ ) is the LF affinity constant, and ( $r$ ) is the cooperativity coefficient. A value of  $r < 1$  means a negative cooperativity whereas a value of  $r > 1$  means a positive cooperativity [18,21].



$$Q = \frac{Q_{max}(K_{LF}C_e)^r}{1 + (K_{LF}C_e)^r} \quad (1)$$

## Cell Culture

The human hepatoblastoma HepG2 cell line, used in this work, was acquired from the European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK). The cells were grown in Minimum Essential Medium (MEM) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) supplemented with 2 mM l-glutamine, 1% nonessential amino acids, 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin, and 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C, and subcultured at a ratio of 1:10 once a week.

## Inhibition of Choline Kinase $\alpha 1$ by Ff35

The effect of Ff35 on ChoK was assayed in purified ChoK $\alpha 1$  as previously described by Schiaffino et al. [12], by determining the rate of incorporation of <sup>14</sup>C from [methyl-<sup>14</sup>C]choline into phosphocholine, both in the absence (control) or presence of different inhibitor concentrations. Briefly, the final reaction mixture contained 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, and 20 ng of purified ChoK $\alpha 1$ . The reaction was initiated with 1 mM [methyl-<sup>14</sup>C]choline (4500 dpm nmol<sup>-1</sup>) and incubated at 37 °C for 10 min. The assay was stopped by immersing the reaction tubes in boiling water for 3 min. Aliquots of the reaction were applied to the origin of silica gel plates in the presence of phosphocholine (0.1 mg) and choline (0.1 mg) as carriers. The chromatography was developed in methanol/0.6% NaCl/28% NH<sub>4</sub>OH in water (50:50:5, v/v/v) as solvent, and phosphocholine was visualized under exposure to iodine vapour. The corresponding spot was scraped and transferred to scintillation vials for measurement of radioactivity by a Beckman 6000-TA (Madrid, Spain) liquid-scintillation counter. The 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub> value) were determined from the % activity of the enzyme at different concentrations of synthetic inhibitor by using a sigmoidal dose-response curve (the ED50plus v1.0 software).

## Cell Proliferation Assay

HepG2 cells were seeded onto 96-well plates (10000 cells/well) and grown in MEM/10% FBS for 24 h. After 24 h, the medium was removed and 100 µL of fresh medium containing Ff35 (1, 5, and 10 µM), BMNPs (300 µg mL<sup>-1</sup>), or Ff35-BMNPs

(Ff35 1  $\mu\text{M}$  and BMNPs 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were added for different times. Cell viability was assayed by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Formazan crystals were dissolved in 100  $\mu\text{L}$  of DMSO, and the absorbance was read at a wavelength of 570 nm using a microplate reader (HTX Microplate Reader BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The  $\text{GI}_{50}$  (half-maximal growth inhibitory concentration) value was determined from the % cell viability at different concentrations of synthetic inhibitor by using a sigmoidal dose-response curve (the ED50plus v1.0 software), referencing this value to an untreated cells control taken as a 100% of the viability.

### **Inhibition of Choline Uptake by Ff35 and Ff35-BMNPs**

Choline uptake was assayed as previously reported [22]. HepG2 cells were incubated for 10 min at 37 °C in a MEM/10% FBS medium containing soluble Ff35 (0.5 and 1  $\mu\text{M}$ ), BMNPs (300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), or Ff35-BMNPs (concentration of Ff35 was 0.5  $\mu\text{M}$  and BMNPs was 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  or that of Ff35 was 1  $\mu\text{M}$  and BMNPs was 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). After 10 min, 24 h, and 48 h of treatment, the cells were immediately exposed to a pulse of [methyl- $^{14}\text{C}$ ]choline (16  $\mu\text{M}$ , 31 Ci/mol, in well) for 5 min at 37 °C. The incorporation of choline was stopped by medium aspiration followed by two washes in ice-cold PBS containing 580  $\mu\text{M}$  choline. Then, the cells were solubilized in NaOH 0.1 N and an aliquot was used to determine the total amount of radiolabeled choline taken up by the cells, measured by liquid scintillation using a Beckman 6000-TA counter (Madrid, Spain).

### **Internalization of BMNPs or Ff35-BMNPs in the Cells**

HepG2 cells were grown in six-well dishes for 24 h. Then, BMNPs (300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) or Ff35-BMNPs (concentration of Ff35 was 1  $\mu\text{M}$  and BMNPs was 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) or only MEM/10% FBS medium, as a control, were added for 24 h. Cells were collected using trypsin and centrifuged at 1500 rpm for 5 min in MEM/10% FBS. Cell pellets were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.05 M cacodylate buffer for 4 h at 4 °C. The samples were washed three times with cacodylate buffer and postfixed in an aqueous solution of 1%  $\text{OsO}_4$  containing 1% potassium ferrocyanide for 1 h at 4 °C in darkness. The following washes were done (25 °C): 0.15% tannic acid in cacodylate buffer, cacodylate buffer, and  $\text{H}_2\text{O}$ . The samples were left in 2% uranyl acetate for 2 h and washed several times with  $\text{H}_2\text{O}$ . Then, dehydration in ethanol solutions rising from 50% to 100% was done at 4 °C. The samples were embedded in resin (EMbed 812/100%

ethanol (1/1)) for 60 min at room temperature, the same resin at a 2/1 ratio for 60 min, and then resin without ethanol overnight. For polymerization, the samples were incubated in pure resin for 48 h at 60 °C. Ultrafine sections (50–70 nm) were cut using a Leica Ultramicrotome R and contrasted using 1% aqueous uranyl acetate for 5 min and lead citrate in a CO<sub>2</sub>-depleted atmosphere for 4 min [23]. A Zeiss Libra Plus 120 electron microscope was used to visualize the sections.

## Hyperthermia Analysis

Magnetic hyperthermia experiments were carried out using a laboratory-built AC current generator, based on a Royer-type oscillator. The AC source was connected to a double five-turn coil built with a copper tube 4 mm in diameter. This allowed control of the temperature of the coil by flowing thermostated water. The coil was 20 mm in diameter and 45 mm long. The magnetic field frequency was  $197 \pm 3$  kHz, and its strength was  $H = 21$  kA/m ( $B = 26.4$  mT in air) at the center of the coil, where the samples were placed, measured with a NanoScience Laboratories Ltd., Probe (Newcastle, UK), with 10  $\mu$ T resolution. All samples were previously prethermostated at 37 °C. Prior to any determination, the adiabatic condition of the system was verified by subjecting a sample of Milli-Q water as control, in order to ensure that any temperature changes in the samples under study were due to the action of the magnetic field, and not a consequence of environmental temperature gradient. A preliminary experiment was performed with a suspension of bare BMNPs ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) to set the conditions (frequency and strength of the field and time of application) needed to guarantee that a temperature of 43 °C was reached. The sample temperature was determined with an optical fiber thermometer (Optocon AG, Dresden, Germany). For actual hyperthermia experiments, HepG2 cells were incubated for 24 h at 37 °C with either  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$  BMNPs or Ff35-functionalized BMNPs and exposed to the AC magnetic field for time lapses ranging between 1 and 3 h. Immediately after the hyperthermia treatment, the cells were processed for the MTT test.

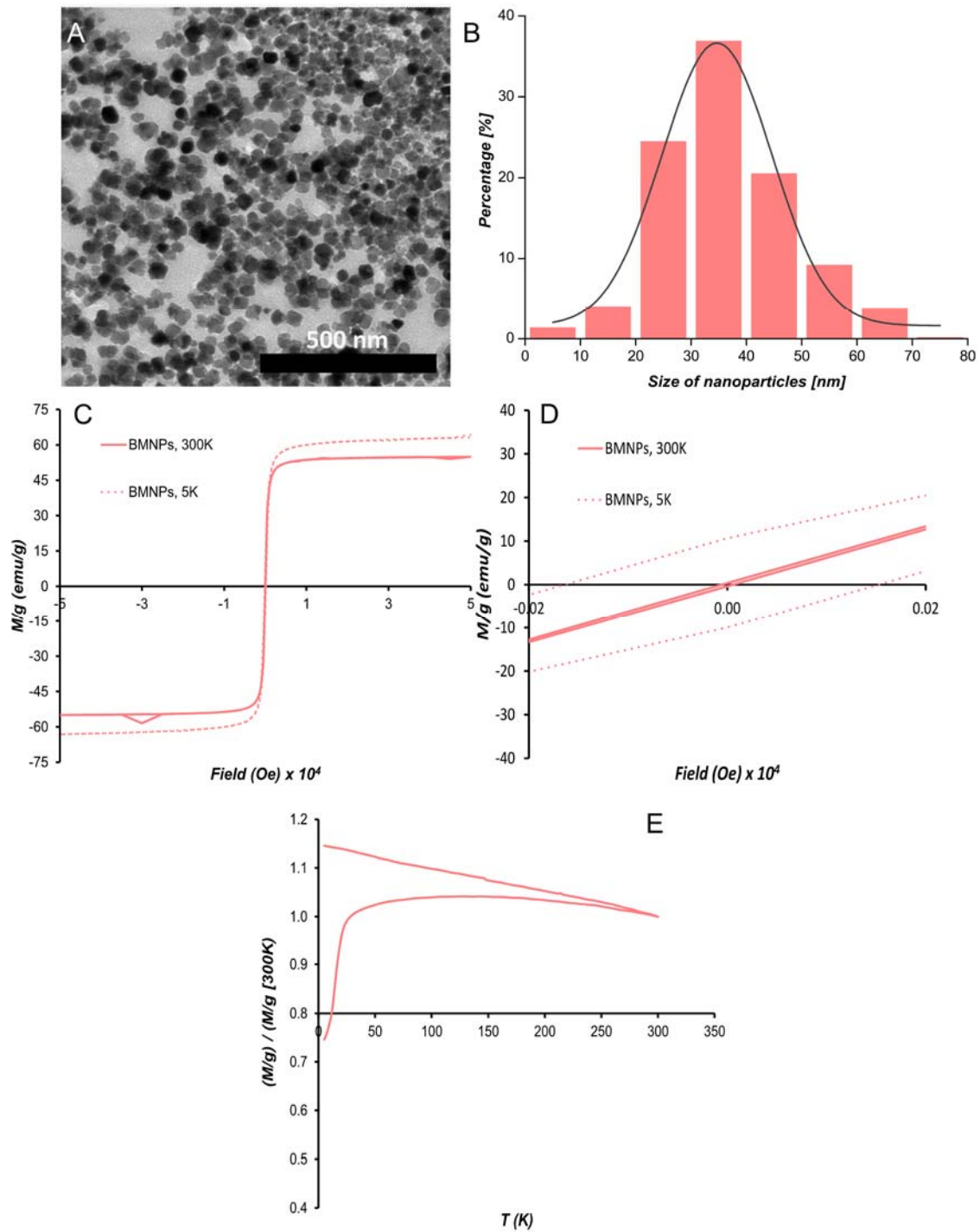
## Statistics

The results are shown as averages  $\pm$  SEM. A two-way ANOVA was done with post hoc comparisons by Scheffé's test (GraphPad Prism 5).  $p < 0.05$  is considered statistically significant.

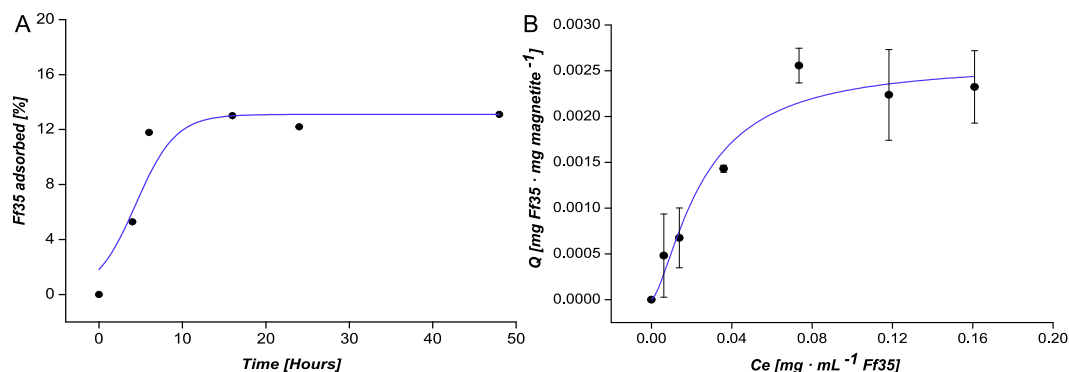
## Results and Discussion

BMNPs exhibited well-developed faces and a size ranging from 20 to 50 nm, with an average crystal size of  $35 \pm 8$  nm, according to TEM analyses (Figure 2A,B). The hysteresis loop of BMNPs showed a typical ferromagnetic behaviour at 5 K, while at 300 K, these nanoparticles showed zero coercivity, which indicates their superparamagnetic character, being that the magnetization saturation ( $M_s$ ) was at 300 K 55 emu/g (Figure 2C,D). The ZFC-FC curves at 500 Oe show a slow increase in magnetization (Figure 2E). In fact, the  $T_B$  was 150 K for BMNPs. According to Prozorov et al. [17], this higher  $T_B$  and slow magnetization increase is related to particles that expose a large magnetic moment per particle and high crystallinity.

The kinetics of Ff35 adsorption on BMNPs over time shows that the system reached equilibrium at ~6 h (Figure 3A). The amount of adsorbed drug per amount of nanoparticles ( $Q$ ) increased with the equilibrium concentration of Ff35 in the supernatant ( $C_e$ ) at a higher rate at the lowest  $C_e$  values. Such a rate decreased as  $C_e$  increased (Figure 3B). The adsorption isotherm adjusts to the Langmuir-Freundlich (LF) models ( $R^2 = 0.93402$ ), showing a drug loading capacity ( $Q_{max}$ ) of  $0.0026 \pm 0.0003$  mg Ff35 mg magnetite<sup>-1</sup>. This model introduces the effects of energetic heterogeneity of the surface and the cooperativity between Ff35 molecules, meaning that once an Ff35 molecule is coupled to BMNPs, it lowers the energy required for the coupling of the next ones. The values of the LF affinity constant ( $K_{LF}$ ) and cooperativity coefficient ( $r$ ) parameters, calculated by means of this model were of  $40 \pm 10$  mg of Ff35 per mg of magnetite and  $1.5 \pm 0.6$ , respectively.



**Figure 2.** Biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs) characterization. (A) TEM image of BMNPs and (B) crystal size distribution. (C) Hysteresis cycle of BMNPs at 300 K and 5 K. (D) Detail of the hysteresis cycle in the absence of external magnetic field at 300 K and 5 K. (E) Zero field cooling-field cooling (ZFC-FC) curves of BMNPs.



**Figure 3.** Adsorption kinetics (A) and adsorption isotherm (B) of Ff35 on BMNPs. The line represents the nonlinear weighted least-squares (NWLS) fitting of the experimental data according to LF model. In the case of adsorption kinetics, the vertical error bars are smaller than the symbol.

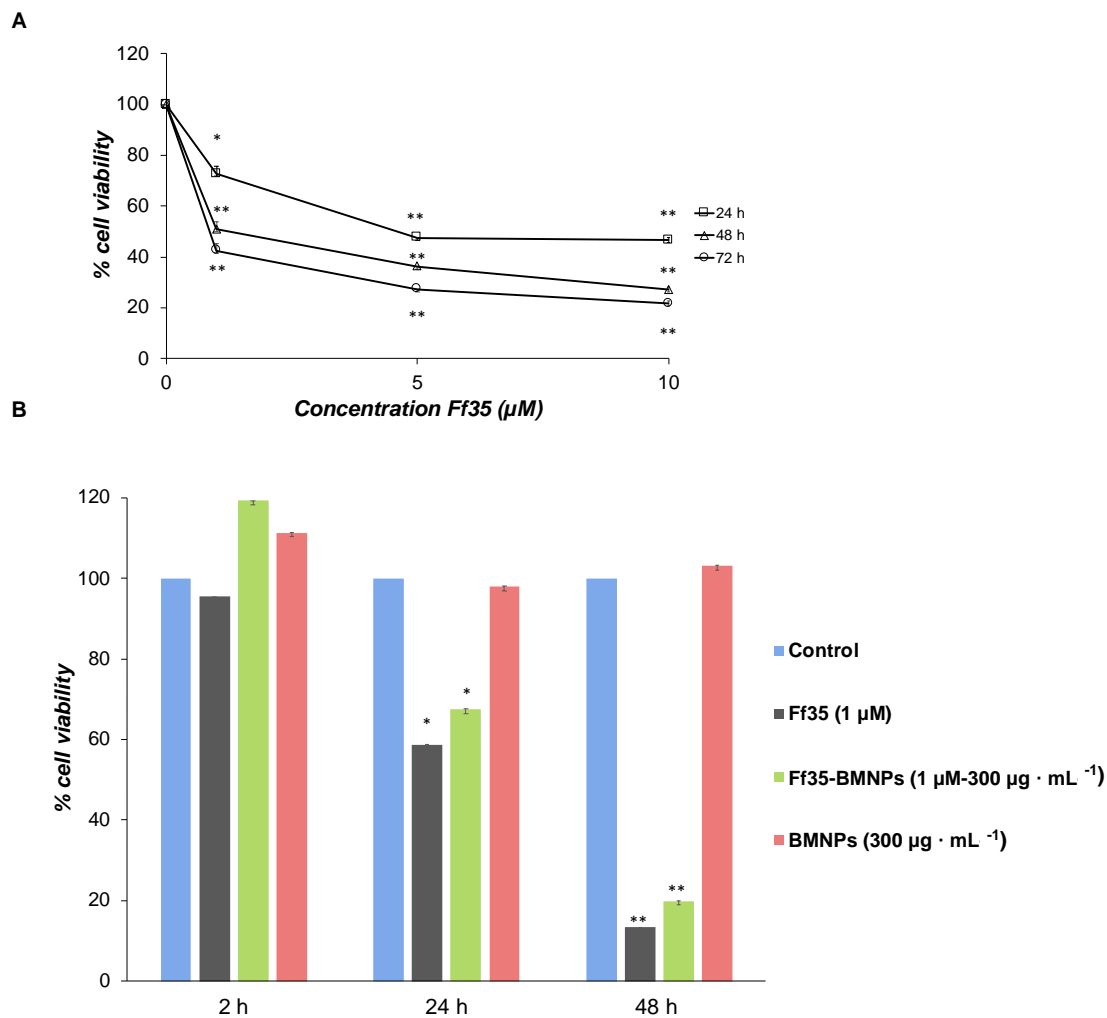
Our results show that BMNPs are able to carry 0.0026 mg of Ff35 per mg of magnetite ( $Q_{max}$ ). Due to the fact that this is the first study on Ff35 adsorption on magnetite nanoparticles (or on any other nanoparticles), comparisons of the  $Q_{max}$  of the present study are done in reference to other studies involving either the BMNPs used here or other nanocarriers. The  $Q_{max}$  value obtained in the present manuscript was lower than those values obtained for the coupling of other drugs like doxorubicin (DOXO) to BMNPs. For example, the adsorption of DOXO on the same BMNPs was  $0.69 \pm 0.03$  mg DOXO/mg BMNPs [18] or  $0.41 \pm 0.03$  mg DOXO/mg apatite for DOXO adsorption on citrate-coated apatite [24]. Even though  $Q_{max}$  for Ff35 is about two orders of magnitude lower than that for other compounds, this amount that is coupled to the BMNPs is enough to have a cytotoxic effect as it will be shown below.

The BMNPs' loading capacity could be explained, on the one hand, by the electrostatic interaction occurring at pH 7.2 (pH value at which the coupling occurs) between Ff35, which exposes two basic groups, positively charged and the negatively charged magnetite surface (isoelectric point ( $iep$ ) = 4.4) [18], which allows Ff35 to be bound to the BMNPs, as previously demonstrated for other nanoassemblies involving BMNPs and positively charged molecules [18]. However, when the environmental pH decreases approaching the  $iep$  of the BMNPs (as it naturally does in a tumor environment, for instance, in the endosome-lysosome compartment [25]), the electrostatic interactions between Ff35 and BMNPs weaken, prompting Ff35 release. This characteristic presents a relevant point for the potential clinical application of Ff35-BMNPs nanoassemblies,

since no Ff35 release is expected in the bloodstream until the nanoparticles reach the target tumoral (acidic) environment. On the other hand, the results show that not only electrostatic interactions between the drug and the BMNPs would be responsible for the Ff35-BMNPs nanoassemblies formation, since the  $r$  coefficient obtained in LF model ( $r > 1$ ) demonstrates a strong positive cooperativity between the molecules of Ff35 during the adsorption process. This type of interaction has been previously described in DOXO adsorption on citrate-coated apatite nanocrystals [24] and on BMNPs [18].

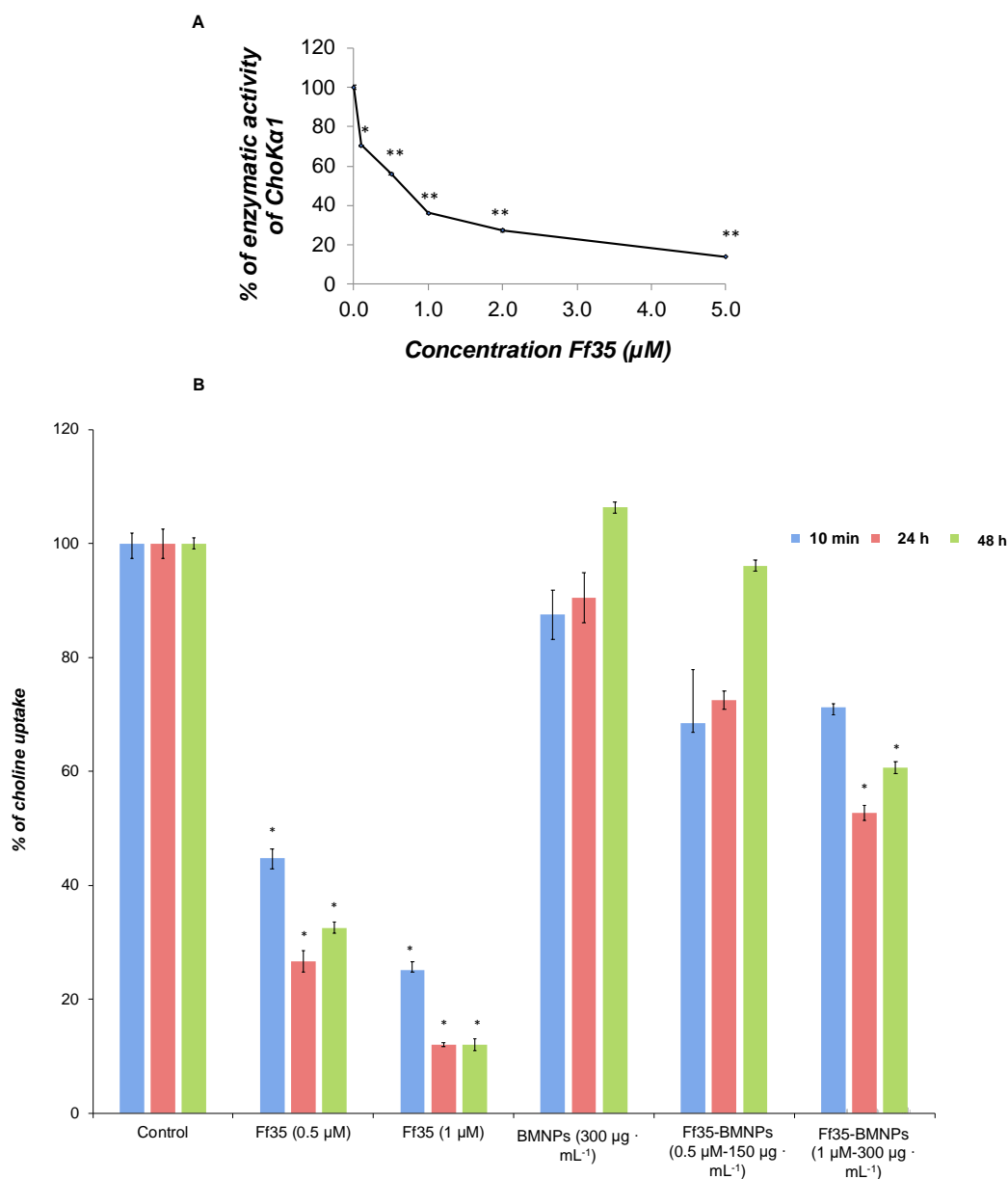
Soluble Ff35 show a negative effect on HepG2 cell growth in a time and concentration-dependent manner (Figure 4A). The  $IC_{50}$  values derived from the growth inhibition curves were of  $6.23 \pm 0.39$ ,  $1.37 \pm 0.004$ , and  $0.45 \pm 0.10$   $\mu\text{M}$  for 24, 48, and 72 h, respectively. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in the culture medium was not detected after any of the treatments up to 10  $\mu\text{M}$  of Ff35 (data not shown), so the decrease in cell proliferation observed after the treatment with soluble Ff35 could not be attributed to any acute cytotoxicity produced by plasma-membrane leakage. Ff35-BMNPs also significantly decreased cell growth after 24 or 48 h of treatment. HepG2 cell proliferation was not affected by the presence of BMNPs, which demonstrates the cytocompatibility of the BMNPs.

Soluble Ff35 inhibits the activity of ChoK $\alpha$ 1 (Figure 5A), with an  $IC_{50}$  value of  $0.46 \pm 0.079$   $\mu\text{M}$ . In addition, choline uptake was also inhibited in the presence of soluble Ff35 in 55% and 75% at 0.5  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$ , respectively, after only 10 min of exposure. The effect was even more noticeable after 24 or 48 h of treatment, reaching inhibition levels of up to 68% and 88% at Ff35 0.5  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$ , respectively, after 48 h of treatment (Figure 5B). These results clearly indicate that soluble Ff35 inhibits strongly both choline activity and absorption, and that the action of this compound in both processes is associated with a decrease in cell proliferation.



**Figure 4.** Effects of Ff35, BMNPs, and Ff35-BMNPs on HepG2 cell proliferation. HepG2 cells growing in the log phase were incubated with Minimum Essential Medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (MEM/10% FBS) in the presence or absence of Ff35 up to 10  $\mu\text{M}$  (A) or Ff35 1  $\mu\text{M}$ , BMNPs 300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  or Ff35-BMNPs (concentration of Ff35 was 1  $\mu\text{M}$  and that of BMNPs was 300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) (B). Cell viability was determined by MTT assay and normalized to that of the respective control cells. These experiments were performed twice in triplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared to their respective controls.





**Figure 5.** (A) Effects of Ff35 on ChoKα1 activity assayed in purified ChoKα1 exposed to different Ff35 concentrations. The results are expressed as percentage of enzymatic inhibition. (B) Choline uptake assay in HepG2 cells. Choline uptake was determined in cells treated for 10 min, 24 h, and 48 h soluble Ff35 or Ff35-BMNPs. Results are normalized to their respective control. These experiments were performed three times in triplicates. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared to their respective controls.

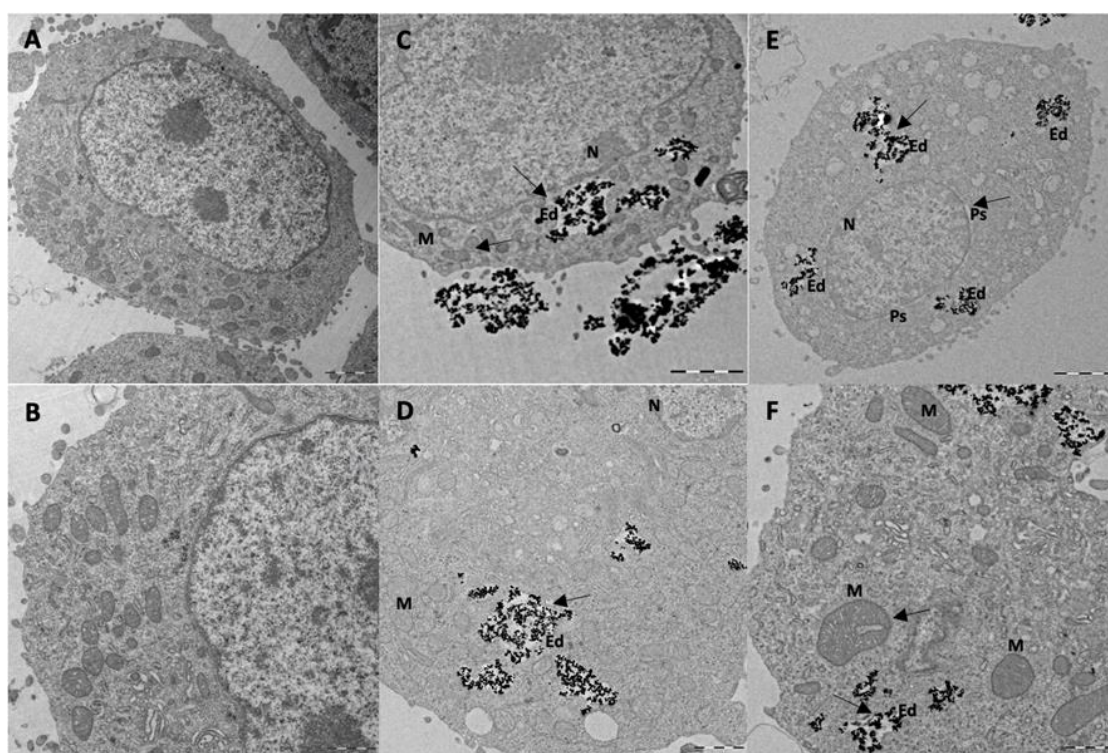
Interestingly, the treatment with Ff35-BMNPs for 10 min did not produce significant changes in the incorporation of choline into the cells compared with cells treated with BMNPs (Figure 5B) or in control cells (Figure 5B). After 24–48 h of treatment, only a significant inhibition of choline uptake was observed at a concentration

of Ff35 1  $\mu\text{M}$  and BMNPs 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nevertheless, this inhibition was much lower than that observed with soluble Ff35 at the same concentration. The results indicate that the functionalization of BMNPs with Ff35 strongly reduces the inhibitory effect of Ff35 on choline uptake. To avoid completely the action of Ff35 on choline uptake, it would be necessary to control the concentration of Ff35 as well as the time of treatment. It is likely that after a long treatment there may be some release of the compound from the BMNPs that were not endocytosed. This released Ff35 may be responsible for the slight inhibition observed during treatment with Ff35-BMNPs (Ff35-BMNPs 1  $\mu\text{M}$  and BMNPs 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). However, the amount of compound released from Ff35-BMNPs (Ff35-BMNPs 0.5  $\mu\text{M}$  and BMNPs 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was not sufficient to inhibit choline uptake.

However, despite the fact that Ff35-BMNPs had little effect on the uptake of choline, it produced a marked decrease in cell proliferation, as mentioned above, similar to that observed in cells treated with soluble Ff35 at the same concentration (Figure 4B). This is very important because, by coupling Ff35 to the BMNPs, the antiproliferative effect of the compound is maintained as if Ff35 was soluble, whereas any secondary effects associated to the inhibition of choline uptake induced by soluble Ff35 are avoided or reduced. This new property improves the potential clinical use of Ff35 that would be otherwise impeded.

TEM was used to visualize the internalization of BMNPs or Ff35-BMNPs (concentration of Ff35 was 1  $\mu\text{M}$  and BMNPs was 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), and to determine the possible morphological changes caused by Ff35-BMNPs exposure. Ultrastructural analysis by TEM showed that BMNPs were internalized in the cells by endocytosis (Figure 6). Control cells (Figure 6A,B) showed mitochondria having a dense matrix as well as many cisternae of rough endoplasmic reticulum (ER) well structured, indicating absence of cell damage. No ultrastructural cell damage was observed following BMNPs internalization until 24 h incubation (Figure 6C,D), confirming the cell biocompatibility of these nanoparticles at a concentration of 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Both the BMNPs (Figure 6C,D) and Ff35-BMNPs (Figure 6E,F) were internalized via endocytosis and sorted into endosomes. As it can be seen, cells treated with Ff35-BMNPs showed ultrastructural alteration, such as a notable dilatation of perinuclear space increasing separation of two nuclear membranes, loss of mitochondrial density, and an abnormal shape. In general, the cells exposed to the BMNPs showed a similar appearance to control cells, with not significant structural alterations. These experiments confirm the cell damage following

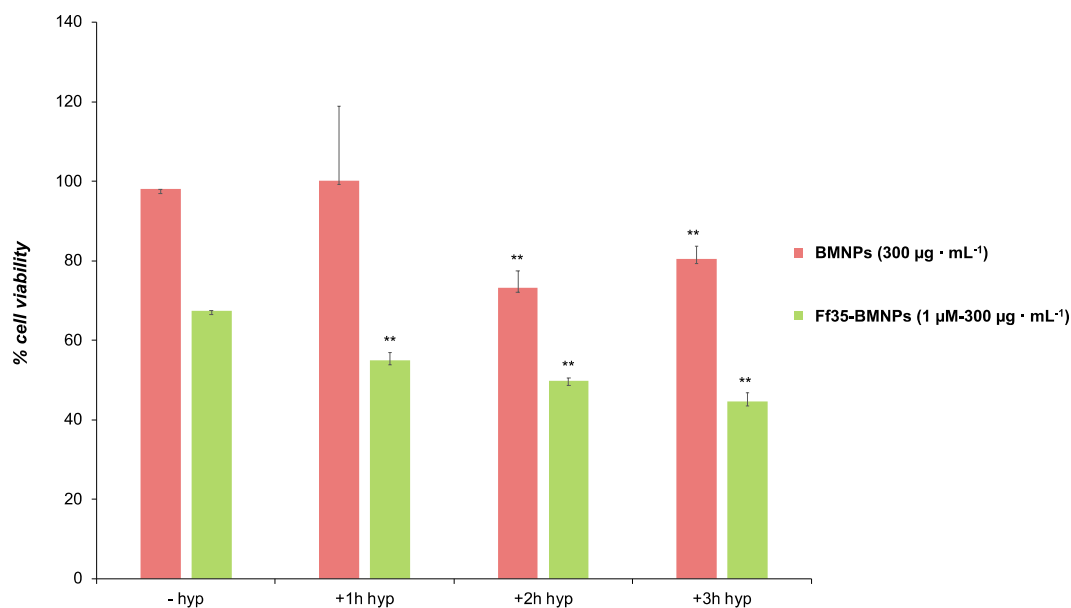
upon Ff35-BMNPs observed above, and explain why, while soluble Ff35 inhibits choline uptake, Ff35-BMNPs do not. While soluble Ff35 requires choline transporter to enter the cell, Ff35-BMNPs enter the cells by endocytosis, and thus, *via* a method that does not depend on choline transporters. Again, these results open the possibility for a clinical use of ChoK $\alpha$ 1 inhibitors by making their uptake by the cells independent of choline transporters. Moreover, the experiments of the present study provide a protocol that allows us to disentangle whether the cytotoxic activity of a ChoK $\alpha$ 1 inhibitor such as Ff35 is due to the selective inhibition of the enzyme, or on the contrary, due to the nonselective inhibition of the choline uptake by the cell as an undesirable secondary effect. This protocol could be standardized and extended to other molecules.



**Figure 6.** Internalization of BMNPs and Ff35-BMNPs. Ultrastructural alterations produced by Ff35-BMNPs. (A,B): Control HepG2 cells. (C,D): HepG2 cell exposed to BMNPs has ultrastructure similar to control cells. (E,F): Treatment with Ff35-BMNPs (concentration of BMNPs was  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$  and Ff35 was  $1 \mu\text{M}$ ). Perinuclear space (Ps) is visible. The two nuclear membranes were separated showing a dilatation of the Ps. It is notably mitochondrial (M) rarefaction, disorganization, and dilatation. Both BMNPs and Ff35-BMNPs were internalized by HepG2 cells via endocytosis and compartmentalized in endosomes (Ed). Scale bar corresponds to  $2 \mu\text{m}$  (A,C,E) and  $1 \mu\text{m}$  (B,D,F).

We consider now the effect of hyperthermia and the combination hyperthermia-Ff35 on cell proliferation. In all cases, the HepG2 cells were subjected to the magnetic field for periods of 1, 2, and 3 h. We assume that, according to generally accepted results, tumor cells are more sensitive than healthy ones to a temperature increase [26], and, although 43 °C is widely accepted as a common threshold for apoptosis of various cancer cells, many reports indicate that different thermal sensitivities exist among different cell lines [27]. Hence, preliminary experiments aimed at setting the optimal conditions of hyperthermia in HepG2 with the used BMNPs either bare or functionalized with Ff35. Figure 7 shows the effect of hyperthermia on the viability the cells, in comparison with cells not subjected to the magnetic field. Hyperthermia reinforced cytotoxicity on both cells treated with BMNPs and, much more so, on cells treated with Ff35-BMNPs. As it can be observed, after 2 h (and also 3 h) of hyperthermia regime there was a significant decrease in viability (73% after 2 h and 79% after 3 h) of cells maintained in the presence of BMNPs and AC field, revealing the cytotoxic effect of hyperthermia. However, there were not significant differences between these two different times. On other hand, significant differences in viability were found when the cells were treated with Ff35-BMNPs, with and without field. It is shown in Figure 7 that the viability of cells treated with Ff35-BMNPs without hyperthermia reached 67%, these values being lower in those cells treated with Ff35-BMNPs with hyperthermia (54.8% for 1 h, 49.7% for 2 h, and 44.5% for 3 h). Since BMNPs are cytocompatible, these results show that the temperature rise induced by them upon application of an alternating magnetic field was responsible for the reduction in cell viability. However, such reduction was more evident and faster upon the combination of drug release and hyperthermia. It is proposed that hyperthermia may not only increase the local temperature, but also trigger the release of Ff35 from the BMNPs in the cells, as already demonstrated to occur for other compounds [28].

Therefore, these results open the door, not only to the potential use of ChoK $\alpha$ 1 inhibitors without the secondary effect linked to the inhibition of choline uptake, but also, to the application of a dual therapy based on targeted drug release and hyperthermia to potentiate the cytotoxic activity of these compounds on tumor cells.



**Figure 7.** Effects of Ff35-BMNPs and magnetic hyperthermia on cell proliferation in HepG2 cells. HepG2 cells growing in log-phase were incubated with MEM/10% FBS in the absence or presence Ff35-BMNPs (concentration of Ff35 was 1  $\mu\text{M}$  and BMNPs was 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 24 h, and exposed to an alternative magnetic field for 1, 2, or 3 h. Cell number was determined by the MTT assay and expressed as percentage of control cells. Percentage of viability is normalized to that for the control cells. Results represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments conducted in triplicate. \*\*  $p < 0.01$ , when compared with their respective control values.

## Conclusions

In summary, this study shows that the coupling of the ChoK $\alpha$ 1 inhibitor Ff35 to BMNPs offers great advantages. On one hand, since the nanocarrier is a magnetic nanoparticle, it opens the possibility of a magnetic guidance to the target site through the application of a continuous magnetic field. Also, it offers the possibility of also using the nanocarrier as a hyperthermia agent, thus combining the cytotoxic effect of the molecule with the cytotoxic effect induced by hyperthermia and the triggering of drug release from the BMNPs that hyperthermia induces. Finally, and no less important, it offers the potential of Ff35 entering the cell independently of the choline transporters. This is crucial, as the coupling of Ff35-BMNPs allows the compound to exert a cytotoxic activity comparable to that of the soluble compound while avoiding the secondary effect linked

to the inhibition of choline uptake. In addition, it provides a protocol that could be extensible to other molecules to disentangle the cytotoxic effect of the drug in terms on enzyme inhibition and/or inhibition of choline uptake. Therefore, the novel design of the nanoassemblies of Ff35-BMNPs showed in this study and the demonstration of the activity of such a compound without interfering in the choline uptake are crucial results, as they would allow the potential use of these ChoK $\alpha$ 1 inhibitors as antitumoral drugs that would otherwise be compromised.

## Acknowledgments

This research was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2013-46612 and CGL2016-76723 projects), Ramón y Cajal programme (RYC-2014-16901) and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Also, this research was aided by the Andalusian regional government (CTS-236). Ylenia Jabalera wants to acknowledge a FPU2016 grant (ref. FPU16\_04580) from the Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte y Competitividad (Spain) and Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 of the University of Granada. Alberto Sola-Leyva holds a Formación de Doctores 2018 grant (ref. PRE2018-085440) from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Spain). Inmaculada Pérez-Prieto holds the fellowship called “Becas de Iniciación a la Investigación” from the Plan Propio de Investigación de la Universidad de Granada. Finally, thanks go to the CIC personnel of the University of Granada for technical assistance in the TEM.

## References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 7–30.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
3. Huang, C.; Freter, C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 924–949.
4. Galbraith, L.; Leung, H.Y.; Ahmad, I. Lipid pathway deregulation in advanced prostate cancer. *Pharmacol. Res.* **2018**, *131*, 177–184.
5. Glunde, K.; Bhujwala, Z.M.; Ronen, S.M. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 835–848.

6. Cao, M.D.; Cheng, M.; Rizwan, A.; Jiang, L.; Krishnamachary, B.; Bhujwalla, Z.M.; Bathen, T.F.; Glunde, K. Targeting choline phospholipid metabolism: GDPD5 and GDPD6 silencing decrease breast cancer cell proliferation, migration, and invasion. *NMR Biomed.* **2016**, *29*, 1098–1107.
7. Iorio, E.; Caramujo, M.J.; Cecchetti, S.; Spadaro, F.; Carpinelli, G.; Canese, R.; Podo, F. Key Players in Choline Metabolic Reprograming in Triple-Negative Breast Cancer. *Front. Oncol.* **2016**, *6*, 205.
8. Van der Veen, J.N.; Kennelly, J.P.; Wan, S.; Vance, J.E.; Vance, D.E.; Jacobs, R.L. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2017**, *1859*, 1558–1572.
9. Yalcin, A.; Clem, B.; Makoni, S.; Clem, A.; Nelson, K.; Thornburg, J.; Siow, D.; Lane, A.N.; Brock, S.E.; Goswami, U.; et al. Selective inhibition of choline kinase simultaneously attenuates MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene* **2010**, *29*, 139–149.
10. Mori, N.; Glunde, K.; Takagi, T.; Raman, V.; Bhujwalla, Z.M. Choline Kinase Down-regulation Increases the Effect of 5-Fluorouracil in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 11284–11290.
11. Chen, Z.; Krishnamachary, B.; Bhujwalla, Z. Degradable Dextran Nanopolymer as a Carrier for Choline Kinase (ChoK) siRNA Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 34.
12. Schiaffino-Ortega, S.; Baglioni, E.; Mariotto, E.; Bortolozzi, R.; Serrán-Aguilera, L.; Ríos-Marco, P.; Carrasco-Jimenez, M.P.; Gallo, M.A.; Hurtado-Guerrero, R.; Marco, C.; et al. Design, synthesis, crystallization and biological evaluation of new symmetrical biscationic compounds as selective inhibitors of human Choline Kinase  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ). *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23793.
13. Arlauckas, S.P.; Popov, A.V.; Delikatny, E.J. Choline kinase alpha—Putting the ChoK-hold on tumor metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2016**, *63*, 28–40.
14. Lacal, J.C. Choline kinase as a precision medicine target for therapy in cancer, autoimmune diseases and malaria. *Precis. Med.* **2015**, *2*, 980.
15. Bioisoterism, N.V. Review-An Biological Modification. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2017**, *6*, 1918–1949.
16. Sola-Leyva, A.; Lopez-Cara, L.C.; Ríos-Marco, P.; Ríos, A.; Marco, C.; Carrasco-Jiménez, M.P. Choline kinase inhibitors EB-3D and EB-3P interferes with lipid homeostasis in HepG2 cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5109.
17. Prozorov, T.; Bazylnski, D.A.; Mallapragada, S.K.; Prozorov, R. Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: Topical review. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2013**, *74*, 133–172.
18. García Rubia, G.; Peigneux, A.; Jabalera, Y.; Puerma, J.; Oltolina, F.; Elert, K.; Colangelo, D.; Gómez Morales, J.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C. pH-Dependent

- Adsorption Release of Doxorubicin on MamC-Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Langmuir* **2018**, *34*, 13713–13724.
19. Valverde-Tercedor, C.; Montalbán-López, M.; Perez-Gonzalez, T.; Sanchez-Quesada, M.S.; Prozorov, T.; Pineda-Molina, E.; Fernandez-Vivas, M.A.; Rodriguez-Navarro, A.B.; Trubitsyn, D.; Bazylinski, D.A.; et al. Size control of In Vitro synthesized magnetite crystals by the MamC protein of *Magnetococcus marinus* strain MC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5109–5121.
  20. Perez-Gonzalez, T.; Rodriguez-Navarro, A.; Jimenez-Lopez, C. Inorganic Magnetite Precipitation at 25 °C: A Low-Cost Inorganic Coprecipitation Method. *J. Supercond. Nov. Magn.* **2010**, *24*, 549–557.
  21. Turiel, E.; Perez-Conde, C.; Martin-Esteban, A. Assessment of the cross-reactivity and binding sites characterisation of a propazine-imprinted polymer using the Langmuir-Freundlich isotherm. *Analyst* **2003**, *128*, 137–141.
  22. Jiménez-López, J.M.; Carrasco, M.P.; Segovia, J.L.; Marco, C. Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4649–4655.
  23. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **1963**, *17*, 208–212.
  24. Iafisco, M.; Drouet, C.; Adamiano, A.; Pascaud, P.; Montesi, M.; Panseri, S.; Sarda, S.; Tampieri, A. Superparamagnetic iron-doped nanocrystalline apatite as a delivery system for doxorubicin. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 57–70.
  25. Geisow, M.J.; Evans, W.H. pH in the endosome. Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis. *Exp. Cell Res.* **1984**, *150*, 36–46.
  26. Chicheł, A.; Skowronek, J.; Kubaszewska, M.; Kanikowski, M. Hyperthermia–description of a method and a review of clinical applications. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **2007**, *12*, 267–275.
  27. Lim, C.-U.; Zhang, Y.; Fox, M.H. Cell cycle dependent apoptosis and cell cycle blocks induced by hyperthermia in HL-60 cells. *Int. J. Hyperth.* **2006**, *22*, 77–91.
  28. Iglesias, G.R.; Reyes-Ortega, F.; Fernandez, B.L.C.; Delgado, Á.V. Hyperthermia-triggered gemcitabine release from polymer-coated magnetite nanoparticles. *Polymers* **2018**, *10*, 269.



*Este artículo se ha enviado a la revista indexada en JCR:  
International Journal of Biological Macromolecules*

## **Antibacterial directed chemotherapy using AS-48 peptide immobilized on biomimetic magnetic nanoparticles combined with magnetic hyperthermia**

Ylenia Jabalera<sup>#,1</sup>, Manuel Montalban-lopez<sup>#,1</sup>, Juan José Vinuesa-Rodriguez<sup>1</sup>, Guillermo R. Iglesias<sup>2</sup>, Mercedes Maqueda<sup>\*,1</sup> and Concepcion Jimenez-Lopez<sup>\*,1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Department of Applied Physics, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

\*Corresponding authors

#These authors contributed equally to this work.

### **Abstract**

The design of new strategies to increase the effectiveness of the antibacterial treatments is a main goal in public health. So, the aim of the study was to achieve a local antibacterial directed therapy as novel alternative allowing both, the delivery of the drug at the target, while minimizing undesirable side effects, thus anticipating an enhanced effectiveness. Hence, we have developed an innovative nanoformulation composed by biomimetic magnetic nanoparticles functionalized with the antimicrobial peptide AS-48 and its potential against Gram-positive and Gram-negative bacteria, either by itself or combined with magnetic hyperthermia has been investigated. Besides, the physical properties, binding efficiency, stability and mechanism of action of this nanoassembly are analyzed. Remarkably, the nanoassembly has a strong bactericidal effect on Gram-positive bacteria, but surprisingly also on *Escherichia coli* and, finally, when combined with magnetic hyperthermia, on *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The results obtained represent a breakthrough since it allows a local treatment of infections, reducing

and concentrating the dose of antimicrobial compounds, avoiding secondary effects, including the resistance generation and particularly because the combination with magnetic hyperthermia helps sensitizing resistant bacteria to the bactericidal effect of AS-48. Thus, this new formulation should be considered a promising tool in the antibacterial fight.

## Introduction

Antimicrobial therapy is often a research topic of great interest, prompted by the increasing generation of antibiotic resistances that are not paired with the discovery of new therapeutic strategies. In fact, many authors warn about the critical situation and the urgent need for new treatments to avoid a return to a pre-antibiotic situation[1]. Among the main strategies advised, combined and directed therapies receive special attention, as many bacterial infections are localized at a site in the body and, from that location, they can further disseminate. Using adequate nanocarriers, directed chemotherapy can be further combined with another local therapy (*e.g.* magnetic hyperthermia)[2]. Magnetic nanoparticles are a prominent group of nanocarriers, since they are biocompatible and their nanoscale size makes them display a large surface area that allows the carrying of relatively large amounts of the relevant molecule. In addition, they can be externally directed to the target site applying a magnetic field and they have shown to be hyperthermia agents[2–4]. Commercialized magnetic nanoparticles present two main drawbacks that difficult their use, one linked to their relatively small size (around 10-20 nm), which results in a small magnetic moment per particle, and the other related to their surface charge, that is fairly low (or neutral) at physiological pH[4–7]. Therefore, using superparamagnetic magnetic nanocarriers with larger sizes (20-120 nm) would represent a great advantage for most applications[7,8]. In the context of surface properties, inorganic magnetic nanoparticles usually have an isoelectric point (*iep*) close to 7, so they need to be coated with different polymers to allow functionalization[4] which shelters the already non-optimal magnetic properties, then jeopardizing their use even further[7]. These issues are overcome by recently developed biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs), mediated by MamC, a *Magnetococcus marinus* MC-1 magnetosome-associated protein. MamC confers surface functional groups to the nanoparticle that allow functionalization without the need of a further coating[6]. Moreover, the control that MamC exerts over the nucleation and growth of the crystals results in the formation of

magnetite crystals of about 40 nm in size. This size increase with respect to the synthetic ones is enough to rise the magnetic moment per particle while maintaining their superparamagnetism, meaning that they behave as non-magnetic in the absence of an external magnetic field, but respond with a maximized magnetic susceptibility once an external magnetic field is applied[9]. In addition, BMNPs are able to raise the temperature by applying an alternating magnetic field (AMF), which can both locally increase the temperature to the so-called therapeutic hyperthermia (41-46 °C) and can further trigger the drug release[10–12]. All these abilities of BMNPs and of many other magnetic nanoparticles have proven effective in antitumor therapies but, up to date, no attempt has been done to use them to mediate a directed antibacterial therapy.

In this context, not only the nanocarrier choice is critical, but so it is the antibacterial molecule that avoids the generation of resistances. The focus of the research in this context points to the development of second line drugs, such as antimicrobial peptides as the bacteriocin AS-48. This is a cationic 70 residues long head-to-tail cyclized peptide produced by *Enterococcus faecalis*, with a potent bactericidal effect on Gram-positive bacteria and also against diverse human pathogens[13–16]. Due to N- and C-termini linkage, AS-48 is resistant to proteases and stable in a broad range of conditions (pH, temperature and salt concentrations)[17]. AS-48 in solution arranges in two different dimeric forms as a function of the physicochemical environment: dimeric form I (DF-I), in which the molecules are linked by hydrophobic interactions (hydrosoluble form), and dimeric form II (DF-II), in which the molecules are linked by hydrophilic interactions (hydrophobic form)[18,19]. The bactericidal effect is achieved by the electrostatically-driven advance and the accumulation of the DF-I on the negatively charged membrane, followed by the dissociation to DF-II and insertion into the lipid bilayer, which results in the creation of pores. This mechanism of action is independent of any receptor[16], thereby reducing the development of stable and transmissible resistance. Moreover, in preclinical studies, AS-48 had not shown any remarkable toxicity *in vivo* or *in vitro*, indicating its safety to prevent and treat infections, even with multidrug resistant microorganisms[20]. Conversely, Gram-negative bacteria show a naturally increased resistance to AS-48 due to the presence of the outer membrane, requiring a sublethal damage on this membrane to become sensitive to AS-48[17,21].

In this work, a novel nanoformulation formed by BMNPs functionalized with AS-48 that alone and combined with magnetic hyperthermia have been designed and their

potential against bacterial infections have been tested. This represents a multilevel approach consisting of a directed antibacterial chemotherapy based in the AS-48-BMNP nanoassemblies combined with magnetic hyperthermia that exert a potent and fast antibacterial effect, both on Gram-positive but, remarkably, on the more resistant Gram-negative bacteria.

## Experimental Section

### Bacterial Strains and Culture Conditions

The Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Klebsiella pneumoniae* LMG20218 and *Escherichia coli* LMG15862, and the Gram-positive *Enterococcus faecalis* S-47[21], *E. faecium* LMG 16003 and *Staphylococcus aureus* CECT 239 were grown at 37 °C on trypticase soy broth (TSB, VWR, Spain) or trypticase soy agar (2% agar, TSA). Furthermore, *E. faecium* and *E. coli* are resistant to vancomycin and  $\beta$ -lactams, respectively.

### AS-48 Purification

AS-48 was purified to homogeneity by successive cationic and reversed phase chromatography from supernatants of the producer strain *E. faecalis* UGRA10 as described previously[22,23]. The protein concentration of the purified AS-48 samples was determined by UV absorption at 280 nm.

### BMNPs Synthesis

MamC expression and purification was performed as previously described[24]. BMNP synthesis was achieved at 25 °C in oxygen free iron solutions as described elsewhere[24,25]. The resulting BMNPs were washed three times with deoxygenated Milli-Q water, suspended in HEPES buffered saline solution (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl) and sterilized.

### BMNPs Characterization

Transmission electron microscopy (TEM) analyses were performed with a STEM (Philips Model CM20) microscope on ultrathin sections (50–70 nm) of embedded BMNPs. ImageJ 1.47 software was used to measure particle sizes on multiple micrographs with over 1000 nanoparticles measured for each experiment. Basic mineral

characterization can be found elsewhere[6,24]. These BMNPs are superparamagnetic magnetic nanoparticles at 300 K, composed of ~95 wt% magnetite and ~5 wt% MamC, with a specific surface area of 90 m<sup>2</sup>/g.

### AS-48-BMNPs nanoassemblies

The kinetics of AS-48 adsorption on the BMNPs was studied to determine the time required to reach equilibrium. 5 mg BMNPs were mixed with 1 mL 100 μM AS-48 in HEPES buffered saline solution and incubated up to 48 h. After the incubation time, the BMNPs to which AS-48 was immobilized (here referred as AS-48-BMNPs nanoassemblies) were collected with a magnet and pellets were carefully washed twice with 1 mL HEPES buffer. The supernatants were measured by UV-Vis spectroscopy at 280 nm to determine the non-adsorbed AS-48, which would provide an indirect determination of the AS-48 in equilibrium ( $C_e$ ) and the amount of adsorbed AS-48 per mass unit of adsorbent ( $Q$ ). More than three replicas were performed per experiment. The standard deviation of the absorbance measurements was used to calculate the error in the concentration of AS-48 in the supernatant ( $[AS-48]_{sn}$ ). The kinetics data were fitted to the Lagergren's equation as detailed in Supplementary Information[26,27]. Experiments to determine the adsorption isotherm were performed by fixing the reaction time to 24 h to ensure the equilibrium of the system. Five milligrams of nanoparticles were mixed with 1 mL of AS-48 at different concentrations (ranging from 10 to 200 μM) and incubated at 25 °C under continuous stirring. Three replicas per each experiment were performed. Supernatants were harvested, particles were washed, and UV-Vis spectroscopy measurements of all supernatants were performed as described above. The data were fitted to the Langmuir–Freundlich (LF) model, as detailed in Supplementary Information[6,27–29]

The stability of the nanoassembly at physiological pH (pH 7.4) was also evaluated. 5 mg AS-48-BMNPs were washed twice with ultrapure water and resuspended in HEPES buffer. Suspensions were incubated at 37 °C under continuous stirring for different time intervals up to 96 h. Samples were concentrated with a magnet and supernatants were analyzed by UV–Vis spectroscopy. The release efficiency ( $D_R$ ) was defined by Equation (1), as the ratio between the amount of released molecules at a given time  $t$  ( $Q_{(t)}$ ) and the  $Q_{max}$ [6,27]:

$$D_R = \frac{Q(t)}{Q_{max}} \times 100 \quad (1)$$

Electrophoretic mobility measurements were carried out in a Zetameter Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25 °C as detailed in previous studies. Hysteresis cycles were carried out at 300 K and 5 K by using a superconducting quantum interference device (SQUID) 5 T magnetometer (Quantum Design MPMS XL, San Diego, CA, USA). A thermal imaging camera FLIR 60, with 320 x 240 pixels IR resolution and thermal sensitivity <0.045 °C (FLIR Systems, Inc. Wilsonville, Oregon, USA), was used to measure the temperature reached during *in vitro* magnetic hyperthermia experiments using a magnetic field strength of 22 kA m<sup>-1</sup> and frequency of 140 kHz. The AMF was obtained by passing an alternating current through a water-cooled copper coil into the center of which the corresponding sample was introduced[9].

### Long-Term Antibacterial Activity Determination

The activity of free AS-48, BMNPs, BMNPs+AMF, AS-48-BMNPs, and AS-48-BMNPs+AMF was evaluated on bacterial cultures as follows. An overnight culture of each bacterium grown on TSA was used to prepare a suspension in 0.9% sterile NaCl, with a turbidity similar to 0.5 McFarland scale. This suspension was 100-fold diluted in TSB and incubated in parallel at 37 °C and 45 °C (mimicking human body and temperature reached with hyperthermia, respectively) in TSB without BMNPs (Culture37 and Culture45, respectively) and with 10 mg/mL BMNPs at 37 °C and 45 °C (BMNP37 and BMNP45, respectively). Also, this bacterial suspension was mixed with 10 mg/mL BMNPs and exposed to AMF to reach 45 °C, at which they were maintained throughout the experiment (BMNP+AMF). All these experiments were used as growth controls. Bacterial suspensions were treated with 10 mg/mL AS-48-BMNPs and incubated at 37 °C (here referred as AS-48-BMNP37) or at 45 °C (AS-48-BMNP45). Also, another aliquot of the bacterial suspension treated with 10 mg/mL AS-48-BMNPs was exposed to AMF and maintained at 45 °C up to 90 min (AS-48-BMNP+AMF). 10 µL aliquots were diluted after 15, 30, 60 and 90 min in 0.9% sterile NaCl and plated on TSA in triplicate. After 24 h incubation at 37 °C, the colonies were counted. All the experiments were repeated at least three times.

## Short-Term Hyperthermia Effect

To further elucidate the effect that magnetic hyperthermia has on Gram-negative bacteria, a suspension of these bacteria prepared as before was mixed with 10 mg/mL BMNPs and exposed to an AMF (field strength of 22 kA/m and frequency of 140 kHz) for 30 min. After magnetic hyperthermia treatment, AS-48 was immediately added to the AMF-treated culture at two concentrations (5 and 50  $\mu$ M), incubated for additional 5 min and plated on TSA. Three replicas were done per experiment to ensure reproducibility. Untreated AS-48 bacterial suspension used as control experiment was added of TSB and run in parallel.

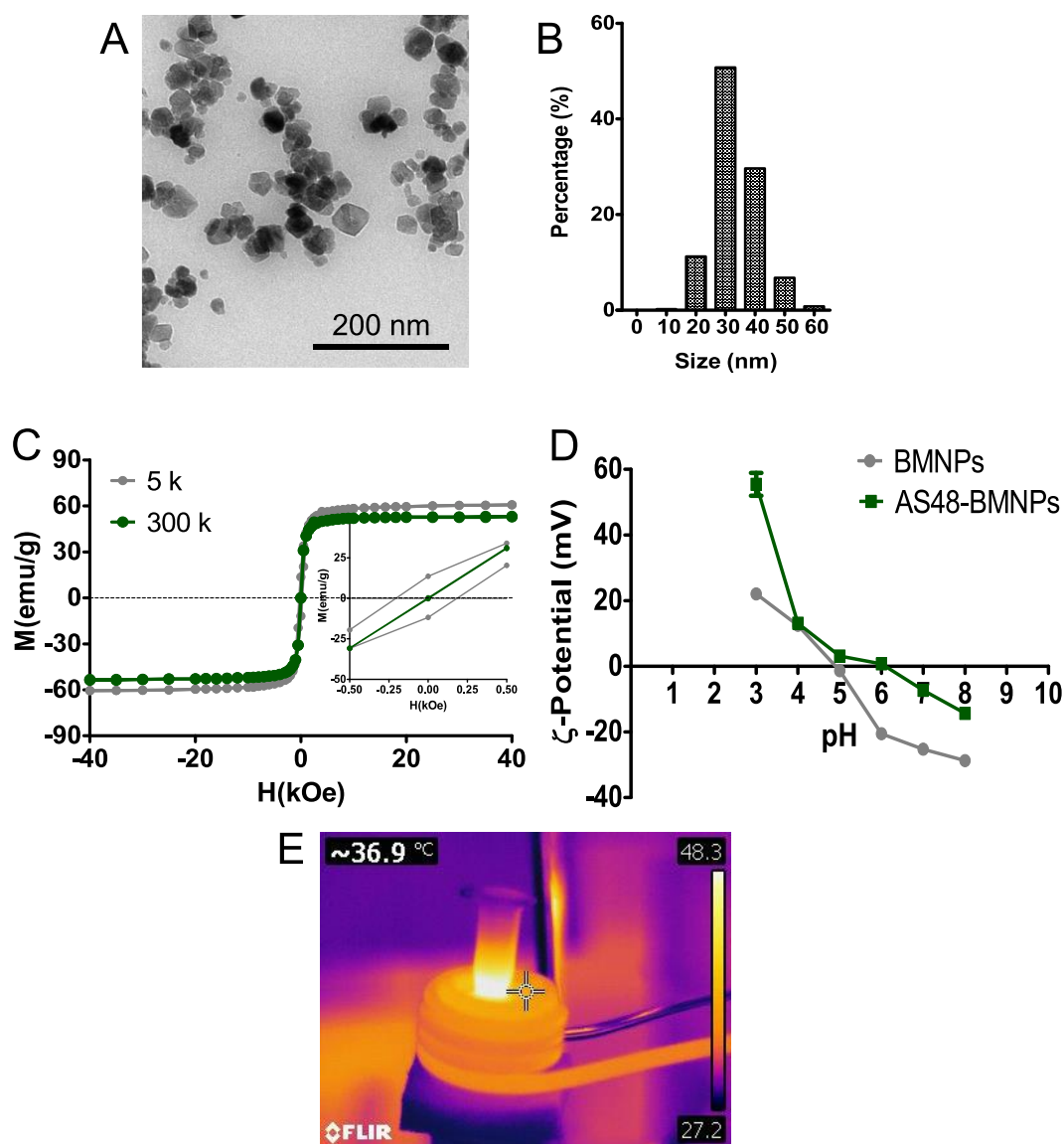
## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.01, GraphPad Software (San Diego, CA, USA). For antibacterial activity analysis, data represent average  $\pm$  SEM of, at least, three independent experiments performed in triplicate, and statistical analyses were carried on using two-way ANOVA test. Statistical differences were considered significant when  $p$  values were  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*), and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)).

## Results and Discussion

### Nanoassemblies AS-48-BMNPs: physical properties, binding efficiency, stability and modeling

The BMNPs size and morphology were analyzed by TEM. Figure 1A shows BMNPs with well-defined faces and sizes ranging from 20 to 60 nm, with an average crystal size of  $34 \pm 8$  nm (Figure 1B). The hysteresis cycle shows a typical ferromagnetic behaviour at 5 K, while at 300 K, these nanoparticles show zero coercivity in the absence of an external magnetic field, which indicates their superparamagnetic character (Figure 1C). The magnetic saturation of the nanoparticles is  $\sim 53$  emu/g at 300 K. These data indicate that the nanocarrier will behave as non-magnetic in the absence of an external magnetic field, but with a fairly high magnetic response upon the application of an external field, as demonstrated in previous studies[10,30]. This, along with the BMNPs surface negative charge at physiological pH ( $\zeta$ -potential data, Figure 1D), ensures colloidal stability.



**Figure 1.** Nanoparticles characterization. (A) TEM image and (B) BMNPs size distribution. (C) Hysteresis cycle of BMNPs at 300 K and 5 K. Inset: Detail of the hysteresis cycle in the absence of external magnetic field at 300 K and 5 K. (D)  $\zeta$ -potential of BMNPs and AS-48-BMNPs. (E) Thermographic photograph of BMNPs exposed to AMF (magnetic field strength of 22 kA/m and frequency of 140 kHz).

The  $\zeta$ -potential data for BMNPs showed that these nanoparticles displayed an *iep* at  $\sim 4.8$  and negative surface charge at higher pH values (Figure 1D). Thus, BMNPs can be functionalized by means of electrostatic interactions with AS-48, which is strongly positively charged at physiological pH (*iep* of AS-48  $\sim 10.5$ )[17]. In the nanoassemblies, the electrostatic bonding between AS-48 and BMNPs could occur between the positively charged helices that are exposed by DF-I, and the MamC negatively charged carboxyl

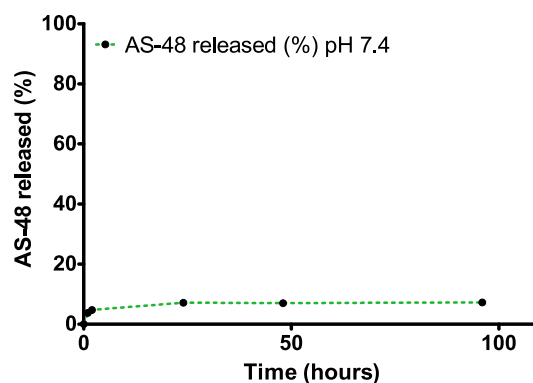


and hydroxyl groups, as it has been previously demonstrated for other nanoassemblies[6]. The nanoassemblies  $\zeta$ -potential modification compared to that of BMNPs further supports this hypothesis. In fact, AS-48-BMNPs nanoassemblies display a higher *iep* value than that of BMNPs (pH 6.0 *versus* pH 4.8, respectively), which indicates that a fraction of the negatively charged functional groups previously exposed in BMNPs are no longer available, most probably because of the binding to AS-48 molecules.

The capability of BMNPs as hyperthermia agents was also investigated. Figure 1E shows an image of the thermographic camera when the sample is subjected to the AMF, demonstrating its ability to generate heat, resulting in temperature increases that exceed 40 °C.

Our data adjusted to the Langmuir-Freundlich model show that BMNPs were able to carry 0.064 mg of AS-48 per mg of magnetite (SI). This value corresponds with loading efficiency of 60-90% and is similar to or, in some cases, higher than that obtained in nanoformulations described in several studies with bacteriocins. For instance, values of 9.9-43.8% have been reported for nisin encapsulated in liposomes[31] or 5-75% and 25-75% in the case of carbohydrate nanoparticles[32] and nanofibers[33], respectively. The high *r* coefficient ( $r = 3.5 \pm 0.8$ ) demonstrates a strong positive cooperativity between the AS-48 molecules during the adsorption process, revealing that adsorbed molecules are interacting with the substrate but also with themselves, lowering the adsorption energy of the next AS-48 molecule[34]. This type of interaction has been previously described for other molecules on BMNPs surface[6,10,35].

When AS-48-BMNPs nanoassemblies were incubated in HEPES buffer, the release at physiological pH is practically negligible ( $D_R \sim 7\%$  after 96 h) (Figure 2). This result shows the good stability of the nanoassemblies at physiological pH, which contrasts with that determined for other nanoformulations, in which 50% release of a bacteriocin after 2 hours was detected[36,37]. This characteristic offers a relevant step forward for the potential clinical application of AS-48-BMNPs nanoassemblies, since negligible AS-48 release is expected during storage or even in the bloodstream until the nanoparticles reach the target site.



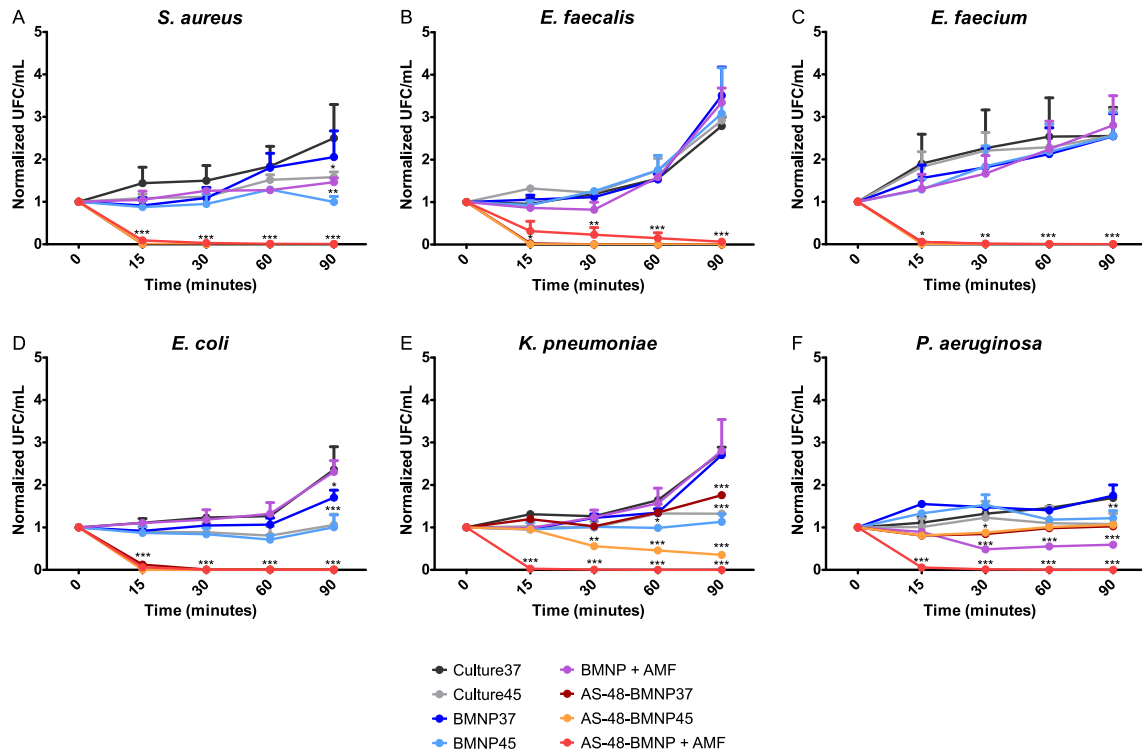
**Figure 2.** Kinetics of AS-48 release from loaded AS-48-BMNPs over time at physiological pH at 37 °C.

### Antimicrobial Effect of AS-48-BMNPs

The sole presence of BMNPs at a given temperature does not reduce the viable bacterial count during the time course of the experiment and, in most cases, it has no significant effect on growth (Figure 3). As expected, AS-48 coupled to BMNPs (AS-48-BMNPs) have a bactericidal effect against all Gram-positive bacteria tested (*E. faecium*, *E. faecalis* and *S. aureus*) and no growth was observed after the treatment, either at 37 °C or 45 °C (Figure 3A-3C). Surprisingly, the behaviour of *E. coli* was very similar and no growth was detected 15 minutes following upon treatment (Figure 3D). Conversely, AS-48-BMNPs slowed the growth at 37 °C for both *Klebsiella* and *Pseudomonas*, but could only reduce *Klebsiella* viability at 45 °C (Figure 3E-F). In either case, viable cells were still detected after 90 min. These experiments show that BMNPs can efficiently transport AS-48 to the bacterial surface, probably driven by electrostatic interactions between the cell wall and the charged nanoassemblies[38,39]. Once AS-48 is concentrated there, our results demonstrate that the molecule can totally inhibit very fast the growth of the Gram-positive bacteria tested and *E. coli*, while this inhibition is only partial in *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*.

The scenario was different when these resistant bacteria were treated with the nanoassembly AS-48-BMNPs exposed to AMF (AS-48-BMNP+AMF). In all cases, either in Gram-positive or Gram-negative bacteria, no growth was detected after 15 min treatment (Figure 3). These results are particularly interesting compared with those obtained when the treatment involved AMF but no AS-48 (BMNP+AMF experiments). Figure 3 shows that hyperthermia by itself has no clear bactericidal effect, only in the

case of *Pseudomonas* a feeble reduction in the viable cell count could be observed (Figure 3F). Therefore, these results demonstrate that the combination of AS-48-BMNPs and AMF is a potent innovative alternative as a potential therapy against bacterial infections.



**Figure 3.** Normalized growth of indicator strains at different temperatures with or without BMNPs and AS-48. Bacterial growth curves were normalized at the bacteria concentration value at time 0 minutes. Two-way ANOVA test reveals statistical significance referred to Culture37 for each time assayed ( $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*), and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)).

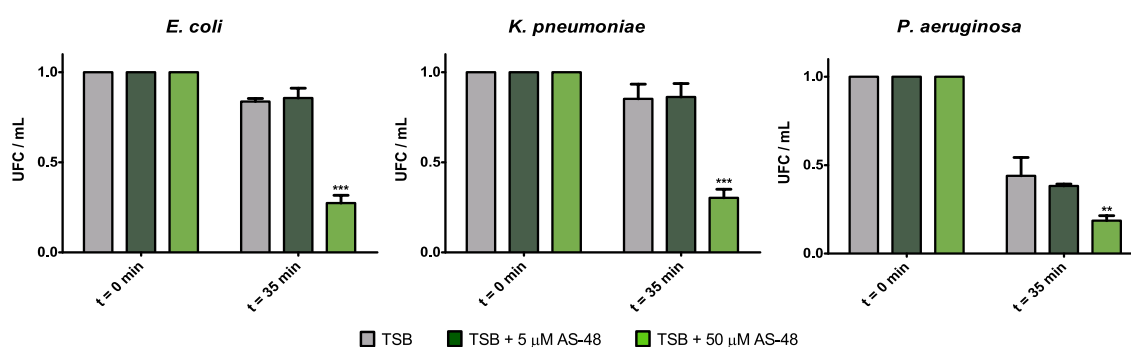
The results are particularly striking in the case of Gram-negative bacteria. It is well known that AS-48 is active against several Gram-positive bacteria, including those used in this panel, whereas much higher concentrations of free AS-48 are required to inhibit Gram-negative bacteria[17,40,41]. However, when AS-48 is immobilized on BMNPs and, even more, when magnetic hyperthermia is additionally combined, Gram-negative bacteria become sensitive. Such a result had not been observed before and highlights the potential of the synergy between the two treatments, which reinforces the suitability of this treatment against fastidious drug-resistant bacteria.

## Model for the Mechanism of Action of the Nanoassembly

The starting hypothesis, supported by previous studies[38,39] was that nanoassemblies, driven by electrostatic interactions can carry AS-48 to the cell wall, where an external magnetic field would increase the AS-48 concentration, as previously shown for DOXO-BMNPs in the context of tumor cells[30]. Once there, AS-48 (partial or total) desorption would facilitate the switch to DF-II and its insertion in the bacterial cell membrane[18,19]. In this scenario, two electrostatic interactions are competing at the interface of bacterial cell wall. The first one is the electrostatic attraction between AS-48 (positively charged) and the cell wall (negatively charged) and the second one is the electrostatic interaction between AS-48 and BMNPs that once kept this binding. As discussed above, cooperative binding depends on the environmental pH and the distance between AS-48 and BMNP surface, decreasing to the square of the distance. If the first one is predominant, AS-48 liberation and pore formation will be favored. Notably, acidic pH surrounding the cell membrane caused by the metabolism reduces BMNPs charge, weakening the second interaction and allowing AS-48 release. AS-48 molecules that are located further from the BMNP surface would be readily released, continuing with the inner layers of the nanoassemblies until reaching equilibrium. Furthermore, this detachment could be favored upon exposure to AMF because of the increase of the BMNPs thermal energy that further weakens the electrostatic bond[6,10,12]. A fermentative metabolism will have a more pronounced effect on the surface pH than a respiratory one. This hypothesis seems to be confirmed by the results obtained in the assays performed with the Gram-negative bacteria (Figures 3D-3F). Thus, AS-48-BMNPs are able to exert its antibacterial action against *E. coli* (mixed acid fermentation, lowest pH) at any temperature (37 °C and 45 °C), and the antibacterial effect is only mild against *Klebsiella* (butylene-glycol fermentation, which in addition is capsulated and the presence of EPS further difficult AS-48 effectiveness) and finally is negligible against *Pseudomonas* (respiratory metabolism).

In any case, magnetic hyperthermia overcomes these burdens. This conclusion was further confirmed by data shown in a second assay carried out on Gram-negative bacteria (Figure 4). AS-48 was immediately added to the cultures previously treated with BMNPs and AMF (30 min). Remarkably, a striking reduction of the bacterial growth was observed in all cases, being more notable as the concentration of AS-48 increased. Results on *E. coli* and *Klebsiella* are very similar and show that BMNPs exposed to AMF are able

to slightly reduce the cell count. This reduction can occur because the induced rotation of BMNPs (and/or the local heat they generate) probably causes structural damage on the outer cell membrane (as demonstrated in eukaryote cells[42]) and/or breakage of the capsule in *Klebsiella*. However, magnetic hyperthermia by itself is not able to exert a noticeable cell death (Figure 3). These results point out that AMF is able to overcome the differences in pH value caused by the dissimilar metabolism, and/or the capsule protection in *K. pneumoniae*, resulting in an identical bactericidal effect compared to that observed in *E. coli*.



**Figure 4.** Effect on cell growth of short-term (30 minutes) magnetic hyperthermia treatment following upon addition of AS-48 on Gram-negative strains. Bacterial growth concentrations were normalized at the bacteria concentration value at time 0 minutes. Two-way ANOVA test reveals statistical significance referred to TSB for each time assayed ( $p \leq 0.01$  (\*\*), and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)).

The results of this experiment on *Pseudomonas* are noticeably different (Figure 4). For this bacterium, AMF seems to have a bactericidal effect, being that effect potentiated when combined with AS-48 (dose-dependent). In this case, free BMNPs exposed to an AMF could locally alter the outer membrane compromising viability, either by a local temperature increase and/or through local mechanical damage due to particle rotation[42]. Consequently, this disturbance facilitates the entrance of AS-48, reaching the cell membrane and exerting the strongest bactericidal action. Therefore, in addition to creating high local doses of AS-48, AS-48-BMNPs enhance the antibacterial effect of AS-48 against Gram-negative bacteria by the disturbance of cell structures induced by BMNPs under AMF.

These novel results provide a step further in the clinical applications of bacteriocins, since they demonstrate that it is possible to perform an effective local

antibacterial chemotherapy and how, by combining this chemotherapy with magnetic hyperthermia mediated by BMNPs.

## Conclusions

The results here presented provide an approach to locally treat bacterial infection by combining a direct antibacterial chemotherapy with magnetic hyperthermia (*i.e.* AS-48-BMNPs, designed and characterized in the present study). The combination of AS-48 with BMNPs is attained by electrostatic binding and can be weakened or even broken at the interface bacteria-medium where acidic conditions occur, favoring the AS-48 transition from DF-I to DF-II and allowing the peptide to insert into the lipid bilayer of the bacterial membrane. While the nanoassembly has a clear bactericidal effect against all the Gram-positive bacteria tested, there are a number of factors that affect the sensitivity of Gram-negative ones: a) the relatively high dose of AS-48 carried by BMNPs (that locally concentrates at the cell wall), b) the probably enhanced AS-48 release triggered by magnetic hyperthermia, c) the local temperature increase and d) the mechanical damage in cell structures (*i.e.* outer cell membrane) caused also by magnetic hyperthermia, that align to allow Gram-negative bacteria to become sensitive to AS-48. The success of the nanoassembly depends on the acidic environmental conditions at the cell wall that bacterial metabolism induces and could be disallowed by the presence of capsule or EPS. However, the adverse conditions are overcome by the combined action of magnetic hyperthermia, even when this treatment is applied against Gram-negative bacteria, resulting in a strong and fast bacterial death within minutes. Therefore, the fact that the nanoassemblies allow a directed chemotherapy, controlled by an external magnetic field provide new insights in the design of alternative treatments for localized bacterial infections, even against fastidious drug-resistant bacteria.

## Acknowledgments

CJL thanks Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 and Instituto de Biotecnología of the University of Granada. This study is part of a PhD Thesis conducted at the University of Granada, Spain. M.M.-L. and M.M. thank the research group BIO160; CJL and YJ thank group RNM-938. This research work is supported by Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2016-76723 project), Instituto de Salud Carlos III

(PI20/01658 project) and Junta de Andalucía. Programa Operativo FEDER 2014-2020 (A1-FQM-341-UGR18, C-FQM-497-UGR18, A-BIO-376-UGR18) and University of Granada (PPJIB2019-01). Ylenia Jabalera wants to acknowledge a FPU2016 grant (ref. FPU16\_04580) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain) and a FEMS Research and Training Grant (ref. FEMS-GO-2020-201) from Federation of European Microbiological Society (FEMS).

## References

- [1] J. O'Neill, Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations: the review on antimicrobial resistance; 2016 [Available from: <https://amr-review.org>, 2016. [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final\\_paper\\_with\\_cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final_paper_with_cover.pdf) (accessed March 31, 2021).
- [2] M.D.K. Glasgow, M.B. Chougule, Recent developments in active tumor targeted multifunctional nanoparticles for combination chemotherapy in cancer treatment and imaging, *J. Biomed. Nanotechnol.* 11 (2015) 1859–1898. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2145>.
- [3] E. Alphanbéry, S. Faure, L. Raison, E. Duguet, P.A. Howse, D.A. Bazylinski, Heat production by bacterial magnetosomes exposed to an oscillating magnetic field, *J. Phys. Chem. C.* 115 (2011) 18–22. <https://doi.org/10.1021/jp104580t>.
- [4] K. El-Boubbou, Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery, *Nanomedicine.* 13 (2018) 929–952. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0320>.
- [5] J. Dobson, Magnetic micro- and nano-particle-based targeting for drug and gene delivery, *Nanomedicine.* 1 (2006) 31–37. <https://doi.org/10.2217/17435889.1.1.31>.
- [6] G. García Rubia, A. Peigneux, Y. Jabalera, J. Puerma, F. Oltolina, K. Elert, D. Colangelo, J. Gómez Morales, M. Prat, C. Jimenez-Lopez, pH-Dependent adsorption release of doxorubicin on MamC-Biomimetic Magnetite Nanoparticles, *Langmuir.* 34 (2018) 13713–13724. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03109>.
- [7] T. Prozorov, D.A. Bazylinski, S.K. Mallapragada, R. Prozorov, Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: Topical review, *Mater. Sci. Eng. R.* 74 (2013) 133–172. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2013.04.002>.
- [8] Q. Li, C.W. Kartikowati, S. Horie, T. Ogi, T. Iwaki, K. Okuyama, Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles, *Sci. Rep.* 7 (2017) 9894. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09897-5>.
- [9] G.R. Iglesias, Y. Jabalera, A. Peigneux, B.L.C. Fernández, Á. V. Delgado, C. Jimenez-Lopez, Enhancement of magnetic hyperthermia by mixing synthetic inorganic

and biomimetic magnetic nanoparticles, *Pharmaceutics*. 11 (2019) 273. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060273>.

[10] Y. Jabalera, B. Garcia-Pinel, R. Ortiz, G. Iglesias, L. Cabeza, J. Prados, C. Jimenez-Lopez, C. Melguizo, Oxaliplatin–biomimetic magnetic nanoparticle assemblies for colon cancer-targeted chemotherapy: An in vitro study, *Pharmaceutics*. 11 (2019) 395. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080395>.

[11] Y. Jabalera, F. Oltolina, A. Peigneux, A. Sola-Leyva, M.P. Carrasco-Jiménez, M. Prat, C. Jimenez-Lopez, G.R. Iglesias, Nanoformulation design including MamC-mediated biomimetic nanoparticles allows the simultaneous application of targeted drug delivery and magnetic hyperthermia, *Polymers (Basel)*. 12 (2020) 1832. <https://doi.org/10.3390/POLYM12081832>.

[12] A. Peigneux, F. Oltolina, D. Colangelo, G.R. Iglesias, A. V. Delgado, M. Prat, C. Jimenez-Lopez, Functionalized Biomimetic Magnetic Nanoparticles as effective nanocarriers for targeted chemotherapy, *Part. Part. Syst. Charact.* 36 (2019) 1900057. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201900057>.

[13] M.Á. Abengózar, R. Cebrián, J.M. Saugar, T. Gárate, E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, M. Maqueda, L. Rivas, Enterocin AS-48 as evidence for the use of bacteriocins as new leishmanicidal agents, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (2017) e02288-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02288-16>.

[14] M. Martínez-García, J.M. Bart, J. Campos-Salinas, E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, E. González-Rey, M. Navarro, M. Maqueda, R. Cebrián, J.M. Pérez-Victoria, Autophagic-related cell death of *Trypanosoma brucei* induced by bacteriocin AS-48, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 8 (2018) 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.03.002>.

[15] R. Martín-Escolano, R. Cebrián, M. Maqueda, D. Romero, M.J. Rosales, M. Sánchez-Moreno, C. Marín, Assessing the effectiveness of AS-48 in experimental mice models of Chagas' disease, *J. Antimicrob. Chemother.* 75 (2020) 1537–1545. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA030>.

[16] A. Galvez, M. Maqueda, M. Martinez-Bueno, E. Valdivia, Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 886–892. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.886-892.1991>.

[17] M. Maqueda, A. Galvez, M. Bueno, M. Sanchez-Barrena, C. Gonzalez, A. Albert, M. Rico, E. Valdivia, Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins, *Curr. Protein Pept. Sci.* 5 (2004) 399–416. <https://doi.org/10.2174/1389203043379567>.

[18] M.J. Sánchez-Barrena, M. Martínez-Ripoll, A. Gálvez, E. Valdivia, M. Maqueda, V. Cruz, A. Albert, Structure of bacteriocin AS-48: From soluble state to membrane bound state, *J. Mol. Biol.* 334 (2003) 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.060>.

[19] R. Cebrián, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia, A. Albert, M. Maqueda, M.J. Sánchez-Barrena, The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by



hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity, *J. Struct. Biol.* 190 (2015) 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.006>.

[20] R. Cebrián, M.E. Rodríguez-Cabezas, R. Martín-Escolano, S. Rubiño, M. Garrido-Barros, M. Montalbán-López, M.J. Rosales, M. Sánchez-Moreno, E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, C. Marín, J. Gálvez, M. Maqueda, Preclinical studies of toxicity and safety of the AS-48 bacteriocin, *J. Adv. Res.* 20 (2019) 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.06.003>.

[21] A. Gálvez, M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia, Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms, *Res. Microbiol.* 140 (1989) 57–68. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(89\)90060-0](https://doi.org/10.1016/0923-2508(89)90060-0).

[22] S. Ananou, A. Muñoz, A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, M. Maqueda, E. Valdivia, Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate, *Int. Dairy J.* 18 (2008) 923–927. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.02.001>.

[23] R. Cebrián, A. Baños, E. Valdivia, R. Pérez-Pulido, M. Martínez-Bueno, M. Maqueda, Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain, *Food Microbiol.* 30 (2012) 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002>.

[24] C. Valverde-Tercedor, M. Montalbán-López, T. Perez-Gonzalez, M.S. Sanchez-Quesada, T. Prozorov, E. Pineda-Molina, M.A. Fernandez-Vivas, A.B. Rodriguez-Navarro, D. Trubitsyn, D.A. Bazylinski, C. Jimenez-Lopez, Size control of *in vitro* synthesized magnetite crystals by the MamC protein of *Magnetococcus marinus* strain MC-1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 5109–5121. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6326-y>.

[25] T. Perez-Gonzalez, A. Rodriguez-Navarro, C. Jimenez-Lopez, Inorganic magnetite precipitation at 25 °C: A low-cost inorganic coprecipitation method, *J. Supercond. Nov. Magn.* 24 (2011) 549–557. <https://doi.org/10.1007/s10948-010-0999-y>.

[26] S. Lagergren, About the Theory of So-called Adsorption of Soluble Substances, *Sven. Vetenskapsakad. Handlingar.* 24 (1898) 1–39.

[27] I. Rodríguez-Ruiz, J.M. Delgado-López, M.A. Durán-Olivencia, M. Iafisco, A. Tampieri, D. Colangelo, M. Prat, J. Gómez-Morales, pH-responsive delivery of doxorubicin from citrate-apatite nanocrystals with tailored carbonate content, *Langmuir.* 29 (2013) 8213–8221. <https://doi.org/10.1021/la4008334>.

[28] I. Langmuir, The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum., *J. Am. Chem. Soc.* 40 (1918) 1361–1403. <https://doi.org/10.1021/ja02242a004>.

[29] E. Turiel, C. Perez-Conde, A. Martin-Esteban, Assessment of the cross-reactivity and binding sites characterisation of a propazine-imprinted polymer using the Langmuir-Freundlich isotherm, *Analyst.* 128 (2003) 137–141. <https://doi.org/10.1039/b210712k>.

[30] F. Oltolina, A. Peigneux, D. Colangelo, N. Clemente, A. D'urso, G. Valente, G.R. Iglesias, C. Jiménez-Lopez, M. Prat, Biomimetic magnetite nanoparticles as targeted drug

nanocarriers and mediators of hyperthermia in an experimental cancer model, *Cancers* (Basel). 12 (2020) 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers12092564>.

[31] A. Lewies, J.F. Wentzel, A. Jordaan, C. Bezuidenhout, L.H. Du Plessis, Interactions of the antimicrobial peptide nisin Z with conventional antibiotics and the use of nanostructured lipid carriers to enhance antimicrobial activity, *Int. J. Pharm.* 526 (2017) 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.071>.

[32] L. Bi, L. Yang, A.K. Bhunia, Y. Yao, Carbohydrate nanoparticle-mediated colloidal assembly for prolonged efficacy of bacteriocin against food pathogen, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 1529–1536. <https://doi.org/10.1002/bit.23099>.

[33] H. Cui, J. Wu, C. Li, L. Lin, Improving anti-listeria activity of cheese packaging via nanofiber containing nisin-loaded nanoparticles, *LWT - Food Sci. Technol.* 81 (2017) 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.003>.

[34] Q. Luo, J.D. Andrade, Cooperative adsorption of proteins onto hydroxyapatite, *J. Colloid Interface Sci.* 200 (1998) 104–113. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5364>.

[35] Y. Jabalera, A. Sola-Leyva, A. Peigneux, F. Vurro, G.R. Iglesias, J. Vilchez-Garcia, I. Pérez-Prieto, F.J. Aguilar-Troyano, L.C. López-Cara, M.P. Carrasco-Jiménez, C. Jimenez-Lopez, Biomimetic magnetic nanocarriers drive choline kinase alpha inhibitor inside cancer cells for combined chemo-hyperthermia therapy, *Pharmaceutics*. 11 (2019) 408. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080408>.

[36] T. Heunis, O. Bshena, B. Klumperman, L. Dicks, Release of bacteriocins from nanofibers prepared with combinations of poly(D,L-lactide) (PDLLA) and poly(ethylene oxide) (PEO), *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 2158–2173. <https://doi.org/10.3390/ijms12042158>.

[37] A. Radaic, M.B. de Jesus, Y.L. Kapila, Bacterial anti-microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins, *J. Control. Release*. 321 (2020) 100–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.001>.

[38] C. Qu, S. Qian, L. Chen, Y. Guan, L. Zheng, S. Liu, W. Chen, P. Cai, Q. Huang, Size-dependent bacterial toxicity of hematite particles, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 8147–8156. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00856>.

[39] S. Vihodceva, A. Šutka, M. Sihtmäe, M. Rosenberg, M. Otsus, I. Kurvet, K. Smits, L. Bikse, A. Kahru, K. Kasemets, Antibacterial activity of positively and negatively charged hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio fischeri*, *Nanomaterials*. 11 (2021) 1–26. <https://doi.org/10.3390/nano11030652>.

[40] H. Abriouel, E. Valdivia, A. Gálvez, M. Maqueda, Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4623–4626. <https://doi.org/10.1128/aem.64.11.4623-4626.1998>.

[41] S. Ananou, A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, M. Maqueda, E. Valdivia, Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments

against *Escherichia coli* O157:H7, J. Appl. Microbiol. 99 (2005) 1364–1372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02733.x>.

[42] A. Sola-Leyva, Y. Jabalera, M.A. Chico-Lozano, M.P. Carrasco-Jiménez, G.R. Iglesias, C. Jimenez-Lopez, Reactive oxygen species (ROS) production in HepG2 cancer cell line through the application of localized alternating magnetic field, J. Mater. Chem. B. 8 (2020) 7667–7676. <https://doi.org/10.1039/d0tb01306d>.

## Supporting Information

The kinetics data were fitted to the Lagergren's equation (Equation 1), in which  $Q$  is the amount of AS-48 on the nanoparticle surface and  $\tau$  is the time needed to reach approximately a 63% of the drug loading capacity ( $Q_{max}$ ) [1,2].

$$Q(t) = Q_{max} \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (1)$$

The adsorption isotherm for the adsorption of AS-48 on BMNPs was performed by fitting the data collected from the experiments performed at 24 hours to the Langmuir–Freundlich (LF) model, by using Origin Pro 8. The LF model (based on equation 2) considers that the adsorption energy is heterogeneous and takes into account cooperativity effects. In this equation,  $Q$  is the amount of adsorbed drug per mass unit of nanoparticles,  $Q_{max}$  is the drug loading capacity,  $C_e$  is the equilibrium concentration of drug in the supernatant,  $K_{LF}$  is the LF affinity constant, and  $r$  is the cooperativity coefficient. Values of  $r > 1$  indicate a positive cooperativity, while values of  $r < 1$  indicate a negative cooperativity [2–5]:

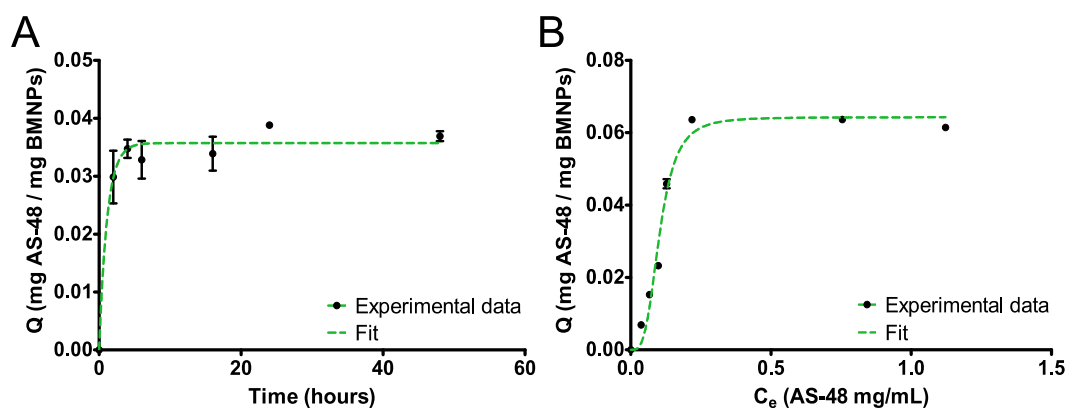
$$Q = \frac{Q_{max} (K_{LF} \cdot C_e)^r}{1 + (K_{LF} \cdot C_e)^r} \quad (2)$$

According to the calculations based on the Lagergren's equation,  $\tau$  was  $1.1 \pm 0.2$  h ( $R^2 = 0.9797$ ). Therefore, these kinetic data over time showed that ~6 h was the time needed to reach an equilibrium (Figure S1A). The amount of adsorbed peptide per amount of nanoparticles ( $Q$ ) from the adsorption isotherm (Figure S1B) showed a non-linear association with the amount of non-adsorbed AS-48 ( $C_e$ ), displaying a S-shaped curve with a drug loading capacity ( $Q_{max}$ ) of  $0.064 \pm 0.003$  mg AS-48/mg BMNPs (Table S1). The value of  $Q$  increased slowly initially, rising then exponentially and stabilizing thereafter. The experimental data were adjusted according to Langmuir-Freundlich (LF) model [6,7], which introduces the effects of the surface energetic heterogeneities by means of the exponent  $r$ , yielding a  $R^2 = 0.9792$ . The values of the LF affinity constant

( $K_{LF}$ ) and cooperativity coefficient ( $r$ ) parameters (Table 1), calculated by means of this model (equation 2), were of  $9.6 \pm 0.6$  mL/mg and  $3.5 \pm 0.8$ , respectively.

**Table S1.** Adsorption parameters calculated from nonlinear fitting of experimental data according to the Langmuir-Freundlich equation.

Parameter		$R^2$
$K_{LF}$ [mL/mg]	$9.6 \pm 0.6$	
$Q_{max}$ [mg AS-48 / mg BMNPs]	$0.064 \pm 0.003$	0.9792
$r$	$3.5 \pm 0.8$	



**Figure S1.** Characterization of AS-48-BMNP binding. (A) Adsorption kinetics of AS-48 on BMNPs. Dotted green line represents the nonlinear fitting of the experimental data using the Lagergren's equation. (B) Adsorption isotherm of AS-48 on BMNPs. The dotted green line represents the nonlinear fitting of experimental data using the Langmuir-Freundlich equation.

## References

- [1] S. Lagergren, About the Theory of So-called Adsorption of Soluble Substances, *Sven. Vetenskapsakad. Handlingar*. 24 (1898) 1–39.
- [2] I. Rodríguez-Ruiz, J.M. Delgado-López, M.A. Durán-Olivencia, M. Iafisco, A. Tampieri, D. Colangelo, M. Prat, J. Gómez-Morales, pH-responsive delivery of doxorubicin from citrate-apatite nanocrystals with tailored carbonate content, *Langmuir*. 29 (2013) 8213–8221. <https://doi.org/10.1021/la4008334>.
- [3] G. García Rubia, A. Peigneux, Y. Jabalera, J. Puerma, F. Oltolina, K. Elert, D. Colangelo, J. Gómez Morales, M. Prat, C. Jimenez-Lopez, pH-Dependent adsorption release of doxorubicin on MamC-Biomimetic Magnetite Nanoparticles, *Langmuir*. 34 (2018) 13713–13724. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03109>.
- [4] I. Langmuir, The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum., *J. Am. Chem. Soc.* 40 (1918) 1361–1403. <https://doi.org/10.1021/ja02242a004>.
- [5] E. Turiel, C. Perez-Conde, A. Martin-Esteban, Assessment of the cross-reactivity and binding sites characterisation of a propazine-imprinted polymer using the Langmuir-Freundlich isotherm, *Analyst*. 128 (2003) 137–141. <https://doi.org/10.1039/b210712k>.
- [6] C. Rill, Z.I. Kolar, G. Kickelbick, H.T. Wolterbeek, J.A. Peters, Kinetics and thermodynamics of adsorption on hydroxyapatite of the [ <sup>160</sup>Tb]terbium complexes of the bone-targeting ligands DOTP and BPPED, *Langmuir*. 25 (2009) 2294–2301. <https://doi.org/10.1021/la803562e>.
- [7] R. Sips, On the structure of a catalyst surface, *J. Chem. Phys.* 16 (1948) 490–495. <https://doi.org/10.1063/1.1746922>.

## **CAPÍTULO III**





*Este artículo se ha publicado en la revista indexada en JCR: Pharmaceutics*

*(<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060273>)*

# **Enhancement of Magnetic Hyperthermia by Mixing Synthetic Inorganic and Biomimetic Magnetic Nanoparticles**

Guillermo R. Iglesias<sup>1,\*</sup>, Ylenia Jabalera<sup>2</sup>, Ana Peigneux<sup>2</sup>, Blanca Luna Checa Fernández<sup>1</sup>, Ángel V. Delgado<sup>1</sup> and Concepcion Jimenez-Lopez<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Physics, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18071 Granada, Spain

\*Corresponding authors

## **Abstract**

In this work, we report on the synthesis and characterization of magnetic nanoparticles of two distinct origins, one inorganic (MNPs) and the other biomimetic (BMNPs), the latter based on a process of bacterial synthesis. Each of these two kinds of particles has its own advantages when used separately with biomedical purposes. Thus, BMNPs present an isoelectric point below neutrality (around pH 4.4), while MNPs show a zero-zeta potential at pH 7, and appear to be excellent agents for magnetic hyperthermia. This means that the biomimetic particles are better suited to be loaded with drug molecules positively charged at neutral pH (notably, doxorubicin, for instance) and releasing it at the acidic tumor environment. In turn, MNPs may provide their transport capabilities under a magnetic field. In this study, it is proposed to use a mixture of both kinds of particles at two different concentrations, trying to get the best from each of them. We study which mixture performs better from different points of view, like stability and magnetic hyperthermia response, while keeping suitable drug transport capabilities. This composite system is proposed as a close to ideal drug vehicle with added enhanced hyperthermia response.

## Introduction

In spite of the certainly wide variety of magnetic nanoparticles (MNPs) with different geometries, compositions and functionalizations [1–8] that have become available in recent years, and of the number of applications that have been devised for them [1,9–12], when the goal is to provide a nanocarrier suitable for targeted chemotherapy, there is still room for progress. On one hand, the methods for obtaining MNPs need to be more cost- and time-effective, eco-friendly, and scalable. On the other, the nanoparticles themselves should be improved in terms of maximizing the magnetic moment per particle and providing novel surface properties while exploring their potential as hyperthermia agents that would allow them to combine therapies in the near future.

In this context, cancer is one of the fields of application where magnetic nanoparticles certainly appear as most promising [12–18]. Aside of drug delivery, whereby functionalized magnetic nanoparticles are loaded with the chosen drug and some targeting molecule, such an antibody, driven to the site of action, maintained there by continuous magnetic fields and eventually set for delivery by some external action, magnetic hyperthermia appears as a realistic application of MNPs [19–27]. For that purpose, MNPs are dispersed at a suitable concentration in an aqueous solution and located in the target place for action. There, they are subjected to an alternating magnetic field (with induction of tens mT and frequency of several hundred kHz). Subsequently, the magnetic nanoparticles increase the temperature of the microenvironment in which they are immersed inducing apoptosis of the tumor cells, usually more sensitive to temperature increase compared to healthy cells [28–30].

MNPs are generally produced either by the coprecipitation of iron salts in basic aqueous media possibly stabilized by biocompatible surfactants/polymers or by the thermal decomposition of organometallic precursors in high-boiling nonpolar organic solvents at elevated temperatures (200–360 °C), allowing a great control of the size of the MNPs, their monodispersity and uniformity [31]. However, these methods have some drawbacks mainly derived from the high temperatures used, organic solvents or poor solubility of the nanoparticles in water.

Many of these drawbacks are overcome in biomimetic MNPs (BMNPs). These are produced by the mediation of magnetosome membrane-associated proteins (MAPs) from magnetotactic bacteria, and *in vitro* experiments have been demonstrated to control the size (and thus the magnetic moment per particle), shape, and surface properties of the nanoparticles [32,33]. BMNPs production can be scaled up *in vitro* in eco-friendly, cost-effective magnetite precipitation experiments run at room temperature and 1 atm total pressure by the simple addition of the recombinant protein. Promising BMNPs have been obtained by the mediation of MamC protein from *Magnetococcus marinus* MC-1, since these BMNPs are (i) superparamagnetic at room and body temperature while they present a saturation magnetization of 61 emu/g (at 500 Oe and 25 °C); (ii) are larger than most commercial MNPs and/or other biomimetic magnetites, although still single magnetic domain, showing higher blocking temperature and slower magnetization increase, and thus, larger magnetic moment per particle; (iii) contain up to 4.5 wt% of MamC, which provides functional groups allowing for functionalization; and (iv) adopt the isoelectric point of MamC ( $\text{pH}_{iep}$  4.4), and are strongly negatively charged at physiological pH ( $\text{pH}$  7.4); this property allows the coupling and release of molecules to be pH-dependent. Thus, at physiological pHs, they bind to positively charged molecules (such as doxorubicin, DOXO hereafter) through electrostatic interactions, which are weaker at acidic pHs (such as those found in tumor microenvironments), allowing the release of the adsorbed molecules, and (v); they are fully cytocompatible and hemocompatible, but when they are coupled with DOXO they display dose-dependent cytotoxicity [33].

Recall that single-domain magnetic nanoparticles are characterized by a spin configuration such that in the absence of an external magnetic field, all spins are oriented parallel to each other and parallel or antiparallel to a crystallographic direction, called the easy (or anisotropy) axis [34–36], so that each particle is characterized by a large magnetic moment. Let us imagine for the moment that the particles are immobile, fixed in a non-magnetic matrix, with their easy axes oriented randomly. At very low temperature (or at very high frequencies of the external magnetic field, if this is non-stationary), the transition between the two orientations along the easy axes can only be achieved by the application of sufficiently large external magnetic field, so that the magnetization-H curve will take the form of a square hysteresis cycle, according to the Stoner-Wohlfarth model [35,37]. As temperature rises above 0 K, the transition between the two orientations can be thermally activated, and the coercivity tends to be reduced,

eventually making hysteresis negligible. The same effect will be observed when the field frequency or the particle size is very low, since the coercive field  $H_C$  is related to the anisotropy field  $H_k$  (in turn related to  $K_{\text{eff}}$ , the effective magnetic anisotropy constant of the particles, and their saturation magnetization  $M_S$  as  $H_k = 2 K_{\text{eff}} / \mu_0 M_S$ ) by [35]:

$$H_C = 0.48 H_k (1 - \kappa^{0.8}) \quad (1)$$

with

$$\kappa = \frac{k_B T}{K_{\text{eff}} V} \ln \left( \frac{k_B T}{4 \mu_0 H_0 M_S f V \tau_0} \right) \quad (2)$$

where  $k_B T$  is the thermal energy,  $V$  is the particle volume (or, in the case of coated particles, the volume of the magnetizable core),  $\mu_0$  is the vacuum magnetic permeability,  $H_0$  is the field amplitude,  $f$  is the field frequency, and the characteristic time  $\tau_0$  depends on such quantities as temperature, saturation magnetization or anisotropy constant. It will be assumed to be a constant in the range of  $10^{-10}$ – $10^{-9}$  s. If it is admitted that it suffices with  $H_C$  being  $0.01$ – $0.1 H_k$  to have reversible cycles and absence of hysteresis, then the combination of  $H_0$ ,  $f$ ,  $V$ , and  $M_S$  must be such that  $\kappa = 0.97$ – $0.75$ .

An approximate approach to the general solution of the problem, not using models based on the Stoner-Wohlfarth one is the so-called linear-response theory, where, keeping the assumption of immobile particles, it is found that the hysteresis cycle has its origin in the Néel-Brown relaxation, characterized by a relaxation time  $\tau_N$ , which is a measure of the time taken by the system to return to equilibrium after application of a step magnetic field, or half the time needed for spontaneous inversion of magnetic moment orientation [38–40]. It is given by:

$$\tau_N = \tau_0 \exp \left( \frac{K_{\text{eff}} V}{k_B T} \right) \quad (3)$$

This brings about a delay between magnetization and field, or an imaginary component of the magnetic susceptibility, and manifests again in a finite area hysteresis

cycle, as long as the frequency of the field remains in the vicinity of  $1/\tau_N$ . This approach is only strictly valid for low applied magnetic field strength or highly anisotropic particles.

For hyperthermia applications, the particles are typically dispersed in an aqueous solution, and hence they can rotate under field inversions so that viscous friction is an additional source of phase delay between magnetization and external field, and hence, an additional relaxation contribution to hysteresis. It is called Brownian relaxation, and it is characterized by a time  $\tau_B$ :

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (4)$$

where  $\eta$  is the viscosity of the medium, and  $V_H$  its hydrodynamic volume (including, if any, that of the coating layer) [19,41,42]. Taking the value of  $K_{\text{eff}}$  equal to  $25 \text{ kJ/m}^3$  for magnetite, the Brownian relaxation times for biomimetic ( $\sim 35 \text{ nm}$  in diameter, reported below) and purely inorganic particles ( $\sim 18 \text{ nm}$ ) are, respectively,  $14.4 \mu\text{s}$ , and  $7.4 \mu\text{s}$ , and orders of magnitude higher in the case of magnetization reversal. This means that for the particle sizes and frequencies involved, the magnetic moment is frozen in the particle and the only heating source is friction, according to the linear response model. Considerations on the validity of the relaxation approach just described can be found in References [43–46]. In the context of the linear response theory, if the alternating magnetic field has a frequency in the vicinity of the reciprocal of the mentioned times ( $f$  in the order of  $70 \text{ kHz}$  and  $135 \text{ kHz}$ , respectively), the imaginary component,  $\chi''$ , of the complex magnetic susceptibility is maximum, and this is important, as the dissipated power  $dW/dt$  is proportional to this quantity [28]:

$$\frac{dW}{dt} = \mu_0 \pi \chi'' H_2^0 \quad (5)$$

Another important aspect, not always considered, regards the stability of the particles in the suspension, compromised not only by the colloidal interactions but also by the magnetic dipolar ones. Hence the need for properly controlling the stability, as the

hyperthermia response degrades for aggregated systems [22,47] or when the monodomain range is surpassed [36,48].

Experimentally, the quantity of interest is the so-called Specific Absorption Rate (SAR), or heat released per unit mass of magnetic material ( $m$ ) and per second:

$$\text{SAR} = \left( \frac{CV_S}{m} \right) \frac{dT}{dt} \quad (6)$$

$C$  being the heat capacity of the suspension,  $V_S$  its volume and  $dT/dt$  the rate of temperature increase [28,39]. Typical SAR values are in the order of tens to hundreds of W/g. In order to perform a comparison between different materials without the interference of the details of the specific device used (very often lab-made), a quantity is defined as a measure of the magnetothermal performance of a given suspension, namely, the Intrinsic Loss Power (ILP), given as:

$$\text{ILP} = \frac{\text{SAR}}{fH_0^2} \quad (7)$$

with typical values in the order of  $10^{-9} \text{ Hm}^2\text{kg}^{-1}$ .

In this work, we explore the possibility of maximizing the hyperthermia effect (the rate of temperature rise, in fact) by combining the two types of magnetic particles (BMNPs and MNPs), differing in size and other properties. The goal of the present study is to provide a composition that could be used in the future as a platform for combining drug delivery and hyperthermia. The former particles, BMNPs, mediated by MamC have been chosen because of their demonstrated ability to function as nano-transporters of drugs, being the nanoassembly stable at physiological pH while it destabilizes releasing the drug under acidic pH values, which naturally occur in the tumor environment. The second ones, MNPs, have been chosen because of their potential as hyperthermia agents [33]. By mixing the two systems, we expect to deliver a system that, in the future may prove useful to combine both treatments, *i.e.* targeted chemotherapy plus targeted hyperthermia by using the same platform. To the best of our knowledge, the hyperthermia

of mixed systems has never been investigated, but advantages are foreseen regarding the possibility of optimizing the response.

## Experimental Section

### BMNPs and MNPs Production

Details of the production process are given in Reference [32], and just a short account will be provided here. The MamC gene (ABK44766.1, NCBI Database) was first amplified by the polymerase chain reaction and cloned into pTrcHis-TOPO vector, and expressed in *Escherichia coli* TOP10 competent cells, both from Life Technologies, Invitrogen, Grand Island, NY, USA. The cells were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) broth supplemented with ampiciline. After 5 h contact with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG, Fisher BioReagents, Pittsburgh, PA, USA) the expression of the recombinant MamC was induced. The cell pellet was resuspended in guanidinium lysis buffer overnight. The lysate was centrifuged, and the supernatant loaded onto a HiTrap chelating HP column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) equilibrated with Denaturing Binding Buffer (A). The protein eluate was obtained with Denaturing Elution Buffer (B), and the final step was isolating the MamC protein by successive dialyzations with buffers A and B. The isolated protein was stored at 4 °C until used in the biomineralization process (all buffers were purchased from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

The following step was the production of the MNPs and BMNPs (all reagents needed in this process were purchased from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Milli-Q water (Millipore, Barcelona, Spain) was first deoxygenated by boiling it for 1 h and then cooling in an ice bath while bubbling nitrogen. The water was immediately stored inside an anaerobic chamber (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA) with a 4% H<sub>2</sub> in N<sub>2</sub> atmosphere. The following solutions were prepared inside the chamber: NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.15 M/0.15 M), FeCl<sub>3</sub> (1 M), Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (0.5 M), and NaOH (5 M). The precipitation of inorganic magnetite (MNPs) was carried out as described in Reference [49], and consisted in mixing the prepared solutions to the final concentrations of 3.5 mM/3.5 mM, 5.56 mM, and 2.78 mM, respectively, at 25 °C and 1 atm. NaOH was added to reach a pH of 9. The biomimetic nanoparticles were obtained by adding the purified MamC protein (at a final concentration of 10  $\mu$ g/mL) to the solution used for

MNPs. In both cases, the solids were allowed to grow for 30 days, and magnetically decanted and washed three times with deoxygenated water. The magnetic particles were kept in water inside the Coy chamber until further use.

## Nanoparticle Characterization

The morphology and particle size of the synthesized nanocrystals were analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM Philips Model CM20, Eindhoven, The Netherlands) equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer (EDAX). The size of the particles was measured by using ImageJ 1.47 software, and size distribution curves and ANOVA statistical analyses were determined from measurements performed on 1000 particles. Averages were considered significantly different if  $p < 0.05$ . Powder x-ray diffraction (XRD) analysis was carried out on lyophilized samples with an Xpert Pro X-ray diffractometer (PANalytical; Almelo, The Netherlands) using Cu K $\alpha$  radiation, with the scan range set from 20–60° in  $2\theta$  (0.01°/step; 3 s per step). Electrophoretic mobility measurements were carried out in a Zetameter Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25 °C, in suspensions with 0.01% *w/v* solids concentration and constant ionic strength of 10 mM NaClO<sub>4</sub>. For each suspension, five measurement runs were taken. Magnetization cycles and zero-field cooled field-cooled (ZFC-FC) curves were obtained in an MPMS-XL SQUID magnetometer (Quantum Design, San Diego, CA, USA). The stability of the samples was evaluated optically by measuring the time evolution of the phase separation line between particles and medium. The samples were photographed at certain intervals. Afterward, the height and volume of each phase were determined through image processing and analyzed.

Magnetic hyperthermia experiments were carried out using an AC current generator with a double four-turn coil made of water-cooled copper tube, 4 mm in inner diameter, with 800 mL/min flow rate, comparable to other experimental hyperthermia devices [50]. Three frequencies, namely, 197 kHz, 236 kHz, and 280 kHz were selected, with a fixed magnetic field intensity of 18 kA/m, measured at the center of the coil with a NanoScience Laboratories Ltd. Probe (Staffordshire, UK), with 10  $\mu$ T resolution. These were the combinations accessible with our measurement system, but are close to those used by other authors [45,46,51]. The samples to be evaluated were placed in plastic Eppendorf tubes (1.5 mL sample volume). Four kinds of dispersed systems were evaluated, namely those based on pure MNPs or BMNPs, and mixtures containing 25%



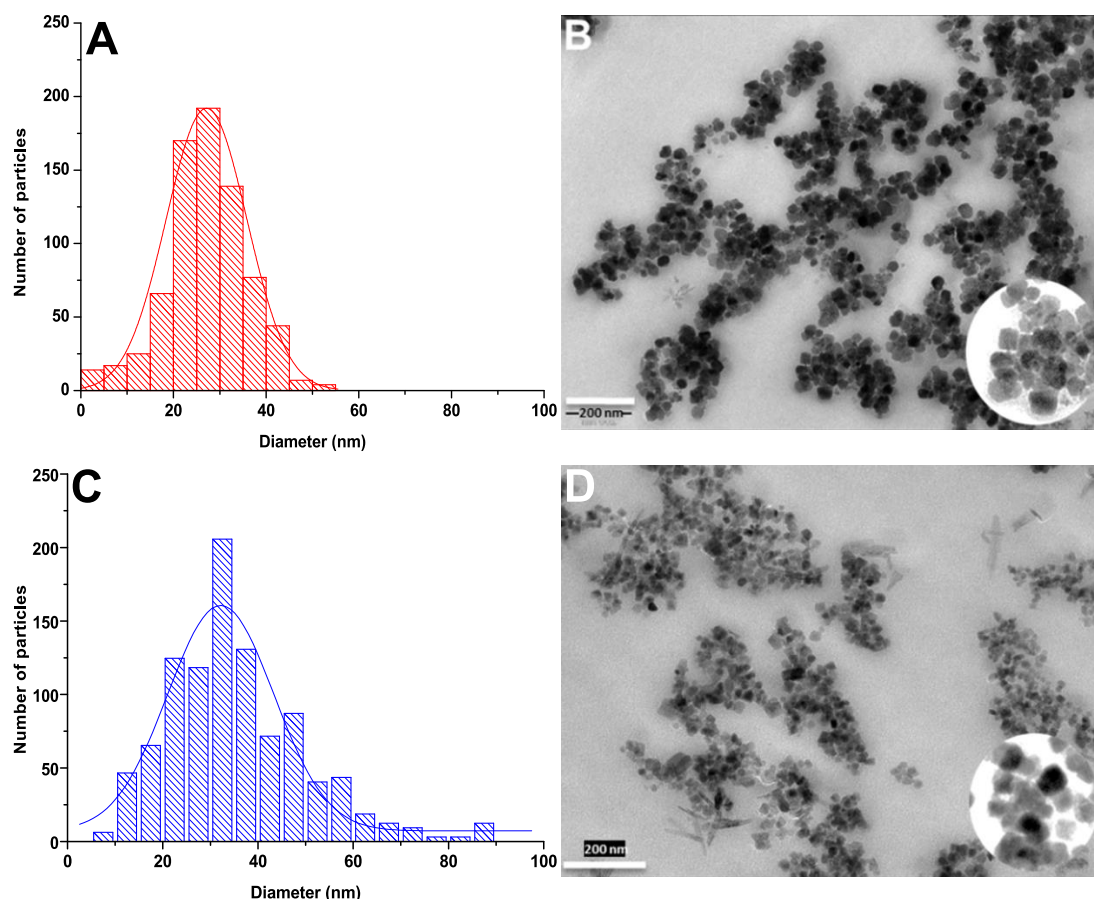
BMNPs + 75% MNPs (here referred to as 25 B + 75 M), and 60% BMNPs + 40% MNPs (60 B + 40 M). This selection was based on using a combination with a predominance of inorganic MNPs and another one with a higher fraction of biomimetic particles in order to estimate the relative contribution of each type of particles.

The SAR and ILP of the dispersions were obtained by measuring the rate of temperature increase as a function of time [19,52], with an optical fiber thermometer (Optocon AG, Dresden, Germany), and using Equations (6) and (7). Considering the rather low concentration of MNPs, the corrections proposed by Gas and Miaskowski [51] in the calculation of the heat capacity of the suspension did not appear necessary. All samples for hyperthermia were prepared with a solids concentration of 25 mg/mL. Note that this concentration is higher than usual in hyperthermia applications (more in the range of 1–10 mg/mL), but it was chosen with the aim of magnifying differences. At such concentrations, magnetic or colloidal interactions might likely affect hyperthermia, as increased stability seems to favor the temperature elevation, if the frequency of the magnetic field is selected in accordance with the size of individual, non-aggregated particles. In fact, in a previous work [22], we found that the hyperthermia response was improved if the suspensions were more stable, although the SAR of 20 nm magnetite suspensions was constant up to 2% (v/v) (or about 100 mg/mL) concentration.

## Results and Discussion

### Nanoparticle Characterization

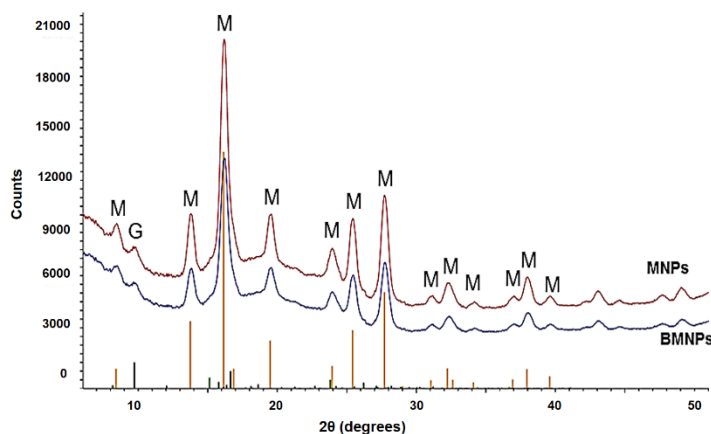
Figure 1B,D show representative TEM pictures of the two kinds of particles. Size histograms are represented in Figure 1A,C, respectively. The mean ( $\pm$  S.D.) diameters obtained from the histograms were  $35 \pm 11$  nm for BMNPs and  $18 \pm 6$  nm for the purely inorganic nanoparticles. Insets in the pictures also show that the shape of both kinds of particles is rather polyhedral, with better homogeneity in the biomimetic case.



**Figure 1.** Diameter histograms (A,C) and TEM pictures (B,D) of biomimetic (BMNPs) and purely inorganic (MNPs) magnetic nanoparticles. The scale bar in B, D is 200 nm.

Figure 2 shows the XRD patterns of both samples. Note the good crystallinity in the two cases, and the excellent coincidence with the magnetite reference pattern (JCPDS card No 19-0629), being the main reflection for magnetite the 311 ( $d$ -spacing = 2.530 Å, for Cu K $\alpha$  radiation,  $2\theta$  is 35.44 degrees). The goethite diffraction lines are also superimposed in the figure, and only a low-angle peak seems to correspond to this oxide. Using Scherrer's formula [53], the crystallite size was obtained for both samples from the half-intensity width of all the lines in the pattern, using specialized Rietveld software (TOPAS 5.0, Bruker, Hamburg, Germany). Calculated crystallite sizes for MNPs vary between 13.0 and 18.3 nm, while those for BMNPs vary between 13.1 and 22.5 nm. Thus, the calculated size from XRD data for MNPs matches that measured from TEM images. However, this is not the case for BMNPs for which we get smaller values than those measured with TEM. Recall that the crystallite size calculated from XRD data is a measure of the size of coherent diffraction domains, which can be smaller than the particle size if small discontinuities will make the domain lose such a coherency. It is true that

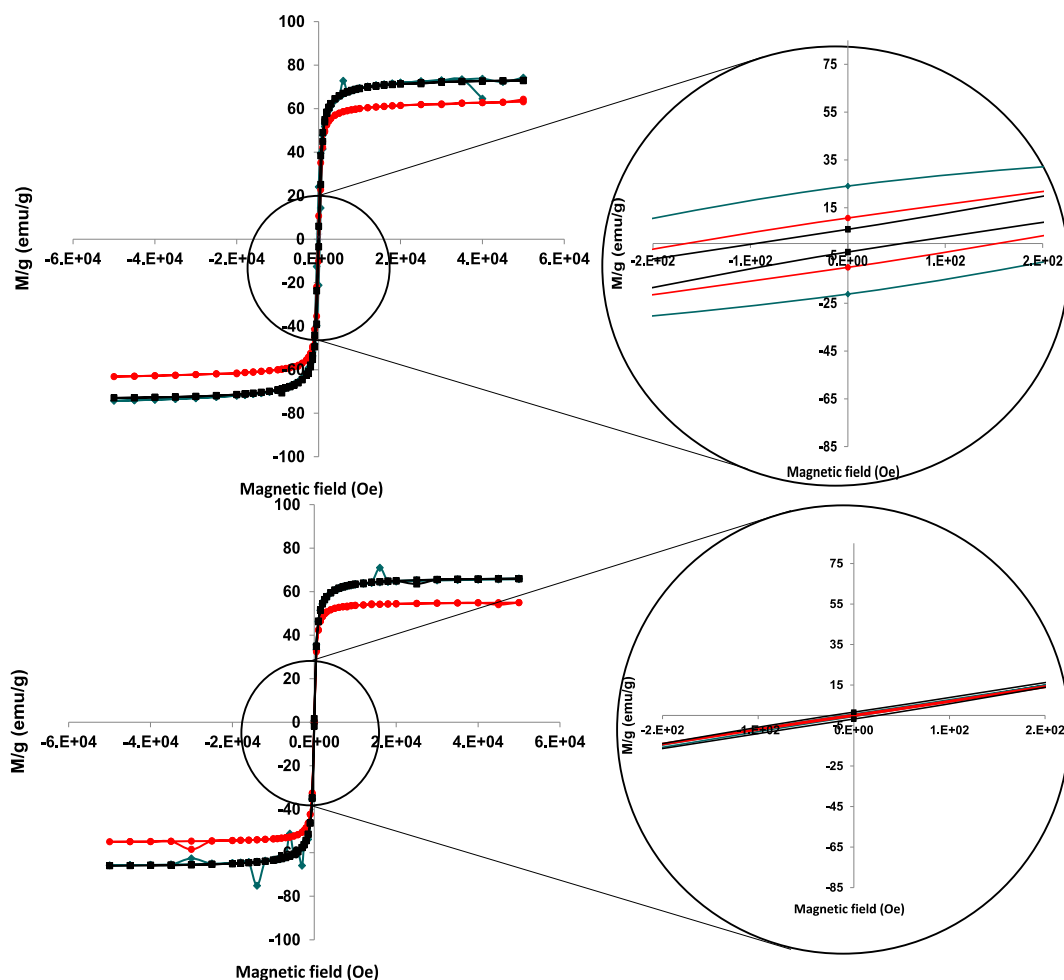
BMNPs could be polycrystals, but this is not what was found by High-Resolution TEM observations of BMNPs in Reference [54]. No discontinuities in lattice fringes were observed, and therefore, the polycrystallinity of BMNPs seems to be ruled out, at least for the majority of the BMNPs analyzed. However, Garcia-Rubia et al. [33] suggested the incorporation of MamC in the outer layers of the BMNPs crystals, that prevented the removal of the protein, and measured, in fact, that 5% of the total mass of the BMNPs is MamC. The presence of the protein would, most probably, induce some defects in the crystal structure, resulting in the loss of coherency in the diffraction. This is why, in BMNPs, the crystal sizes calculated from XRD are lower than those measured in TEM images.



**Figure 2.** The XRD diffraction patterns of purely inorganic (MNPs) and biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs). The positions and intensities of crystallographically-pure magnetite are labeled as M, and those of goethite as G.

The magnetization of the two kinds of particles and an example of one of the mixtures (25 B + 75 M, in fact the most stable mixture, as will be discussed below) is plotted in Figure 3A,B for two temperatures, 5 K and 300 K. The detail in Figure 3 shows that some really low remnant magnetization (about 20 emu/g at most), and coercivity can be measured at 5 K, with the interesting feature that this is maximum for the mixed system. This can be ascribed to some degree of aggregation between the two kinds of particles, as at the pH of the aqueous suspensions in which the mixtures were prepared they are oppositely charged (see detailed below), and electrostatic attraction cannot be ruled out. For room temperature measurements, the magnetization shows no hysteresis, and the particles behave as paramagnetic. This is characteristic of superparamagnetism,

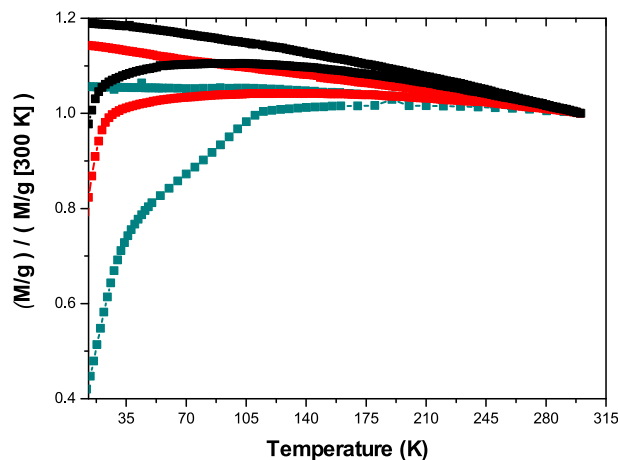
as mentioned. At room temperature, the saturation (mass) magnetization reaches 66 emu/g in the case of MNPs and 25 B + 75 M, and 55 emu/g in the case of BMNPs. Considering the dilution effect of the coating caused by the incorporation of MamC [33], the corrected value of saturation magnetization is 61 emu/g for BMNPs, and 70 emu/g for 25 B + 75 M.



**Figure 3.** Magnetization cycles of MNPs (■), BMNPs (●), and 25 B + 75 M (◆) at 5 K (top), and 300 K (bottom). Magnifications of the low-field region are also plotted.

Zero-field cooling-field cooling (ZFC-FC) curves at 500 Oe (39.8 kA/m) (see Figure 4) show that the blocking temperature (maximum in the ZFC cooling curve, the lower branch in each case, corresponding to the rounded appearance of the curve [55]) is 103 K for MNPs, 145 K for BMNPs and 180 K for 25 B + 75 M, and that at temperatures higher than blocking temperature, (including 300 K and above in all cases), these particles will behave as non-magnetic in the absence of an external magnetic field, confirming the

superparamagnetic nature of the two kinds of particles. This prevents magnetic aggregation, a very favorable feature of the systems investigated.



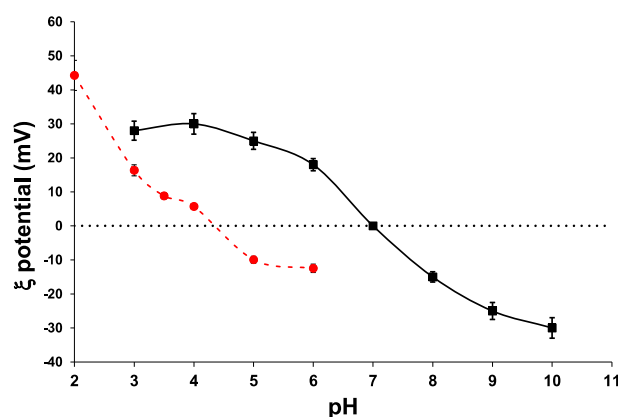
**Figure 4.** Zero field cooling-field cooling (ZFC-FC) curves of MNPs (■), BMNPs (●), and 25 B + 75 M (◆).

However, once an external magnetic field is applied, the nanoparticles will respond efficiently. From these results, it can be inferred that either the bare MNPs and BMNPs, or their mixtures, appear as ideal candidates for the purpose of hyperthermia, drug delivery or combinations thereof.

### Zeta Potential

For the purpose of drug loading and delivery, the ability of the nanoparticles to be coupled to molecules forming stable nanoassemblies at physiological pH and to release the drug at the precise time, as well as the stability, drug-particle or cell membrane-particle interactions, among other properties, are strongly determined by the surface charge, or, alternatively, by the zeta potential  $\zeta$ , of the particles when dispersed. Calculations of the zeta potential were done from the measurements of the electrophoretic mobility of the particles BMNPs and MNPs by means of O'Brien and White's general theory [56]. As one can see in Figure 5, the isoelectric point ( $\text{pH}_{iep}$  or pH of zero  $\zeta$ ) of MNPs was obtained at pH 7.0, while for BMNPs it was 4.4. This zeta potential plot reveals significant differences between both types of nanoparticles. They are positively charged at low pH values and negatively charged at high pH, but BMNPs change from positive to negative at quite a different pH: this suggests that the MamC protein is affecting the surface of the particles, and it is probably located mainly at the interface. In

fact, the investigations by Nudelman et al. [57], and other authors [54,58] on the biomineralization mechanism induced by this protein demonstrate that the particularity of MamC is the template effect for magnetite nucleation and growth that this protein exerts. The two negatively charged amino acids Asp70 and Glu66, located in MamC loop, are separated by  $\sim 8 \text{ \AA}$ , and this distance can match the disposition of iron cations on (100), (110), and (111) faces. Therefore, the crystal could grow in an orderly manner, first from the Fe cations available in solution and then, since the amount of Fe in solution is limited, at the expense of the release of the Fe cations adsorbed in other negatively charged moieties of MamC. Since the process of nucleation is kinetically favored by this template effect, it is precisely those exposed amino acids that act as nucleation sites. Therefore, the restricted number of nucleation sites in the presence of MamC compared to the process of homogeneous nucleation from the bulk solution allows the formation of larger crystals in the former. Moreover, since (100), (110), and (111) faces show up in the final morphology of the BMNPs [57], it can be concluded that, while exerting this template effect for the nucleation, the protein prevents the growth of the crystal on these specific directions.

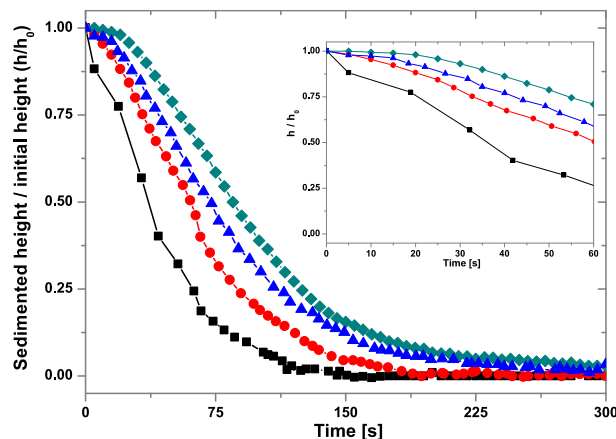


**Figure 5.** Zeta potential of purely inorganic MNPs (■) and biomimetic magnetic nanoparticles BMNPs (●).

The shift of the isoelectric point of the BMNPs relative to that of MNPs make the former adequate nanocarriers, a fact that is important for the sought application. Since most common drugs for cancer therapy are positively charged at physiological pH, they could be electrostatically attached to BMNPs at such pH values, resulting in a stable nanoassembly. On the contrary, when they eventually reach the tumor (acidic pH values), the drug releases from the BMNPs, as the charge of the latter at acidic pH values is nearly

zero [33]. That makes the BMNPs better drug nanocarriers compared to MNPs, as in the former the release of the drug can be controlled by an external factor, as it is a change in the environmental pH value. This feature is absent in MNPs, as their charge is positive anywhere below pH 7.

## Stability



**Figure 6.** Height of the sediment volume relative to its initial value as a function of time for MNPs (■), BMNPs (●), 60 B + 40 M (▲), and 25 B + 75 M (◆). Inset: Short-time detail.

Like in many other applications, the use of magnetic nanoparticles in health applications requires to ensure sufficient stability. Previous results from our laboratory demonstrated that, specifically when it comes to hyperthermia applications, the stability, either electrostatically or polymerically achieved, is an essential factor for optimizing the performance of the system [22]. Hence, in this part of the study, we focus on the possibility of improving hyperthermia by favoring stability. It must be recalled that superparamagnetic nanoparticles interact attractively through van der Waals interactions and dipolar magnetic ones (if remanence is not negligible, which is not our case at room temperature, see Figure 3). Furthermore, the repulsive interactions due to the surface charge will be very low at physiological pH values in the case of MNPs, and larger in the case of BMNPs (Figure 5). In addition, steric hindrance could contribute to the stability of the biomimetic nanoparticles through the presence of surface MamC molecules. In order to confirm this possibility, we evaluated the sedimentation behaviour *vs.* time of the samples (pure end members and mixtures of BMNPs and MNPs). The time evolution of the boundary between sediment volume (height  $h$ ) and clear supernatant, relative to the

initial height  $h_0$ , will be used as a simple test of stability. Data are plotted in Figure 6. Surprisingly, it can be observed that, although the stability of bare MNPs is lower than that of BMNPs, as expected from the steric and electrostatic repulsions due to the MamC coating, adding BMNPs to the former at a relative concentration of 25/75 (25 B + 75 M) brings about a measurable increase of stability. This may be the result of a compromise between the smaller size of MNPs favoring stability and the addition of the protective coating represented by the BMNPs. As a result, an ideal system with a mixed composition emerges.

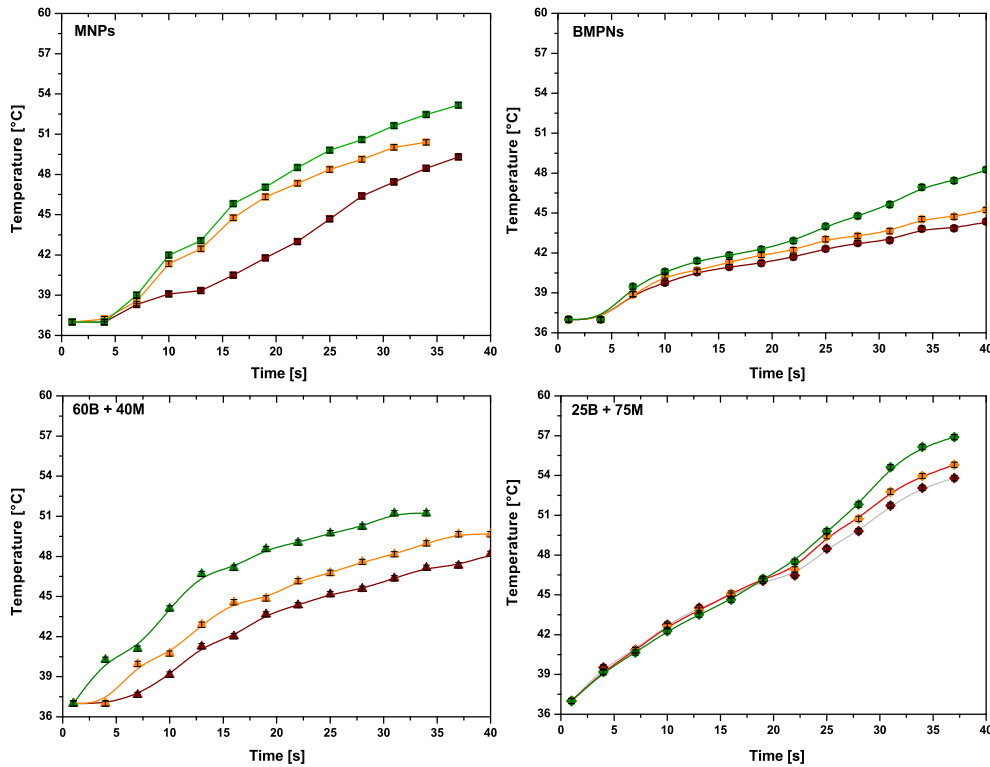
### Performance in Hyperthermia

As a novel field of application of the two kinds of particles and their mixtures, we consider to what extent they are efficient magnetic hyperthermia agents. Figure 7 shows the time evolution of the temperature of the suspensions of MNPs, BMNPs and the two mixtures 25 B + 75 M and 60 B + 40 M under the influence of an alternating magnetic field at the indicated frequencies and a fixed magnetic field strength of 18 kA/m. All types of nanoparticles are able to raise the temperature, the fastest rise occurring for the highest frequency. This effect is particularly visible at longer times. The rate of temperature increase is maximum ( $\sim 34$  °C/min) in mixture 25 B + 75 M and minimum in BMNPs ( $\sim 17$  °C/min) at the highest frequency. It appears that inorganic MNPs are better hyperthermia agents than BMNPs. This justifies their presence in the mixtures under study. They make it possible to design a composition of nanoparticles that (i) can be guided to the target by the application of an external magnetic field; (ii) behave as suitable drug nanocarriers, stable at physiological pH values and from which the drug release is dependent of an external stimuli, *e.g.*, acidic tumor environment (these are the BMNPs); (iii) produce a fast increase of the temperature of the system upon the application of an external magnetic field (these are the MNPs).

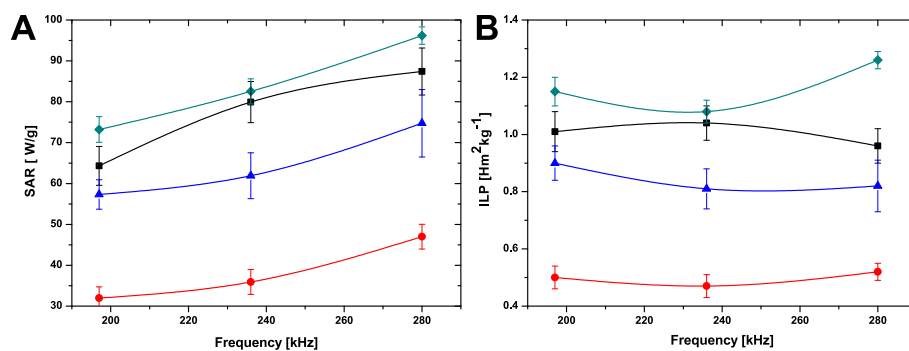
In fact, maximum SAR (up to 96.2 W/g) and ILP ( $1.26 \text{ nHm}^2\text{kg}^{-1}$ ) values were obtained for the 25 B + 75 M sample followed by MNPs, 60 B + 40 M and, finally, BMNPs (Figure 8, Table 1). The lower heating induced by BMNPs is probably related to the larger size of the particles and to the presence of MamC attached to their surface, which probably hinders the rotation of the nanoparticles. The increased SAR and ILP values obtained for the 25 B + 75 M samples is promoted by stability, as single particles with close-to-spherical symmetry rotate under the action of the field less impeded than in



the case of aggregated particles. In addition, it is likely that the field frequencies used are closer to those of maximum phase lag between magnetization and field, for the MNPs than for the BMNPs, so the latter would play here the role of favoring stability.



**Figure 7.** Time evolution of the temperature of the MNP suspensions, for different frequencies: 197 kHz (●), 236 kHz (▲), and 280 kHz (◆). Field strength:  $H_0 = 18$  kA/m. Sample volume 0.5 mL; particle concentration: 25 mg/mL



**Figure 8.** Frequency dependence of (A) SAR and (B) ILP, for the investigated systems. MNPs (■), BMNPs (●), 60 B + 40 M (▲), and 25 B + 75 M (◆). Magnetic field strength: 18 kA/m; particle concentration: 25 mg/mL

**Table 1.** Summary of Specific Absorption Rate (SAR), Intrinsic Loss Power (ILP) calculations, and temperature increase after 60 s exposition time,  $\Delta T$ , for the different samples tested [inorganic Magnetic Nanoparticles (MNPs) and MamC-mediated Biomimetic Magnetic Nanoparticles (BMNPs)], and the field frequencies indicated.

System	Frequency $f$ [kHz]	SAR [W/g]	ILP [ $\text{nHm}^2\text{kg}^{-1}$ ]	$\Delta T$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]
MNPs	197	$64 \pm 5$	$1.01 \pm 0.07$	$20.2 \pm 0.2$
	236	$80 \pm 5$	$1.04 \pm 0.06$	$25.2 \pm 0.2$
	280	$87 \pm 6$	$0.96 \pm 0.06$	$28.3 \pm 0.2$
BMNPs	197	$32 \pm 3$	$0.50 \pm 0.04$	$11.6 \pm 0.2$
	236	$36 \pm 3$	$0.47 \pm 0.04$	$12.9 \pm 0.2$
	280	$47 \pm 3$	$0.52 \pm 0.03$	$16.7 \pm 0.2$
60 B + 40 M	197	$57 \pm 4$	$0.90 \pm 0.06$	$18.1 \pm 0.2$
	236	$62 \pm 6$	$0.81 \pm 0.07$	$21.6 \pm 0.2$
	280	$75 \pm 8$	$0.82 \pm 0.09$	$27.5 \pm 0.2$
25 B + 75 M	197	$73 \pm 3$	$1.15 \pm 0.05$	$28.5 \pm 0.2$
	236	$83 \pm 3$	$1.08 \pm 0.04$	$30.5 \pm 0.2$
	280	$96 \pm 2$	$1.26 \pm 0.03$	$34.1 \pm 0.2$

## Conclusions

The present study intended to find an appropriate combination of magnetic nanoparticles that provide suitable targeted hyperthermia, and potentially proper conditions for being loaded with a positively-charged drug at a neutral pH while releasing it at the acid tumor environment. Both inorganic (MNPs) and biomimetic (MamC-mediated, BMNPs) nanoparticles have been proven to be superparamagnetic, having a blocking temperature lower than 300 K, therefore behaving as paramagnetic at this temperature (thus preventing magnetic agglomeration) but exhibiting a relatively high saturation magnetization in the presence of an external magnetic field, being thus able to be magnetically guided to a selected target site. BMNPs have been found to bind different molecules based on electrostatic interactions, forming stable nanoassemblies at physiological pH, based on the change in the isoelectric point (*iep*) of the nanoparticles induced by MamC (*iep* = 4.4). In contrast, MNPs are not as good candidates for that

purpose, since their  $pH_{iep}$  is around 7. The adsorption of a positively charged drug as doxorubicin on BMNPs would be favored at neutral pH, and at the same time its release would also be enhanced as the system acidifies (like in tumor microenvironments) approaching the *iep* of the BMNPs. However, while potentially good nanocarriers, BMNPs are not as good agents for hyperthermia as MNPs. Therefore, the present study offers a composition of nanoparticles, namely, 25% BMNPs + 75% MNPs that, while having the maximum hyperthermia response, likely related to improved stability of the sample, is also suitable as a drug nanocarrier designed to deliver the drug in response to changes in the environmental pH. Therefore, the combination of inorganic and biomimetic nanoparticles potentially allows combined targeted chemotherapy and targeted hyperthermia.

## Acknowledgments

We wish to thank FPU2016 grant (Ref. FPU16-04580), RYC-2014-6901 (MINECO, Spain), CGL2016-76723 (MINECO, Spain and FEDER, EU), Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 (UGR) and Plan Propio Beca de iniciación a la investigación para estudiantes de master (UGR).

## References

1. Rezayan, A.H.; Mousavi, M.; Kheirjou, S.; Amoabediny, G.; Ardestani, M.S.; Mohammadnejad, J. Monodisperse magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles modified with water soluble polymers for the diagnosis of breast cancer by MRI method. *J. Magn. Magn. Mater.* **2016**, *420*, 210–217.
2. Vargas-Osorio, Z.; Argibay, B.; Pineiro, Y.; Vazquez-Vazquez, C.; Lopez-Quintela, M.A.; Alvarez-Perez, M.A.; Sobrino, T.; Campos, F.; Castillo, J.; Rivas, J. Multicore magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C beads with enhanced magnetic response for MRI in brain biomedical applications. *IEEE Trans. Magn.* **2016**, *52*.
3. Portillo, M.A.; Iglesias, G.R. Magnetic nanoparticles as a redispersing additive in magnetorheological fluid. *J. Nanomater.* **2017**, *2017*, 8.
4. Cardoso, V.F.; Francesko, A.; Ribeiro, C.; Banobre-Lopez, M.; Martins, P.; Lanceros-Mendez, S. Advances in magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1700845.
5. Ghazi, N.; Chenari, H.M.; Ghodsi, F.E. Rietveld refinement, morphology analysis, optical and magnetic properties of magnesium-zinc ferrite nanofibers. *J. Magn. Magn. Mater.* **2018**, *468*, 132–140.

6. Lisjak, D.; Mertelj, A. Anisotropic magnetic nanoparticles: A review of their properties, syntheses and potential applications. *Prog. Mater. Sci.* **2018**, *95*, 286–328.
7. Muhlberger, M.; Janko, C.; Unterweger, H.; Schreiber, E.; Band, J.; Lehmann, C.; Dudziak, D.; Lee, G.; Alexiou, C.; Tietze, R. Functionalization of T lymphocytes for magnetically controlled immune therapy: Selection of suitable superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2019**, *473*, 61–67.
8. Danilushkina, A.; Rozhina, E.; Kamaliev, R.; Fakhrullin, R. Influence of magnetic nanoparticles stabilized with polyelectrolytes on 2D and 3D cell cultures formation. *Hum. Gene Ther.* **2018**, *29*, A71.
9. Chen, K.L.; Yeh, Y.W.; Chen, J.M.; Hong, Y.J.; Huang, T.L.; Deng, Z.Y.; Wu, C.H.; Liao, S.H.; Wang, L.M. Influence of magnetoplasmonic gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Au core/shell nanoparticles on low-field nuclear magnetic resonance. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35477.
10. Wang, W.; Ma, P.X.; Dong, H.; Krause, H.J.; Zhang, Y.; Willbold, D.; Offenhaeusser, A.; Gu, Z.W. A magnetic nanoparticles relaxation sensor for protein-protein interaction detection at ultra-low magnetic field. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *80*, 661–665.
11. Angelakeris, M. Magnetic nanoparticles: A multifunctional vehicle for modern theranostics. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2018**, *1861*, 1642–1651.
12. Winter, A.; Engels, S.; Reinhardt, L.; Wasylow, C.; Gerullis, H.; Wawroschek, F. Magnetic marking and intraoperative detection of primary draining lymph nodes in high-risk prostate cancer using superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Additional diagnostic value. *Molecules* **2017**, *22*, 2192.
13. Duran, J.D.G.; Arias, J.L.; Gallardo, V.; Delgado, A.V. Magnetic colloids as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2948–2983.
14. Patitsa, M.; Karathanou, K.; Kanaki, Z.; Tzioga, L.; Pippa, N.; Demetzos, C.; Verganelakis, D.A.; Cournia, Z.; Klinakis, A. Magnetic nanoparticles coated with polyarabic acid demonstrate enhanced drug delivery and imaging properties for cancer theranostic applications. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 775.
15. Gao, Q.; Xie, W.S.; Wang, Y.; Wang, D.; Guo, Z.H.; Gao, F.; Zhao, L.Y.; Cai, Q. A theranostic nanocomposite system based on radial mesoporous silica hybridized with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for targeted magnetic field responsive chemotherapy of breast cancer. *Rsc Adv.* **2018**, *8*, 4321–4328.
16. Moskvina, M.; Babic, M.; Reis, S.; Cruz, M.M.; Ferreira, L.P.; Carvalho, M.D.; Lima, S.A.C.; Horák, D. Biological evaluation of surface-modified magnetic nanoparticles as a platform for colon cancer cell theranostics. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *161*, 35–41.
17. Semkina, A.S.; Abakumov, M.A.; Skorikov, A.S.; Abakumova, T.O.; Melnikov, P.A.; Grinenko, N.F.; Cherepanov, S.A.; Vishnevskiy, D.A.; Naumenko, V.A.;

- Ionova, K.P.; et al. Multimodal doxorubicin loaded magnetic nanoparticles for VEGF targeted theranostics of breast cancer. *Nanomed. Nanotechnol.* **2018**, *14*, 1733–1742.
18. Vakilinezhad, M.A.; Alipour, S.; Montaseri, H. Fabrication and in vitro evaluation of magnetic PLGA nanoparticles as a potential Methotrexate delivery system for breast cancer. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *44*, 467–474.
  19. Obaidat, L.M.; Issa, B.; Haik, Y. Magnetic properties of magnetic nanoparticles for efficient hyperthermia. *Nanomaterials (Basel)* **2015**, *5*, 63–89.
  20. Balidemaj, E.; Kok, H.P.; Schooneveldt, G.; van Lier, A.; Remis, R.F.; Stalpers, L.J.A.; Westerveld, H.; Nederveen, A.J.; van den Berg, C.A.T.; Crezee, J. Hyperthermia treatment planning for cervical cancer patients based on electrical conductivity tissue properties acquired in vivo with EPT at 3 T MRI. *Int. J. Hyperth.* **2016**, *32*, 558–568.
  21. Blanco-Andujar, C.; Walter, A.; Cotin, G.; Bordeianu, C.; Mertz, D.; Felder-Flesch, D.; Begin-Colin, S. Design of iron oxide-based nanoparticles for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine (Lond)* **2016**, *11*, 1889–1910.
  22. Iglesias, G.; Delgado, A.V.; Kujda, M.; Ramos-Tejada, M.M. Magnetic hyperthermia with magnetite nanoparticles: Electrostatic and polymeric stabilization. *Colloid Polym. Sci.* **2016**, *294*, 1541–1550.
  23. Sato, L.; Umemura, M.; Mitsudo, K.; Fukumura, H.; Kim, J.H.; Hoshino, Y.; Nakashima, H.; Kioi, M.; Nakakaji, R.; Sato, M.; et al. Simultaneous hyperthermia-chemotherapy with controlled drug delivery using single-drug nanoparticles. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24629.
  24. Hedayatnasab, Z.; Abnisa, F.; Daud, W.M.A.W. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater. Des.* **2017**, *123*, 174–196.
  25. Nemati, Z.; Salili, S.M.; Alonso, J.; Ataie, A.; Das, R.; Phan, M.H.; Srikanth, H. Superparamagnetic iron oxide nanodiscs for hyperthermia therapy: Does size matter?. *J. Alloy. Compd.* **2017**, *714*, 709–714.
  26. Reyes-Ortega, F.; Delgado, A.V.; Schneider, E.K.; Fernandez, B.C.L.; Iglesias, G.R. Magnetic nanoparticles coated with a thermosensitive polymer with hyperthermia properties. *Polymers (Basel)* **2018**, *10*, 10.
  27. Vamvakidis, K.; Mourdikoudis, S.; Makridis, A.; Paulidou, E.; Angelakeris, M.; Dendrinou-Samara, C. Magnetic hyperthermia efficiency and MRI contrast sensitivity of colloidal soft/hard ferrite nanoclusters. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *511*, 101–109.
  28. Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Jones, S.K.; Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D* **2003**, *36*, R167–R181.

29. Soares, P.I.P.; Ferreira, L.M.M.; Igreja, R.; Novo, C.M.M.; Borges, J. Application of hyperthermia for cancer treatment: Recent patents review. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2012**, *7*, 64–73.
30. Alphantery, E.; Faure, S.; Seksek, O.; Guyot, F.; Chebbi, I. Chains of magnetosomes extracted from AMB-1 magnetotactic bacteria for application in alternative magnetic field cancer therapy. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6279–6296.
31. El-Boubbou, K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: Preparation, conjugation and delivery. *Nanomedicine (Lond)* **2018**, *13*, 929–952.
32. Valverde-Tercedor, C.; Montalban-Lopez, M.; Perez-Gonzalez, T.; Sanchez-Quesada, M.S.; Prozorov, T.; Pineda-Molina, E.; Fernandez-Vivas, M.A.; Rodriguez-Navarro, A.B.; Trubitsyn, D.; Bazylinski, D.A.; et al. Size control of in vitro synthesized magnetite crystals by the MamC protein of *Magnetococcus marinus* strain MC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5109–5121.
33. García Rubia, G.; Peigneux, A.; Jabalera, Y.; Puerma, J.; Oltolina, F.; Elert, K.; Colangelo, D.; Morales, J.G.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C. pH-dependent adsorption release of doxorubicin on MamC-biomimetic magnetite nanoparticles. *Langmuir* **2018**, *34*, 13713–13724.
34. Lacroix, L.M.; Malaki, R.B.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Respaud, M.; Goya, G.F.; Chaudret, B. Magnetic hyperthermia in single-domain monodisperse FeCo nanoparticles: Evidences for Stoner-Wohlfarth behavior and large losses. *J. Appl. Phys.* **2009**, *105*, 023911.
35. Carrey, J.; Mehdaoui, B.; Respaud, M. Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization. *J. Appl. Phys.* **2011**, *110*, 083921.
36. Mehdaoui, B.; Meffre, A.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Lacroix, L.M.; Gougeon, M.; Chaudret, B.; Respaud, M. Optimal size of nanoparticles for magnetic hyperthermia: A combined theoretical and experimental study. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 4573–4581.
37. Stoner, E.C.; Wohlfarth, E.P. A mechanism of magnetic hysteresis in heterogeneous alloys. *IEEE Trans. Magn.* **1991**, *27*, 3475–3518.
38. Pankhurst, Q.A.; Thanh, N.T.K.; Jones, S.K.; Dobson, J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2009**, *42*, 224001.
39. Ortega, D.; Pankhurst, Q.A. Magnetic hyperthermia. In *Nanoscience: Nanostructures through Chemistry*; O'Brien, P., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2013; Volume 1, pp. 60–88.
40. Surowiec, Z.; Miaskowski, A.; Budzynski, M. Investigation of magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Nukleonika* **2017**, *62*, 183–186.

41. Laurent, S.; Dutz, S.; Hafeli, U.O.; Mahmoudi, M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *166*, 8–23.
42. Coffey, W.T.; Crothers, D.S.F.; Kalmykov, Y.P.; Waldron, J.T. Constant-magnetic-field effect in Néel relaxation of single-domain ferromagnetic particles. *Phys. Rev. B Condens. Matter.* **1995**, *51*, 15947–15956.
43. Hergt, R.; Dutz, S.; Zeisberger, M. Validity limits of the Neel relaxation model of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 015706.
44. Bakoglidis, K.D.; Simeonidis, K.; Sakellari, D.; Stefanou, G.; Angelakeris, M. Size-Dependent mechanisms in AC magnetic hyperthermia response of iron-oxide nanoparticles. *IEEE Trans. Magn.* **2012**, *48*, 1320–1323.
45. Dutz, S.; Hergt, R. Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: Basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumour therapy. *Int. J. Hyperth.* **2013**, *29*, 790–800.
46. Dutz, S.; Hergt, R. Magnetic particle hyperthermia-a promising tumour therapy? *Nanotechnology* **2014**, *25*, 452001.
47. Guibert, C.; Dupuis, V.; Peyre, V.; Fresnais, J. Hyperthermia of magnetic nanoparticles: Experimental study of the role of aggregation *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 28148–28154.
48. Fortin, J.P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Menager, C.; Bacri, J.C.; Gazeau, F. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2628–2635.
49. Perez-Gonzalez, T.; Rodriguez-Navarro, A.; Jimenez-Lopez, C. Inorganic magnetite precipitation at 25 °C: A low-cost inorganic coprecipitation method. *J. Supercond. Nov. Magn.* **2011**, *24*, 549–557.
50. Gas, P.; Kurgan, E. Cooling effects inside water-cooled inductors for magnetic fluid hyperthermia. In Proceedings of the 2017 Progress in Applied Electrical Engineering (PAEE), Koscielisko, Poland, 25–30 June 2017. IEEE, **2017**, 8008997, 1–4.
51. Gas, P.; Miaskowski, A. Specifying the ferrofluid parameters important from the viewpoint of Magnetic Fluid Hyperthermia. In Proceedings of the 2015 Selected Problems of Electrical Engineering and Electronics (WZEE), Kielce, Poland 17–19 September 2015. IEEE, **2015**, 7394040, 1–6.
52. Wildeboer, R.R.; Southern, P.; Pankhurst, Q.A. On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2014**, *47*, 495003.
53. Muniz, F.T.L.; Miranda, M.A.R.; dos Santos, C.M.; Sasaki, J.M. The Scherrer equation and the dynamical theory of X-ray diffraction. *Acta Crystallogr. A Found. Adv.* **2016**, *A72*, 385–390.

54. Lopez-Moreno, R.; Fernandez-Vivas, A.; Valverde-Tercedor, C.; Azuaga Fortes, A.I.; Casares Atienza, S.; Rodriguez-Navarro, A.B.; Zarivach, R.; Jimenez-Lopez, C. Magnetite nanoparticles biomineralization in the presence of the magnetosome membrane protein MamC: Effect of protein aggregation and protein structure on magnetite formation. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 1620–1629.
55. Fonseca, F.C.; Goya, G.F.; Jardim, R.F.; Muccillo, R.; Carreno, N.L.V.; Longo, E.; Leite, E.R. Superparamagnetism and magnetic properties of Ni nanoparticles embedded in SiO<sub>2</sub>. *Phys. Rev. B* **2002**, *66*, 104406.
56. O'Brien, R.W.; White, L.R. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1978**, *74*, 1607–1626.
57. Nudelman, H.; Valverde-Tercedor, C.; Kolusheva, S.; Perez-Gonzalez, T.; Widdrat, M.; Grimberg, N.; Levi, H.; Nelkenbaum, O.; Davidov, G.; Faivre, D.; et al. Structure-function studies of the magnetite-biomineralizing magnetosome-associated protein MamC. *J. Struct. Biol.* **2016**, *194*, 244–252.
58. Jabalera, Y.; Casares Atienza, S.; Fernandez-Vivas, A.; Peigneux, A.; Azuaga Fortes, A.I.; Jimenez-Lopez, C. Protein conservation method affects MamC-mediated biomineralization of magnetic nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 1064–1071.



*Este artículo se ha publicado en la revista indexada en JCR: Polymers*

*(<https://doi.org/10.3390/polym12081832>)*

# **Nanoformulation Design Including MamC-Mediated Biomimetic Nanoparticles Allows the Simultaneous Application of Targeted Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia**

Ylenia Jabalera<sup>#,1</sup>, Francesca Oltolina<sup>#,1</sup>, Ana Peigneux<sup>1</sup>, Alberto Sola-Leyva<sup>2</sup>, Maria P. Carrasco-Jiménez<sup>2</sup>, Maria Prat<sup>\*,3</sup>, Concepcion Jimenez-Lopez<sup>\*,1</sup> and Guillermo R. Iglesias<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology I, University of Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale “A. Avogadro”, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy

<sup>4</sup>Department of Applied Physics, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

\*Corresponding authors

#These authors contributed equally to this work.

## **Abstract**

The design of novel nanomaterials that can be used as multifunctional platforms allowing the combination of therapies is gaining increased interest. Moreover, if this nanomaterial is intended for a targeted drug delivery, the use of several guidance methods to increase guidance efficiency is also crucial. Magnetic nanoparticles (MNPs) allow this combination of therapies and guidance strategies. In fact, MNPs can be used

simultaneously as drug nanocarriers and magnetic hyperthermia agents and, moreover, they can be guided toward the target by an external magnetic field and by their functionalization with a specific probe. However, it is difficult to find a system based on MNPs that exhibits optimal conditions as a drug nanocarrier and as a magnetic hyperthermia agent. In this work, a novel nanoformulation is proposed to be used as a multifunctional platform that also allows dual complementary guidance. This nanoformulation is based on mixtures of inorganic magnetic nanoparticles (M) that have been shown to be optimal hyperthermia agents, and biomimetic magnetic nanoparticles (BM), that have been shown to be highly efficient drug nanocarriers. The presence of the magnetosome protein MamC at the surface of BM confers novel surface properties that allow for the efficient and stable functionalization of these nanoparticles without the need of further coating, with the release of the relevant molecule being pH-dependent, improved by magnetic hyperthermia. The BM are functionalized with Doxorubicin (DOXO) as a model drug and with an antibody that allows for dual guidance based on a magnetic field and on an antibody. The present study represents a proof of concept to optimize the nanoformulation composition in order to provide the best performance in terms of the magnetic hyperthermia agent and drug nanocarrier.

## **Introduction**

The need to combine therapies to increase efficiency is gaining relevance, especially in the context of cancer [1,2]. Not only is drug combination necessary, but therapy combination too, ideally localized at the target site and possibly by using the same platform for a simultaneous application of several therapies. In the context of cancer, this is especially relevant because all the most consolidated therapies (surgery, radiotherapy, chemotherapy, and photodynamic therapy) are not fully effective, especially chemo- and radiotherapy, which provoke severe side effects due to their lack of specificity [3]. For this reason, alternative strategies are becoming attractive, and among them, magnetic hyperthermia (MH) is one of the most promising [4]. MH is the result of the application of an alternating magnetic field (AMF) to hyperthermia agents (such as iron oxide or gold nanoparticles) that, as a result, generate local heat at the tumor site. Such a local temperature increase induces the apoptosis or necrosis of tumor cells, which are more sensitive than normal healthy cells to the increased temperature of about 43 °C [5,6]. The other advantage of this approach is that MH can penetrate tissues in depth. Therefore,

MH is a strong candidate to be used along with other more consolidated therapies, such as chemotherapy, to generate a synergy between the two treatments that increases the efficiency of the individual ones.

However, in order to be able to combine both therapies, a magnetic hyperthermia agent must be, at the same time, an efficient drug nanocarrier. To better perform its activity, the nanocarrier/hyperthermia agent should be specifically directed and concentrated at the target site, and this could be reached both by magnetic guidance and by a specific probe recognizing a tumor marker. Magnetic nanoparticles could be a suitable system for this goal. In fact, their magnetic properties and their ability to be functionalized by different molecules, including antibodies or enzymes, make them strong candidates to be used as a multifunctional platform for drug delivery and magnetic hyperthermia [7–9]. Nevertheless, it is difficult to find a magnetic nanoparticle that is efficient for both therapies, in addition to the obvious characteristics of being biocompatible and biodegradable. On one hand, the ideal magnetic nanoparticles should be superparamagnetic, *i.e.*, behave as paramagnetic in the absence of an external magnetic field to avoid aggregation, but displaying a high magnetic susceptibility once an external magnetic field is applied. To increase the efficiency of the magnetic guidance, they should have an optimized magnetic moment per particle. These characteristics would allow the nanoparticle to respond to both a continuous gradient magnetic field used to guide them to the target, and to an alternating magnetic field, used for magnetic hyperthermia. In order to deliver nanoparticles with these characteristics, their composition, size, and shape should be optimized. For instance, magnetite nanoparticles with sizes within the range of 4–27 nm [10–12] and cuboctahedral versus cubic have been demonstrated to show the highest specific absorption rate (SAR) values for magnetic hyperthermia [13]. On the other hand, and to be able to combine magnetic hyperthermia with targeted drug delivery, the magnetic nanoparticles should be easily functionalized with different moieties, *e.g.*, a drug and a probe, and to this goal, they should provide a chemical surface pattern mediating the binding for these molecules.

Inorganic magnetic nanoparticles (M) have proven to be excellent hyperthermia agents because of their small size (<30 nm), which optimizes their magnetic hyperthermia response by both magnetic Néel and Brownian relaxation, and by hysteresis losses [14,15]. However, this small size also compromises their magnetic moment per particle, and therefore the efficiency of the magnetic guidance [16]. Moreover, these MNPs need

the addition of different functional groups to be functionalized with the relevant molecule, a process that shields the already not optimal magnetic moment per particle [17,18]. Therefore, inorganic MNPs could be good magnetic hyperthermia agents, but they are not optimal drug nanocarriers.

On contrary, MamC-mediated biomimetic magnetic nanoparticles (BM), which are synthesized in presence of the MamC magnetosome membrane associated protein from *Magnetococcus marinus* MC-1, display different properties compared to those of MNPs. This is a consequence of the mediation of the MamC protein in the nucleation and growth of the magnetite crystal, and of its presence of up to 5% at the surface of the nanocrystal [19,20]. Because of the unique template exerted by the protein, the nucleation of the biomimetic magnetic nanoparticles is controlled by MamC, resulting in BM that are larger than most M (average size of BM in the range 30–40 nm), and display a larger magnetic moment per particle while being superparamagnetic. Another unique feature of these BM is their surface properties. The presence of MamC attached to the surface of the BM provides functional groups to the nanoparticle without the need of additional coating and, also shifts the isoelectric point from  $\sim 7$  for M to 4.4 for the BM [20]. This is crucial in making these BM optimal drug nanocarriers for two reasons: (1) at physiological pH values, BM are able to bind positively charged molecules through electrostatic interactions, which are weakened at acidic pHs (such as those found in tumor microenvironments), allowing the release of the adsorbed molecules [20,21]; (2) thanks to these electrostatic interactions, it is possible to attach to them not only the chemotherapy drug, but also to an active targeting agent, like a monoclonal antibody (mAb), as demonstrated previously by Peigneux et al. [22]. However, although these BM are optimal drug nanocarriers, they do not display as strong a magnetic hyperthermia response as that exhibited by M [23].

As a consequence of that, a previous study by Iglesias et al. [23] explored the possibility of mixing M and BM in different proportions to come up with a nanoformulation that could be used to simultaneously combine drug delivery and the hyperthermia effect. These authors show how the combination of 75% M and 25% BM had an optimal response upon the application of an alternating magnetic field and proposed this mix as the optimum nanoformulation for the potential combination of the two therapies. However, in their study, BM were not functionalized, and therefore the

potential of this nanoformulation as a drug nanocarrier was anticipated, but not proven. In addition, in this case, only magnetic guidance was analyzed.

In the present study, we go further with this previous idea of analyzing mixtures of M (previously referred as MNP [19]) and BM (previously referred as BMNP [19]) but, in this case, BM are functionalized with the model chemotherapy agent Doxorubicin (DOXO; here referred to as binary BM, *i.e.*, BBM) and a monoclonal antibody (here referred as ternary BM, *i.e.*, TBM). Therefore, the potential use of the multifunctional nanoformulation, which is susceptible of a dual guidance to the target site (mediated by the magnetic field and the monoclonal antibody) and can combine two therapeutic approaches (*i.e.*, drug delivery and hyperthermia), is studied as a proof of concept for future *in vivo* applications.

## Experimental Section

### M and BM Synthesis

MamC expression and purification were performed as previously described by Valverde-Tercedor et al. [19]. *Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies: Invitrogen, Grand Island, NY, USA) was transformed with the plasmid pTrcHis-TOPO (Life Technologies: Invitrogen) used as a vector of the MamC protein-coding gene (Mmc1\_2265) coupled to a hexahistidine tag coding sequence at its 5' terminus. These cells were grown at 37 °C and MamC overproduction was induced with isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG). Once expressed, the purification of the protein was carried out under denaturing conditions by fast protein liquid chromatography (FPLC, GE Healthcare) by using immobilized metal affinity chromatography (IMAC, GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Lastly, dialysis was performed for a gradual removal of urea, which allowed MamC to refold progressively, and the purity was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis.

The synthesis of pure magnetic nanoparticles (here referred as M) was carried out at 25 °C and 1 atm total pressure using the following master solution:  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  (2.78 mM),  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3.5 mM/3.5 mM),  $\text{FeCl}_3$  (5.56 mM), and pH 9, elaborated from oxygen-free stock concentrated solutions of the individual compounds (protocol described in [19,24]). The biomimetic nanoparticles (BM) were obtained by adding the

purified MamC protein (at a final concentration of 10 µg/mL) to the solution used for M. All experiments were done under anaerobic conditions inside an anaerobic Coy chamber (96% N<sub>2</sub>/4% H<sub>2</sub>, Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA). Samples were incubated for 30 days before the solids were magnetically decanted and washed three times with deoxygenated Milli-Q water. The magnetic particles were kept in water inside the Coy chamber until further use.

### Functionalization of the BM

BM were functionalized with AR-3 mAbs (IgG1), which was raised against the A431 epidermoid carcinoma (ATCC<sup>®</sup> CRL-1555<sup>™</sup>, Manassas, Virginia, US), which was used as immunogen. The mAb was selected for its reactivity against carcinoma cells, including those of the gastro-enteric tract, and indeed, it lacks reactivity with normal epithelial cells, as well as with cells of mesenchymal origin, such as fibroblasts, blood cells and sarcomas [25]. The antigen recognized by AR-3 mAb, which because of its specificity for carcinomas was called CAR-3, is a mucin-like molecule of approximately 400 kDa molecular weight and the epitope was found to be of carbohydrate nature, since it is sensitive to the metaperiodate treatment, but not to proteolytic enzymes [26]. BM were functionalized also with the chemotherapeutic agent DOXO (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). In both cases, functionalization was carried out as described by Iafisco et al. [27]. Briefly, 5 mg of BM were mixed with 1 mg/mL of mAb or DOXO suspended in HEPES buffer at pH 7.4 for 24 h, inside hermetically closed bottles to avoid magnetite oxidation at 25 °C, in rotation on a wheel. The DOXO-BM complexes were the so-called binary nanoparticles (BBM). Ternary nanoassemblies (mAb-DOXO-BM, here called TBM) were produced with the same protocol in two steps, coupling first the mAb and then DOXO. At the end of each incubation, particles were collected with a magnet and washed three times with HEPES buffer. Supernatants and the washings were mixed and the amounts of mAb and DOXO measured by UV-Vis spectroscopy ( $\lambda = 280$  and 490 nm, respectively) were detracted from the amount initially incubated and similarly measured, to quantify the amounts of bound ligands. Functionalization efficiency was  $70 \pm 10\%$  for DOXO and  $40 \pm 10\%$  for AR-3 mAb corresponding to about 140 µg of DOXO and 80 µg of mAb/mg BM.

## Nanoparticles Characterization

The morphology and size of the synthesized nanoparticles were analyzed by transmission electron microscopy (TEM Philips Model CM20, Eindhoven, The Netherlands) equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer (EDAX). The size of the particles was analyzed by using ImageJ 1.47 software. The  $\zeta$  potential, hydrodynamic radius and hysteresis cycles were measured as already described by García-Rubia et al. [20] using Malvern Zetasizer software (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) and a superconducting quantum interference device (SQUID) 5 T magnetometer (Quantum Design MPMS XL, San Diego, CA, US), respectively. Powder X-ray diffraction (XRD) analysis was performed with an Xpert Pro X-ray diffractometer (PANalytical, Almelo, The Netherlands) by using the Cu K $\alpha$  radiation, 20°–60° in 2 $\theta$  (0.01°; 3 s). Fourier-transform infrared (FT-IR) analysis was carried out using a FT-IR spectrometer (model 6600, Jasco, Tokio, Japan) equipped with an attenuated total reflection (ATR) diamond crystal window (ATR ProOne). The surface of the sample was pressed against the ATR window and infrared spectra were acquired. A total of 100 scans were collected in the wavenumber range from 4000 to 400 cm<sup>-1</sup>, at 2 cm<sup>-1</sup> of resolution.

## Stability Evaluation

The colloidal stability of the samples was determined optically by means of recording the sedimentation process of the different nanosystems. The time evolution of the phase separation line between the particles and medium of each sample were photographed at certain intervals. Afterwards, the height and volume of each phase were determined through image processing and analyzed. A volume of 0.5 mL 30 mg/mL of these different nanoparticles was shaken in a vortex for 1 min (time zero of the experiment) and allowed to sediment. For each experiment, the end of the sedimentation time was considered when a pellet formed at the bottom of the tube.

## Hyperthermia Experiments

A current AC generator was used to perform the hyperthermia experiments. The setup consists of induction heating coils made by 4 turns of water-cooled copper, a power supply, and a chiller to maintain the temperature of the coil. Four frequencies, namely 143, 163, 205, and 273 kHz were selected, with a fixed magnetic field intensity of 12.5

kA/m, measured at the center of the coil, with an AC magnetic probe (NanoScience Laboratories Ltd., Newcastle, UK).

All samples were prepared in plastic 1.5 Eppendorf tubes, with a volume of 0.5 mL and a concentration of 30 mg/mL. Four types of dispersed systems were evaluated, namely those based on pure magnetic nanoparticles M, pure TBM, and mixtures containing 25% TBM + 75% M (25 TBM + 75 M) and 60% TBM + 40% M (60 TBM + 40 M).

For the measurement of hyperthermia, all samples were previously pre-thermized at 37 °C. The temperature increase as a function of time was measured with a fiber optic thermometer (Optocon AG, Dresden, Germany), and the specific absorption rate (SAR) and intrinsic loss power (ILP) of the different systems were calculated [28,29] using Equations (1) and (2):

$$SAR = \left( \frac{C \cdot V_s}{m} \right) \frac{dT}{dt} \quad (1)$$

$$ILP = \frac{SAR}{fH_0^2} \quad (2)$$

where  $C$  is the specific heat capacity of the sample ( $C_{water} = 4185 \text{ J/g/K}$ ),  $V_s$  is the sample volume (0.5 mL in the reported experiments), and  $m$  is the mass of solids in the sample (15 mg).

### **Nanoformulation as Nanocarriers: Effect of Hyperthermia on DOXO Release**

The effect of hyperthermia on the DOXO release from the nanoformulation that yielded better hyperthermia results was evaluated as described by Peigneux et al. [22]. Briefly, an alternating magnetic field ( $f = 130 \text{ kHz}$ ,  $H_0 = 20 \text{ kA/m}$ ) was applied to the suspension of the 25 TBM + 75 M nanoassemblies prepared at pH 7.4 and 5.0, and DOXO release was measured at different time points up to 75 min. At specific intervals, the nanoassemblies were separated from the supernatant using a magnet and the tube was refilled with fresh buffer to continue the following time points. The magnetic field strength was controlled manually to ensure a constant temperature of  $43.0 \pm 0.5 \text{ °C}$ .



Identical samples kept in a thermostatic bath at 43 °C were used as control. Supernatants were measured 3 times by UV-Vis spectroscopy ( $\lambda = 490$  nm).

## Cell Cultures

The HT-29 cell line (ATCC<sup>®</sup> HTB-38<sup>™</sup>, Manassas, Virginia, US), derived from a human colorectal adenocarcinoma, was maintained in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) with 2 mM l-glutamine, 1% nonessential amino acids, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were split when at 80–90% confluency.

## Cytocompatibility and Cytotoxicity of the Nanoassemblies

HT-29 cells were seeded in 96-well plates, incubated for 24 h, and then for 72 h with 150 or 300  $\mu$ g/mL of BM, M, TBM, nanoassemblies (25 BM + 75 M or 25 TBM + 75 M), and equimolar amounts of soluble DOXO coupled to the different nanoassemblies (TBM and 25 TBM + 75 M). To determine the effect of magnetic hyperthermia on cell viability, in another set of experiments, HT-29 were incubated with the maximum concentration (300  $\mu$ g/mL) of M, TBM, and the nanoassembly 25 TBM + 75 M for 24 h to allow the internalization of the nanoassemblies. After the incubation time, cells were exposed to AMF for 2 h. Finally, the viability was evaluated by the MTT colorimetric assay, as already described [30]. Briefly, 10  $\mu$ L of the MTT 5 mg/mL in phosphate buffered saline (PBS) solution was added to the plate, incubated at 37 °C for 2 h, and supernatants were removed. DMSO was added to dissolve the formazan crystals and the optical density was measured. The value obtained from the analyses of untreated cells run in parallel was taken as 100% viability and all the other values were normalized to the former. Experiments were performed in triplicates.

## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.4.2 for Windows, GraphPad Software (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA). For nanoparticles size characterization, size distribution curves and ANOVA statistical analyses were determined from measurements performed on 1000 particles. Averages were considered significantly different if  $p < 0.05$ . For *in vitro* biological analysis, data represent means  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate, and

statistical analyses were carried on using two-way ANOVA, with a Bonferroni's post-test for grouped analysis. Statistical differences between the treatments were considered significant when  $p$  values were  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*), and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)).

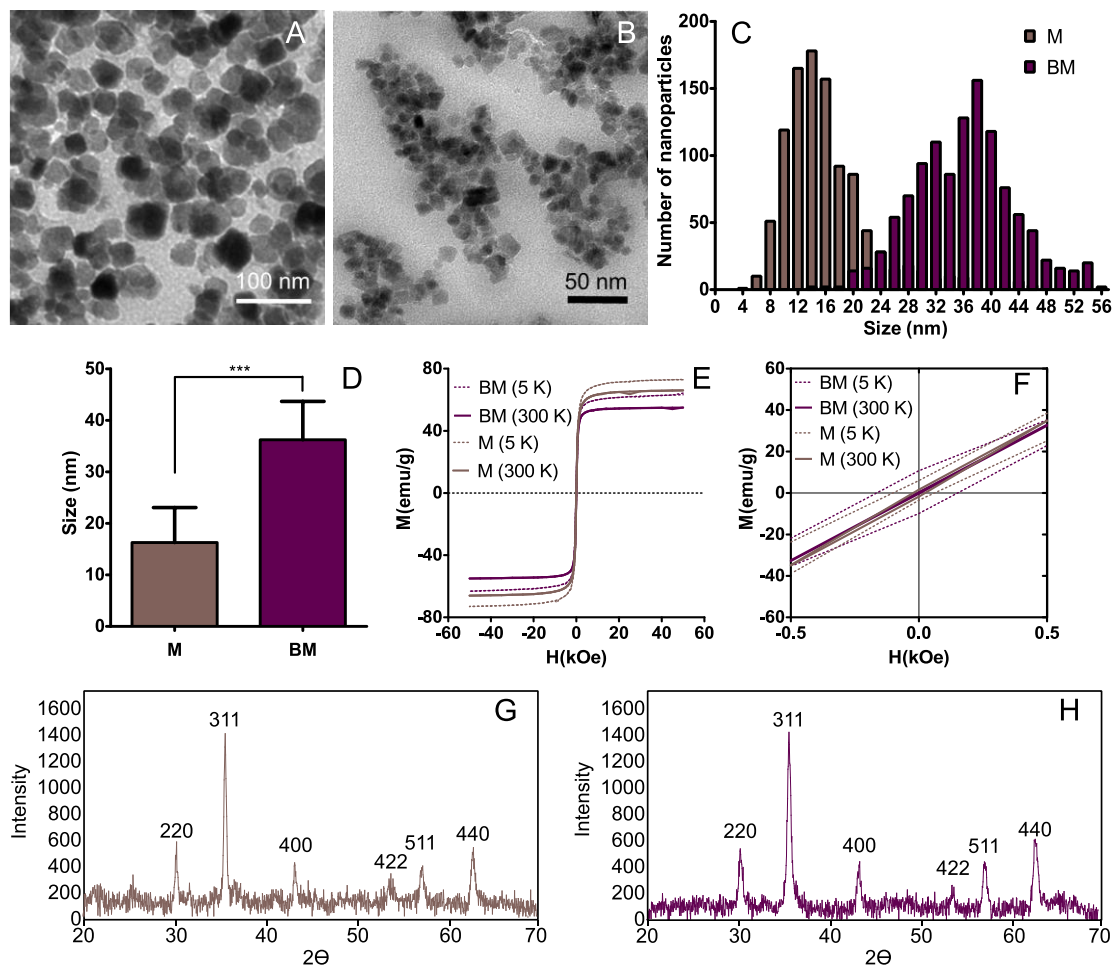
## Results and Discussion

### Nanoparticle Characterization

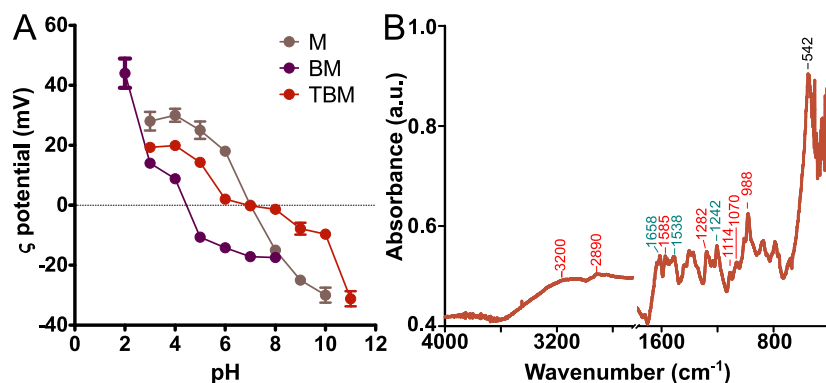
As shown in Figure 1A,B, M display poorly faceted crystals faces, while BM show well defined faces with different morphologies (square, rhombic, or rectangular, among others). The size of M was up to 30 nm, according to the size distribution histogram obtained from the TEM images measurements (Figure 1C,D), with an average crystal size of  $15 \pm 8$  nm. On the contrary, BM show a size range from 10 to 60 nm, with an average size of  $36 \pm 8$  nm. Statistical analysis (ANOVA test) reveals that the size differences between the two types of nanoparticles are statistically significant (at  $\alpha < 0.05$ ), with a probability of  $7.8 \times 10^{-9}$ . The XRD patterns of M (Figure 1G) and BM (Figure 1H) demonstrate the good crystallinity of both types of magnetite nanoparticles, with the diffractions being peaks coincident with those of the reference magnetite. In fact, the diffraction peak with the highest intensity corresponds to the 311 magnetite reflection. The hysteresis loop of M and BM show the ferromagnetic character of these nanoparticles at 5 K and with no external field applied, showing remaining coercivity. However, at 300 K, the nanoparticles display zero coercivity in the absence of an external magnetic field, revealing their superparamagnetic behaviour (Figure 1E,F). The magnetization saturation of M and BM at 300 K is 63 emu/g and 55 emu/g, respectively, with BM showing less magnetization saturation because of the presence of the 5% of the MamC in the latter, as previously showed by García-Rubia et al. [20].

The  $\zeta$  potential values for BM and M reveal that both nanoparticles display different charge at physiological pH (Figure 2A). While M are neutral, BM are negatively charged ( $-20$  mV), which facilitates their functionalization with the relevant molecule at this physiological pH value mediated by electrostatic interactions. The BM used in this work were functionalized with DOXO and with the AR-3 mAb. This antibody, an IgG1, was chosen as a ligand model, since it reacts with a biomarker specifically expressed on different types of carcinomas, in particular those of the gastro-enteric tract, and in particular with a carbohydrate epitope present on a high molecular weight mucin [25,26].

The ability of these nanoparticles to be easily functionalized is conferred by the MamC protein. As shown in Figure 2A, at the pH value at which BM functionalization was carried out (pH value of 7.4), BM had a  $\zeta$ -potential value of about  $-20$  mV, and therefore they were negatively charged. At this pH value, the monoclonal antibody is slightly positively charged and DOXO is also positively charged due to  $-\text{NH}_3^+$  groups exposed in aqueous solution, thus allowing the coupling of these two molecules to the BM based on electrostatic interactions. Identical behaviour was shown when these BM were functionalized with the monoclonal antibody DO-24 [22]. This is the great advantage of these BMs, which do not need further coating with other molecules that could alter the nanoparticles or their performance in biological systems, as previously shown by the covering of nanoparticles with AMPTES [31]. The coupling of DOXO and of the antibody to the BMs was extensively characterized by Peigneux et al. [22] (both the kinetics and thermodynamics of the coupling process and the structure and functionality of the relevant molecules after coupling), which shows that, under the conditions of the experiment,  $\sim 50\%$  of the initial mAb in solution were first adsorbed on the BM and, after further coupling with DOXO,  $\sim 80\%$  of the initial DOXO in solution was adsorbed at the plateau. As shown in Figure 2, the coupling of BM with DOXO and with the AR-3 mAb changes the surface properties of the nanoformulation. In fact, the  $\zeta$  potential values for TBM are similar to those exposed by M nanoparticles, *i.e.*, neutral at physiological pH. This result indicates that the negatively charged functional groups that MamC was previously exposing are now masked by DOXO and by AR-3 mAb. This functionalization is further confirmed by FT-IR analysis. The FT-IR spectrum of TBM (Figure 2B) shows absorption peaks characteristics of bonds present in the different elements that constitute the TBM nanoparticles. The sample shows signals at 3200, 2890, 1585, 1282, 1114, 1070, and 988  $\text{cm}^{-1}$  (marked in red), which are characteristics of the DOXO molecule [32]. On the other hand, the spectra shows the relevant absorption peaks associated with the Amide I ( $1658 \text{ cm}^{-1}$ ), II ( $1538 \text{ cm}^{-1}$ ), and III ( $1242 \text{ cm}^{-1}$ ) (marked in green), characteristics of mAb [33,34]. Finally, a new peak at  $542 \text{ cm}^{-1}$  characteristic of the Fe-O bond in magnetite is observed [35].



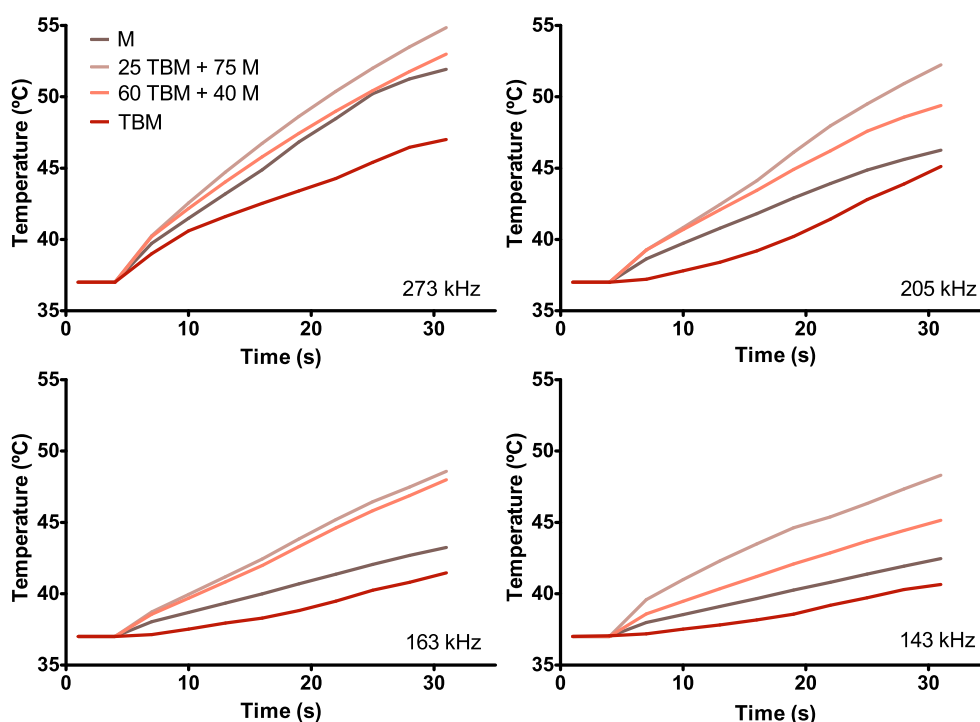
**Figure 1.** TEM images of biomimetic (A) and inorganic (B) magnetic nanoparticles. Diameter histograms of biomimetic and inorganic magnetic nanoparticles (C). Mean  $\pm$  standard deviation of nanoparticles size (D)  $p < 0.001$  (\*\*\*). Hysteresis loop of BM and M (E, F: detail). X-ray diffraction (XRD) of M (G) and BM (H).



**Figure 2.**  $\zeta$  potential of M, BM and TBM (A). FT-IR spectrum of TBM (B). The signal corresponding to different elements are marked in red (DOXO), green (AR-3 mAb) and black (magnetite).

## Magnetic Hyperthermia Responses

In terms of how these M and TBM behave upon the application of an alternating magnetic field, Figure 3 shows that they both are able to increase the temperature in a frequency dependent way, the higher increase corresponding to the higher frequencies. Comparing the data of the TBM from the present paper to those of BM already published by Peigneux et al. [22] and Iglesias et al., [23], it can be concluded that the presence of the molecules adsorbed to the BM does not interfere significantly with the ability of TBM to respond to an alternating magnetic field. However, data in Figure 3 and Table 1 show that M display a better behaviour compared to BM and TBM in producing hyperthermia [23], which might be depended on their higher relation in magnetic/non-magnetic material compared to BM and TBM, as also observed for other encapsulated magnetic nanoparticles [6,36].



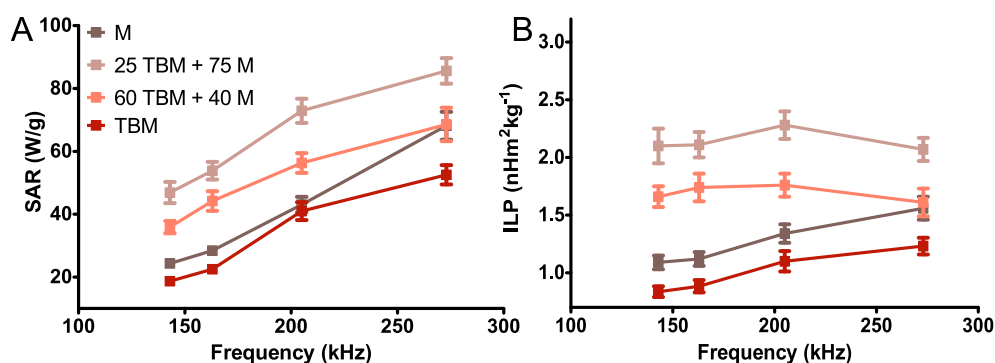
**Figure 3.** Time evolution of the temperature of the different nanoparticles suspensions, for different frequencies. Magnetic field strength:  $H_0 = 12.5$  kA/m. Sample volume 0.5 mL; particle concentration: 30 mg/mL.

Interestingly, when these two systems are combined, the temperature increase is higher compared to that of the endmembers, being the nanoformulation 25 TBM + 75 M the one that induce the higher temperature increase. In all cases, the temperature needed

to induce apoptosis in tumor cells (42–46 °C [7,37]) is reached in a few seconds (~30 s) under an alternating magnetic field of 12.5 kA/m. The SAR and ILP values are represented in Figure 4 (Table 1) and are in agreement with the results obtained in [23].

**Table 1.** Summary of SAR and ILP calculations at different frequencies with a fixed magnetic field intensity of 12.5 kA/m.

System	Frequency $f$ [kHz]	SAR [W/g]	Slope $dT/dt$ [°C/s]	ILP [nHm <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> ]
M	273 ± 5	68 ± 4	0.50 ± 0.02	1.6 ± 0.1
	205 ± 5	47 ± 2	0.345 ± 0.009	1.34 ± 0.08
	163 ± 5	28 ± 1	0.202 ± 0.005	1.12 ± 0.06
	143 ± 5	24 ± 1	0.175 ± 0.004	1.09 ± 0.06
25 TBM + 75 M	273 ± 5	86 ± 4	0.58 ± 0.02	2.1 ± 0.1
	205 ± 5	73 ± 4	0.50 ± 0.01	2.3 ± 0.1
	163 ± 5	54 ± 3	0.379 ± 0.009	2.1 ± 0.1
	143 ± 5	47 ± 3	0.36 ± 0.02	2.1 ± 0.2
60 TBM + 40 M	273 ± 5	69 ± 5	0.51 ± 0.02	1.6 ± 0.1
	205 ± 5	56 ± 3	0.41 ± 0.01	1.8 ± 0.1
	163 ± 5	44 ± 3	0.350 ± 0.009	1.7 ± 0.1
	143 ± 5	36 ± 2	0.262 ± 0.007	1.66 ± 0.09
TBM	273 ± 5	53 ± 3	0.37 ± 0.02	1.23 ± 0.07
	205 ± 5	41 ± 2	0.27 ± 0.02	1.17 ± 0.08
	163 ± 5	22 ± 1	0.162 ± 0.009	0.88 ± 0.05
	143 ± 5	19 ± 1	0.134 ± 0.007	0.84 ± 0.04

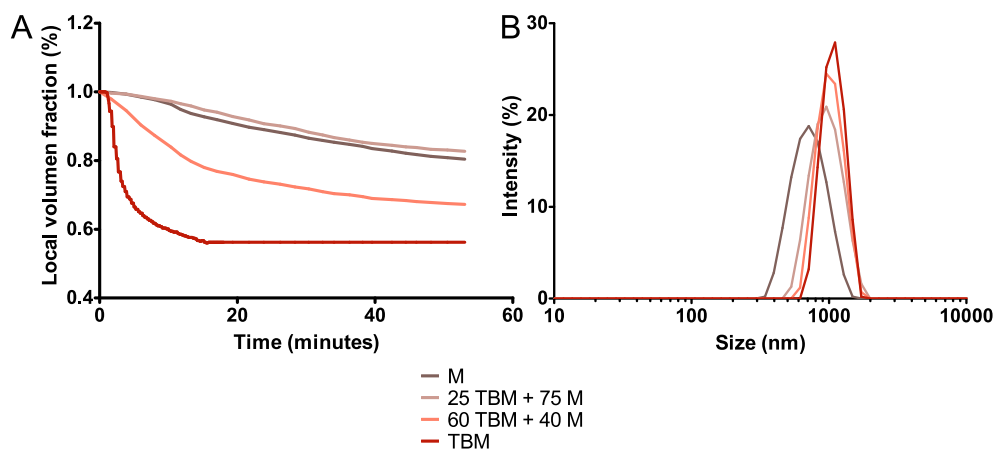


**Figure 4.** Frequency dependence of SAR (A) and ILP (B) for the different nanoparticles suspension. Magnetic field strength:  $H_0 = 12.5$  kA/m; particle concentration: 30 mg/mL.

### Colloidal Stability

Colloidal stability against agglomeration and sedimentation is one of the main requirements for biomedical applications of nanoparticles, this stability being influenced by different factors such as volume fraction, size distribution and temperature [38]. In general, to avoid aggregation and precipitation, the nanoparticles need to be further coated with a long chain polymer. This coating is not necessary in our BM nanoparticles due to the presence of MamC. However, the larger sizes of BM and TBM compared to that of M could affect their colloidal stability. The colloidal stability analysis shown in Figure 5A (Figure S1) reveals that the 25 TBM + 75 M sample shows the highest stability, similar to that exhibited by M, followed in decreasing order by 60 TBM + 40 M and TBM samples. This fact could probably be the result of a stabilizing effect mediated by the interaction of the smaller M size with the TBM coating [23]. Smaller M nanoparticles could intercalate within the TBM nanoassemblies and potentiate the electrostatic repulsion being both negatively charged at physiological pH values (pH = 7.4, M  $-7.5$  mV and TBM  $-1.4$  mV). The smaller the amount of M, the lower this electrostatic repulsion is and the slight charge of TBM at physiological pH values may not be enough to force electrostatic repulsion between nanoassemblies, with TBM thus being prone to agglomeration. These results are in agreement with the hydrodynamic radius data (Figure 5B). Dynamic light scattering (DLS) analysis show that the hydrodynamic diameters of the M, 25 TBM + 75 M, 60 TBM + 40 M and TBM are of  $700 \pm 100$  nm,  $900 \pm 100$  nm,  $1200 \pm 100$  nm, and  $1300 \pm 100$  nm, respectively. The polydispersity index (PDI) of these samples are  $0.249 \pm 0.004$ ,  $0.214 \pm 0.008$ ,  $0.283 \pm 0.001$ , and  $0.285 \pm 0.002$ , respectively.

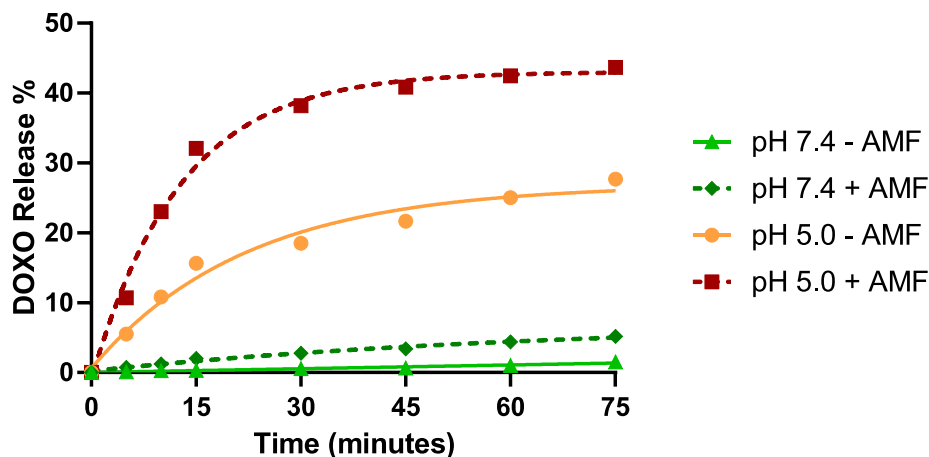
Previous studies have demonstrated that M display better magnetic hyperthermia response than BM and TBM (as shown in Figure 3 and Table 1), due to the difficulty for rotation conditioned by the MamC protein coating and their larger size [20,23,39]. However, the combination of M and TBM yielded the highest values for the hyperthermia analyses. In fact, the maximum SAR and ILP values were obtained by 25 TBM + 75 M system, followed by 60 TBM + 40 M, M and TBM (Table 1, Figure 4). These increased SAR and ILP values could be explained by the higher colloidal stability of the 25 TBM + 75 M system compared to that of the 60 TBM + 40 M (Figure 5), since aggregation negatively affects the rotation of the nanoparticles under the influence of the AMF, and thus the temperature rise. Moreover, suspensions of nanoparticles with broad size distributions have been proposed to yield an optimized magnetic hyperthermia response, since, in this case, the probability that a percentage of the nanoparticles in the system are always rotating in response to a given AMF is maximized [28]. This would apply to our mixed system, which combines magnetic nanoparticles with sizes up to 70 nm, showing a broader size distribution compared to that of the end members (up to 30 nm in M and up to 70 nm in TBM; Figure 1). In consequence, a higher percentage of the nanoparticles are likely to be affected by the influence of the magnetic field in the mixture compared to that in the end members, thus resulting in a more efficient temperature rise produced by the former.



**Figure 5.** Colloidal stability of M, 25 TBM + 75 M and 60 TBM + 40 M. Height normalized to its initial volume value as a function of time (A). Hydrodynamic size in intensity distribution for the different formulations (B).



## Nanoformulation as DOXO Nanocarrier. Synergy of Magnetic Hyperthermia and of pH Decrease in the Drug Release



**Figure 6.** DOXO release percentage as a function of time measured with and without (AMF) at different pHs (7.4 and 5.0). The vertical error bars are smaller than the symbol.

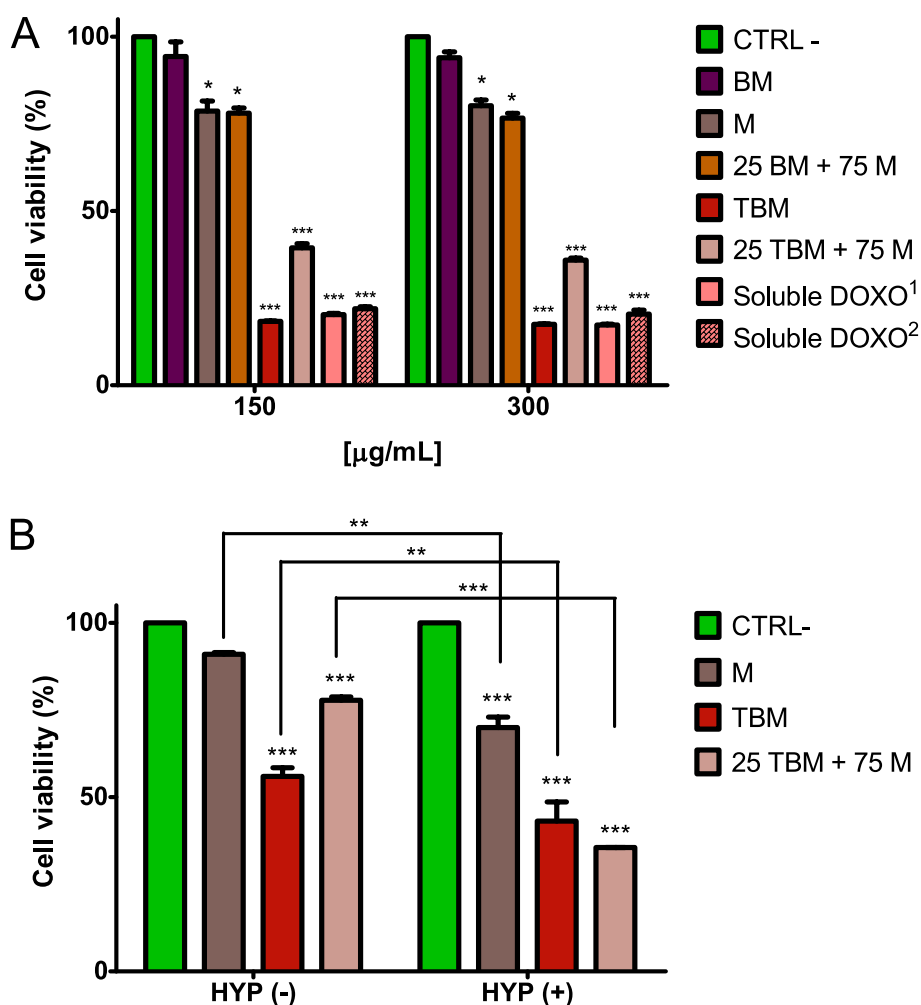
When the mixture of 25 TBM + 75M was incubated up to 75 min at a pH value of 7.4 (physiological pH value), less than 2% of the adsorbed DOXO was released from TBM (Figure 6), thus indicating the stability of the nanoformulation at physiological pH values. However, when the nanoformulation was incubated in an acidic environment mimicking the one in the endosomal/lysosomal compartment (pH 5.0) the release of DOXO increased to more than 25%, and this value was further increased to 44% when an AMF treatment ( $H_0 = 20$  kA/m,  $f = 130$  kHz) for 30 min was applied. This synergy between acidic pH and AMF on the release of the DOXO coupled to MamC-mediated BM was previously reported by Peigneux et al. [22]. These authors showed that the electrostatic bond, which at higher pH values kept DOXO bound to the surface of the nanoparticles, weakens as BM approach their *iep* (4.4), thus triggering DOXO release. Following application of the AMF, the kinetics of DOXO release is probably faster because of the heating of the BM surface [22]. However, this heating is not enough to break the electrostatic bond that keeps DOXO attached to the nanoparticle at physiological pH values (DOXO release increases from 2% to 5% after the application of AMF), while, at acidic pH values, it is enough to break the electrostatic bond once the BM surface is no longer so negative. The enhancing effect of drug release induced by magnetic hyperthermia was pointed out by other authors, using different drugs and magnetic nanocarriers [8,40,41]. This synergy further confirms our hypothesis that the

effectiveness of the treatment could be increased by combining the two therapies of drug delivery and hyperthermia by using this multifunctional nanoformulation, which moreover allows a dual tumor targeting (magnetic field and monoclonal antibody).

### Cytotoxicity Evaluation

The toxic activity of the different nanoformulations (25 BM + 75 M and 25 TBM + 75 M), and their respective components, were assessed in an MTT assay carried out on the colon carcinoma HT-29 cell line, which express the AR-3 mAb-defined biomarker, after 72 h of treatment. Soluble DOXO was used at the same concentrations as that contained in the nanoformulations, as positive control. Figure 7A shows the cell viability compared to that of the untreated controls (CTRL-). As previously shown by our groups [20,22,30,42], BM are cytocompatible. Indeed, both M and DOXO-free 25 BM + 75 M nanoformulations display low cytotoxicity, and in all cases cell viability is above 80%, which is considered the cut-off indicated by ISO 10993-5:2009 [43]. By contrast, TBM and the 25 TBM + 75 M mixture display a significant toxicity. In particular, for higher doses of DOXO (DOXO<sup>1</sup>), as in the case of TBM, no differences were observed in respect to soluble DOXO, while for lower doses of DOXO (around ¼), as in the case of 25 TBM + 75 M, the soluble DOXO (DOXO<sup>2</sup>) was more efficient than the DOXO coupled to TBM. Similar findings have already been reported, both for MNPs [22,44] and for other functionalized inorganic NPs [27,45], and are explained by the fact that soluble DOXO can more easily diffuse through the cell membrane.

When cells were exposed to AMF for 2 h after 24 h of incubation with M, TBM, and DOXO nanoassemblies (25 TBM + 75 M), it was observed that, under all experimental conditions, the application of AMF significantly reduced cell viability in respect to control cells incubated in the absence of magnetic nanoparticles. Moreover, despite the fact that TBM has a higher DOXO load than the 25 TBM + 75 M nanoformulation, the decrease in cell viability was more evident when cells were incubated with the latter formulation, an effect that may be due to the higher hyperthermia caused by 25 TBM + 75 M nanoformulation (Figure 7B). These data suggest that a significant level of cytotoxicity can be also reached or even improved with a lower amount of drug by using a mixture of magnetic nanoparticles that increases the hyperthermia response.



**Figure 7.** Cytotoxicity of the differentially functionalized nanoassemblies on HT-29 cells measured in MTT assay after 72 h without AMF (**A**) and during 24 h with AMF (**B**). Soluble DOXO<sup>1</sup> (36 µg/mL) corresponds to the equimolar amount of drug loaded on TBM sample. Soluble DOXO<sup>2</sup> (9 µg/mL) corresponds to the equimolar amount of drug loaded on 25 TBM + 75 M sample. Control cells (CTRL-) not incubated with nanoparticles or DOXO were taken as reference value (100%) of viable cells to which refer the values of treated cells.  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)

## Conclusions

Results from the present study show that the nanoformulation here proposed, integrated by a combination of two different types of magnetic nanoparticles, one inorganic with an average size of ~15 nm, and the other biomimetic (mediated by the magnetosome associated protein MamC) with an average size of ~36 nm, can be used as a multifunctional platform for a combined therapy. Indeed, the inorganic nanoparticles

show good potential as magnetic hyperthermia agents, while the biomimetic nanoparticles are better suitable as nanocarrier, being able to be functionalized with a drug and a targeting probe by electrostatic interaction, being the release of the drug pH dependent. Both particles are superparamagnetic and are able to respond to a continuous gradient field used for guiding them at the target site. The mixture of the two types of nanoparticles overcome the already good potential demonstrated for the pure end members, in terms of colloidal stability and magnetic hyperthermia response. Moreover, it allows a synergy between drug delivery and magnetic hyperthermia that increases the release of the relevant drug at acidic conditions mimicking tumor sites. Thus, this multifunctional combined platform could reach the target site by the application of dual guidance (external magnetic field and active targeting antibody), and could act as an anti-tumor agent in a bimodal way: by hyperthermia upon the application of an alternated magnetic field and by carrying and releasing the drug in pH- and temperature-dependent manners. Data from the present study may help in optimizing new treatments in which cytotoxicity is raised not by increasing the dose of the chemotherapeutic agent, but by the simultaneous use of magnetic hyperthermia.

## **Acknowledgments**

G.R.I. wish to thank project RYC-2014-6901 (MINECO, Spain), Programa Operativo FEDER 2014–2020 (A1-FQM-341-UGR18, C-FQM-497-UGR18) Junta de Andalucía. C.J.-L. wants to thank projects CGL2016-76723 from the Ministerio de Economía y Competitividad from Spain and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and Programa Operativo FEDER 2014–2020 (A-BIO-376-UGR18) Junta de Andalucía. M.P. was supported by Progetto di Ricerca Fondi di Ateneo per la Ricerca—FAR 2017 “Development of innovative biological materials for the functional regeneration of cardiac tissue models”. Y.J. wants to acknowledge a FPU2016 grant (ref. FPU16\_04580) from the Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte y Competitividad (Spain). F.O. has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement N° 754446 and UGR Research and Knowledge Transfer Found—Athenea3i. A.S.-L. is funded by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (PRE2018-0854409). Thanks go to the Scientific Instrumentation Center (CIC) personnel of the University of Granada for technical assistance with the TEM.

## References

1. Yagawa, Y.; Tanigawa, K.; Kobayashi, Y.; Yamamoto, M. Cancer immunity and therapy using hyperthermia with immunotherapy, radiotherapy, chemotherapy, and surgery. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2017**, *3*, 218.
2. Phung, D.C.; Nguyen, H.T.; Phuong Tran, T.T.; Jin, S.G.; Yong, C.S.; Truong, D.H.; Tran, T.H.; Kim, J.O. Combined hyperthermia and chemotherapy as a synergistic anticancer treatment. *J. Pharm. Investig.* 2019, *49*, 519–526.
3. Garanina, A.S.; Naumenko, V.A.; Nikitin, A.A.; Myrovali, E.; Petukhova, A.Y.; Klimyuk, S. V.; Nalench, Y.A.; Ilyasov, A.R.; Vodopyanov, S.S.; Erofeev, A.S.; et al. Temperature-controlled magnetic nanoparticles hyperthermia inhibits primary tumor growth and metastases dissemination. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2020**, *25*, 102171.
4. Liu, X.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhu, W.; Li, G.; Ma, X.; Zhang, Y.; Chen, S.; Tiwari, S.; Shi, K.; et al. Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. *Theranostics* **2020**, *10*, 3793–3815, 3793-3815.
5. Kang, J.K.; Kim, J.C.; Shin, Y.; Han, S.M.; Won, W.R.; Her, J.; Park, J.Y.; Oh, K.T. Principles and applications of nanomaterial-based hyperthermia in cancer therapy. *Arch. Pharm. Res.* 2020, *43*, 46–57.
6. Häring, M.; Schiller, J.; Mayr, J.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; Díaz, D. Magnetic Gel Composites for Hyperthermia Cancer Therapy. *Gels* **2015**, *1*, 135–161.
7. Reddy, L.H.; Arias, J.L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* 2012, *112*, 5818–5878.
8. Iglesias, G.R.; Reyes-Ortega, F.; Fernandez, B.L.C.; Delgado, Á. V. Hyperthermia-triggered gemcitabine release from polymer-coated magnetite nanoparticles. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*, 269.
9. Husain, Q. Magnetic nanoparticles as a tool for the immobilization/stabilization of hydrolases and their applications: An overview. *Appl. Chem.* **2016**, *6*, 1585–1606.
10. Mehdaoui, B.; Meffre, A.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Lacroix, L.-M.; Gougeon, M.; Chaudret, B.; Respaud, M. Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 4573–4581.
11. Mohapatra, J.; Zeng, F.; Elkins, K.; Xing, M.; Ghimire, M.; Yoon, S.; Mishra, S.R.; Liu, J.P. Size-dependent magnetic and inductive heating properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Scaling laws across the superparamagnetic size. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 12879–12887.
12. Briceno, S.; Silva, P.; Bramer-Escamilla, W.; Zabala, J.; Alcala, O.; Guari, Y.;

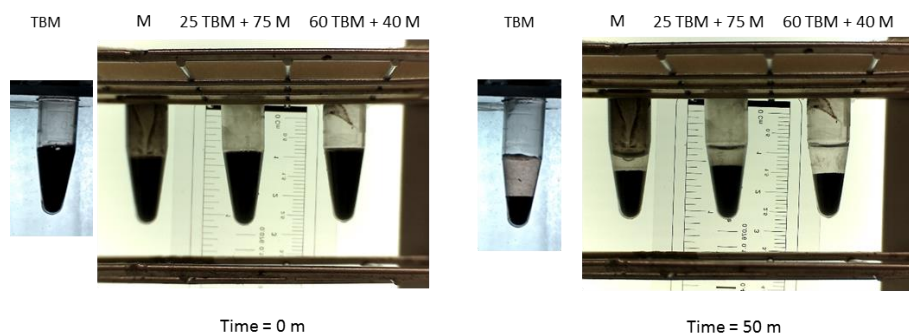
- Larionova, J.; Long, J.; Briceño, S.; Long, J. Magnetic water-soluble rhamnase-coated  $Mn_{1-x}Co_xFe_2O_4$  nanoparticles as potential heating agents for hyperthermia. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2015**, *5*, 910–915.
13. Yüksel, Y. Effects of the particle size and shape of the magnetic nanoparticles on the magnetic hyperthermia and exchange bias properties. *Phys. B Condens. Matter* **2019**, *575*, 411689.
  14. Jabalera, Y.; Fernández-Vivas, A.; Iglesias, G.R.; Delgado, Á. V.; Jimenez-Lopez, C. Magnetoliposomes of mixed biomimetic and inorganic magnetic nanoparticles as enhanced hyperthermia agents. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *183*, 110435.
  15. Li, Z.; Kawashita, M.; Araki, N.; Mitsumori, M.; Hiraoka, M.; Doi, M. Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of cancer. *Mater. Sci. Eng. C* **2010**, *30*, 990–996.
  16. Li, Q.; Kartikowati, C.W.; Horie, S.; Ogi, T.; Iwaki, T.; Okuyama, K. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline  $Fe_3O_4$  nanoparticles. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9894.
  17. Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M.R.; Santamaría, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* **2007**, *2*, 22–32.
  18. El-Boubbou, K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery. *Nanomedicine* **2018**, *13*, 929–952.
  19. Valverde-Tercedor, C.; Montalbán-López, M.; Perez-Gonzalez, T.; Sanchez-Quesada, M.S.; Prozorov, T.; Pineda-Molina, E.; Fernandez-Vivas, M.A.; Rodriguez-Navarro, A.B.; Trubitsyn, D.; Bazylnski, D.A.; et al. Size control of in vitro synthesized magnetite crystals by the MamC protein of *Magnetococcus marinus* strain MC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5109–5121.
  20. García Rubia, G.; Peigneux, A.; Jabalera, Y.; Puerma, J.; Oltolina, F.; Elert, K.; Colangelo, D.; Gómez Morales, J.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C. PH-Dependent Adsorption Release of Doxorubicin on MamC-Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Langmuir* **2018**, *34*, 13713–13724.
  21. Jabalera, Y.; Garcia-Pinel, B.; Ortiz, R.; Iglesias, G.; Cabeza, L.; Prados, J.; Jimenez-Lopez, C.; Melguizo, C. Oxaliplatin–Biomimetic Magnetic Nanoparticle Assemblies for Colon Cancer-Targeted Chemotherapy: An In Vitro Study. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 395.
  22. Peigneux, A.; Oltolina, F.; Colangelo, D.; Iglesias, G.R.; Delgado, A. V.; Prat, M.; Jimenez-Lopez, C. Functionalized Biomimetic Magnetic Nanoparticles as Effective Nanocarriers for Targeted Chemotherapy. *Part. Part. Syst. Charact.* **2019**, *36*, 1900057.
  23. Iglesias, G.R.; Jabalera, Y.; Peigneux, A.; Checa Fernández, B.L.; Delgado, Á. V.; Jimenez-Lopez, C.; Iglesias, G.R.; Jabalera, Y.; Peigneux, A.; Checa Fernández, B.L.; et al. Enhancement of Magnetic Hyperthermia by Mixing Synthetic Inorganic and Biomimetic Magnetic Nanoparticles. *Pharmaceutics*

- 2019**, *11*, 273.
24. Perez-Gonzalez, T.; Jimenez-Lopez, C.; Neal, A.L.; Rull-Perez, F.; Rodriguez-Navarro, A.; Fernandez-Vivas, A.; Iañez-Pareja, E. Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2010**, *74*, 967–979.
  25. Prat, M.; Morra, I.; Bussolati, G.; Comoglio, P.M. CAR-3, a monoclonal antibody-defined antigen expressed on human carcinomas. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 5799–807.
  26. Prat, M.; Medico, E.; Rossino, P.; Garrino, C.; Comoglio, P.M. Biochemical and immunological properties of the human carcinoma-associated CAR-3 epitope defined by the monoclonal antibody AR-3. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1415–21.
  27. Iafisco, M.; Delgado-Lopez, J.M.; Varoni, E.M.; Tampieri, A.; Rimondini, L.; Gomez-Morales, J.; Prat, M. Cell Surface Receptor Targeted Biomimetic Apatite Nanocrystals for Cancer Therapy. *Small* **2013**, *9*, 3834–3844.
  28. Obaidat, I.; Issa, B.; Haik, Y. Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia. *Nanomaterials* **2015**, *5*, 63–89.
  29. Wildeboer, R.R.; Southern, P.; Pankhurst, Q.A. On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 495003 .
  30. Jabalera, Y.; Sola-Leyva, A.; Peigneux, A.; Vurro, F.; Iglesias, G.R.; Vilchez-Garcia, J.; Pérez-Prieto, I.; Aguilar-Troyano, F.J.; López-Cara, L.C.; Carrasco-Jiménez, M.P.; et al. Biomimetic magnetic nanocarriers drive choline kinase alpha inhibitor inside cancer cells for combined chemo-hyperthermia therapy. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 408.
  31. Oltolina, F.; Gregoletto, L.; Colangelo, D.; Gómez-Morales, J.; Delgado-López, J.M.; Prat, M. Monoclonal antibody-targeted fluorescein-5-isothiocyanate-labeled biomimetic nanoapatites: A promising fluorescent probe for imaging applications. *Langmuir* **2015**, *31*, 1766–1775.
  32. Kanwal, U.; Bukhari, N.I.; Rana, N.F.; Rehman, M.; Hussain, K.; Abbas, N.; Mehmood, A.; Raza, A. Doxorubicin-loaded quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan polymeric nanoformulation: Uptake by cells and organs. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 1–15.
  33. Yang, S.; Tse, W.H.; Zhang, J. Deposition of Antibody Modified Upconversion Nanoparticles on Glass by a Laser-Assisted Method to Improve the Performance of Cell Culture. *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, *14*, 101.
  34. Glassford, S.E.; Byrne, B.; Kazarian, S.G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 2849–2858.
  35. Yang, S.; Zeng, T.; Li, Y.; Liu, J.; Chen, Q.; Zhou, J.; Ye, Y.; Tang, B. Preparation of Graphene Oxide Decorated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> Nanocomposites with Superior

- Adsorption Capacity and SERS Detection for Organic Dyes. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*, 817924.
36. Zamora-Mora, V.; Soares, P.; Echeverria, C.; Hernández, R.; Mijangos, C. Composite Chitosan/Agarose Ferrogels for Potential Applications in Magnetic Hyperthermia. *Gels* **2015**, *1*, 69–80.
  37. Huber, D.L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* **2005**, *1*, 482–501.
  38. Sanz, B.; Calatayud, M.P.; Cassinelli, N.; Ibarra, M.R.; Goya, G.F. Long-Term Stability and Reproducibility of Magnetic Colloids Are Key Issues for Steady Values of Specific Power Absorption over Time. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 4524–4531.
  39. Nudelman, H.; Valverde-tercedor, C.; Kolusheva, S.; Perez, T.; Widdrat, M.; Grimberg, N.; Levi, H.; Nelkenbaum, O.; Davidov, G.; Faivre, D.; et al. Structure – function studies of the magnetite-biomineralizing magnetosome-associated protein MamC. *J. Struct. Biol.* **2016**, *194*, 1–9.
  40. Reyes-Ortega, F.; Delgado, Á.; Schneider, E.; Checa Fernández, B.; Iglesias, G. Magnetic Nanoparticles Coated with a Thermosensitive Polymer with Hyperthermia Properties. *Polymers (Basel)*. **2017**, *10*, 10.
  41. Mai, B.T.; Balakrishnan, P.B.; Barthel, M.J.; Piccardi, F.; Niculaes, D.; Marinaro, F.; Fernandes, S.; Curcio, A.; Kakwere, H.; Autret, G.; et al. Thermoresponsive Iron Oxide Nanocubes for an Effective Clinical Translation of Magnetic Hyperthermia and Heat-Mediated Chemotherapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 5727–5739.
  42. Sola-Leyva, A.; Jabalera, Y.; Chico-Lozano, M.A.; Carrasco-Jiménez, M.P.; Iglesias, G.R.; Jimenez-Lopez, C. Reactive oxygen species (ROS) production in HepG2 cancer cell line through the application of localized alternating magnetic field. *J. Mater. Chem. B* **2020**.
  43. INTERNATIONAL STANDARD, I. ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **2009**.
  44. Oltolina, F.; Colangelo, D.; Miletto, I.; Clemente, N.; Miola, M.; Verné, E.; Prat, M.; Follenzi, A. Tumor targeting by monoclonal antibody functionalized magnetic nanoparticles. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1575.
  45. Shi, M.; Ho, K.; Keating, A.; Shoichet, M.S. Doxorubicin-conjugated immunonanoparticles for intracellular anticancer drug delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 1689–1696.



## Supporting Information



**Figure S1.** Colloidal stability of the samples measured using photographs of the sedimentation time evolution.



Este artículo se ha publicado en la revista indexada en JCR: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110435>)

## **Magnetoliposomes of mixed biomimetic and inorganic magnetic nanoparticles as enhanced hyperthermia agents**

Ylenia Jabalera<sup>1</sup>, Antonia Fernández-Vivas<sup>1</sup>, Guillermo R. Iglesias<sup>2</sup>, Ángel V. Delgado<sup>2</sup> and Concepcion Jimenez-Lopez<sup>\*1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Department of Applied Physics, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

\*Corresponding author

### **Abstract**

Recently, liposomes have been explored as a potential solution to improve the biocompatibility and the colloidal stability of magnetic nanoparticles. Protocols have been developed for producing magnetoliposomes of magnetite nanoparticles obtained inorganically (MNPs). However, the biomimetic synthesis of magnetite using heterologous proteins from magnetotactic bacteria has become a real alternative to produce novel biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs). Among these, the BMNPs obtained in presence of MamC protein from *Magnetococcus marinus* MC-1 have been proposed as excellent candidates to be potentially used as drug nanocarriers and as hyperthermia agents. However, their colloidal stability still needs to be improved while maintaining their magnetic properties intact. One possibility explored in this manuscript is to form magnetoliposomes that contain BMNPs. Indeed, the protocols developed for producing magnetoliposomes of MNPs need to be tested and modified to be able to include BMNPs. In this context, a protocol has been developed to produce both magnetoliposomes filled with MNPs and/or BMNPs and their potential as hyperthermia agents was tested. In fact, for the first time, these two types of nanoparticles were mixed

in different proportions to test the composition that would optimize such as behaviour as hyperthermia agents. Interestingly, it was observed that the hyperthermia behaviour of the magnetoliposomes greatly improved if they were filled with a mixture of MNPs and BMNPs. These results indicate that these magnetoliposomes display optimal characteristics to become a potential agent for hyperthermia and that the opening of those liposomes could be externally controlled by applying an alternate magnetic field.

## Introduction

Magnetic nanoparticles (MNPs), especially magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), are one of the most demanded nanoparticles in a several number of applications, especially in clinics, because of their magnetic properties which allow, on one hand, their guidance toward the target by external magnetic fields (continuous gradient magnetic field)[1–3] and, on the other, to mediate hyperthermia (locally increasing the temperature by the application of an alternating magnetic field), thus inducing the apoptosis of tumor cells, which are more sensitive than normal healthy cells [4–6]. For that application, the size of the MNPs plays an important role, as it also does their surface characteristics that allow functionalization with the relevant drug that needs to be carried to the target. In this context, firstly, MNPs should be superparamagnetic at the working temperature (*i.e.* room and body temperature) while responding as efficiently as possible to the external magnetic field applied for their targeting [2,4]. Such a response depends on the magnetic moment per particle, which for superparamagnetic crystalline stoichiometric magnetite MNPs, in turn, depends on the size of the MNPs [2]. Most of the commercialized superparamagnetic nanoparticles (SPIONs) are small (< 30 nm), and, therefore by increasing their size while keeping their superparamagnetic character, their magnetic moment per particle could potentially be increased, thus enhancing the efficiency of the magnetic guidance [7]. Secondly, size is important also when hyperthermia treatments are in play. In fact, the heating power generated per particle unit mass upon application of an alternating external magnetic field is directly related to the amount of iron in the MNP, and it should be as high as possible while keeping both the magnetic field within the acceptable clinical range and a low MNPs dose [2,4]. Finally, most of the SPIONs need to be coated with different compounds (such as organic acids or polymers) to provide them with new chemical groups allowing functionalization, but possibly altering the magnetic properties of the magnetic nanoparticles [2].

Many of the drawbacks affecting synthetic MNPs listed so far are overcome in biomimetic MNPs (BMNPs). These are synthesized *in vitro* by taking inspiration from the biomineralization process of the magnetosome produced by magnetotactic bacteria. Specifically, by using Magnetosome membrane Associated Proteins, (MAPs), or peptides derived from them, during the *in vitro* synthesis of magnetite nanoparticles novel nanoparticles with different properties compared to that of the inorganic SPIONs can be obtained [8–16]. Among the BMNPs, MamC mediated BMNPs have been recently proposed as a good candidate for potential drug carrier and hyperthermia agent [17,18]. Moreover, the production of MamC mediated BMNPs (here referred from now on as BMNPs) can be scaled up *in vitro* in eco-friendly, cost-effective magnetite precipitation experiments run at room temperature and 1 atm total pressure by simple addition of the recombinant MamC protein from *Magnetococcus marinus* MC-1 [8,14–16]. These BMNPs: (1) are superparamagnetic at room and body temperature while they present a saturation magnetization of 55 emu/g (61 emu/g corresponding to the magnetic core, at 500 Oe, 25 °C); (2) are larger than most commercial SPION and/or other biomimetic magnetites, which makes them to be single magnetic domain, showing higher blocking temperature and slower magnetization increase, and thus, larger magnetic moment per particle [8]; (3) contain up to 4.5 wt% of MamC that gives them novel surface properties and provides functional groups that allow functionalization; (4) have an isoelectric point (*iep*) of pH 4.4, and are strongly negatively charged at physiological pH (pH 7.4). This property allows the coupling and release of molecules to be pH-dependent [17]. Thus, at physiological pHs they bind to positively charged molecules through electrostatic interactions which are then weakened at acidic pHs (such as those found in tumor microenvironments), allowing the release of the adsorbed molecules; and (5) are cytocompatible and hemocompatible, at least under the conditions tested [17].

However, one of the major concerns in terms of the potential application in biotechnology of these or any other magnetic nanoparticle is improving their colloidal stability in suspension, as well as their biocompatibility. In this context, for magnetosomes, the magnetosome membrane that surrounds them provides several advantages with respect to the nude crystals, being among them [19,20]: (1) a major stability; (2) an improved functionalization capabilities and (3) an increased biocompatibility and low toxicity. Therefore, a potential good approach to improve BMNPs could be providing them coating.

Several protocols have been already developed to coat inorganic magnetic nanoparticles (MNPs) with liposomes to obtain the so-called magnetoliposomes, yielding both unilamellar and multilamellar magnetoliposomes [21–30]. Among the lipids used so far are phosphatidylcholine (PC), palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine (POPC), dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), distearoyl phosphoethanolamine (DSPE), dioleoyl phosphocholine (DOPC), dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), sphingomyelin (SM) and/or phosphatidylinositol (PI). Compared to the uncovered MNPs, these magnetoliposomes, like magnetosomes, are more stable, biocompatible, biodegradable and more prone to surface manipulations [31–34].

However, this is still an area that is fairly new and there are still many unsolved questions that need to be addressed before considering and optimizing a composition that allows the effective use of these magnetoliposomes. In particular: (1) a new protocol needs to be developed to form magnetoliposomes containing BMNPs, that would probably imply modifications of the already established protocols to form magnetoliposomes containing MNPs, since both particles present different surface properties and stability [17]; (2) It needs to be established how the lipid coating affects the magnetic properties of the nude MNPs and BMNPs. This is important because it could compromise the magnetic guidance of the magnetoliposome [2,35,36] and could also prevent the potential use of these magnetoliposomes as hyperthermia agents; (3) It is mandatory to determine if the breakage of the lipid cover could be externally controlled, with the goal of being able to release the content at the target site at the desired moment. (4) Since previous studies [18] have demonstrated that BMNPs are better drug carriers while MNPs are better hyperthermia agents, an optimized magnetoliposome composition should be explored that takes advantage of the strong aspects of each one of the different nanoparticles (MNPs and BMNPs). Recall that magnetic hyperthermia is understood here as the phenomenon of a local heat induced by the application of an alternating magnetic field [37].

These questions are attempted to be addressed in the present manuscript as a proof of concept for a further development of the nanosystem. In particular, magnetoliposomes containing both BMNPs and/or inorganic MNPs were produced and the protocol was developed and optimized. Then, (a) the hindering of the magnetic response caused by the lipid cover, (b) the potential of these magnetoliposomes as effective agents for magnetic hyperthermia and (c) optimization of the magnetoliposome composition that allows the

simultaneous carrying of the drug and an effective local heating induced by an alternating magnetic field were tested.

## Experimental Section

### Expression and Purification of MamC Protein

MamC was purified as a recombinant protein following the protocol described by Valverde-Tercedor et al. [8]. For the expression of MamC, *E. coli* TOP10 cells were cultured in LB broth supplemented with ampicillin (50 mg/mL, Sigma-Aldrich). Cells were grown at 37 °C and the protein expression was induced by adding isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Thermo-Fisher) at 2 mM. The obtained pellet was resuspended in guanidinium lysis buffer (guanidinium hydrochloride 6 M, sodium phosphate 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.8) and disrupted by sonication. After centrifugation of the cell lysate, the soluble fraction was purified by using a HiTrap chelating HP column (GE Healthcare) and ÄKTA Prime Plus FPLC System (GE Healthcare). The eluate was dialyzed against 1 L of buffer A (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, urea 6 M, pH 8.5), diluted stepwise with buffer B every 5h (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.5) and dialyzed against buffer B overnight.

### Biom mineralization Experiments

All reagents used in the biom mineralization experiments were purchased from Sigma-Aldrich. Deoxygenated water was prepared by boiling purified water for 1 h and then cooling in an ice bath while continuously sparging with ultrapure N<sub>2</sub>. After that, it was immediately placed inside an anaerobic chamber (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI) filled with 4% H<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>, and used to prepare the stock solutions: NaOH (1 M), FeCl<sub>3</sub> (1 M), NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.15 M/0.15 M) and Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (0.5 M). The stock solution of MamC was also deoxygenated with ultrapure N<sub>2</sub>. Magnetite precipitation experiments, both protein free (MNPs) and MamC-mediated (BMNPs), were carried out in the anaerobic chamber to avoid potential oxidation of the product following the protocol described by Perez-Gonzalez et al. [38]. The final reaction mixture from which magnetite precipitated was 2.78 mM Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 3.5 mM NaHCO<sub>3</sub>/3.5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5.56 mM FeCl<sub>3</sub>, pH = 9. In the case of protein-bearing magnetite precipitation experiments, this protein was added to this reaction mixture to a final concentration of 10  $\mu$ g/mL. Each experiment was run inside the anaerobic chamber for 30 days, after which the solids were

magnetically concentrated and the supernatant was discarded. Then the precipitates were washed with oxygen-free deoxygenated Milli-Q water three times. Between washes, each reaction flask was vigorously shaken for several seconds, the precipitate was magnetically concentrated and the liquid removed. Finally, the precipitate was concentrated in 1-2 mL of oxygen-free deoxygenated Milli-Q water, hermetically sealed and stored at 20 °C inside the anaerobic chamber until analysed.

### **Magnetite Preparation and Magnetoliposomes Synthesis**

MNPs were incubated in citrate 2M (Thermo-Fisher) for 12 h. After that, the particles were washed three times with water to remove the citrate and were re-dispersed in 1.67 mL of water. This suspension was filtered through 0.22 µm diameter pore filters. MNPs-magnetoliposomes (namely liposomes covering MNPs) were produced by using the thin film hydration method, by modifying the protocol described by Clares and co-workers [27]. Magnetoliposomes were produced using egg phosphatidylcholine (PC) (Avanti Polar Lipids). According to manufacturer description, egg PC is composed by approximately 32.7% C16:0 (palmitic), 32% C18:1 (oleic), 12.3% C18:0 (stearic) and 17.1% C18:2 (linoleic), showing a low lipid transition temperature. To obtain the thin lipid film layer, PC was dissolved in chloroform and then, the solvent was evaporated by using a rotavapor (Büchi, Rotavapor-R) under vacuum at 400 rpm and 37 °C. Then, the thin lipid film layer was hydrated and dispersed with the ferrofluid suspension. The PC concentration in all samples was 6 mg/mL, and concentrations of 6 mg/mL, 24 mg/mL and 48 mg/mL of MNPs were used in these experiments, yielding MNP:PC ratios of 1:1, 4:1 and 8:1, respectively. To ensure a correct dispersion, the mixture was shaken for 2 h at 180-200 rpm and the magnetoliposome suspension was kept at 4 °C for 24 h. Unilamellar magnetoliposomes were obtained by passing the suspension 5 times successively through 200 nm and 100 nm polycarbonate filters (Whatman) by using an extruder (Avanti Polar Lipids) at 45 °C. Finally, the magnetoliposome suspension was concentrated with a magnet. An identical protocol was followed to produce BMNPs-magnetoliposomes (namely, liposomes covering BMNPs) and (BMNPs + MNPs) magnetoliposomes (namely liposomes containing mixtures of BMNPs and MNPs). Different ratios of BMNPs and MNPs were used as detailed: 60% BMNPs + 40% MNPs (here referred as 60BMNPs-40MNPs magnetoliposomes experiments) and 25% BMNPs + 75% MNPs (here referred as 25BMNPs-75MNPs magnetoliposomes experiments). The final concentration of magnetite nanoparticles in all these experiments was 24 mg/mL.



## Analysis of the Precipitates and Magnetoliposomes

The morphology and size of the BMNPs, MNPs and all types of magnetoliposomes were studied by transmission electron microscopy (TEM, LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss SMT electron microscope, Germany). Magnetic nanoparticles were re-suspended in ethanol and embedded in Embed 812 resin. Ultrathin sections (50–70 nm) were prepared using a Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) after which the sections were deposited onto copper grids. For magnetoliposomes, drops were placed on copper grids with formvar film and they were stained using negative staining technique.

The size of the crystals and magnetoliposomes was measured on TEM images by using ImageJ 1.47 program. Concretely, TEM images were further maximized to whole screen, the scale bar was used to calibrate the pixel to nm conversion on the ImageJ 1.47 program and then, the diameter of the individual magnetoliposomes or the side of individual crystals were measured manually. Then, size distribution curves were determined from those measurements by using Origin pro 9. To ensure reproducibility of results, sizes were measured on multiple micrographs with an excess of 1000 nanoparticles and 200 magnetoliposomes measured for each experiment. In addition, statistical significance of the results obtained was tested using Tukey test with a fixed value of  $\alpha < 0.05$ .

## Magnetic Characterization

Zero-field cooling (ZFC-W) and field cooling (FC-C) measurements were carried out by using a superconducting quantum interference device (SQUID) 5 T magnetometer (Quantum Design MPMS XL, USA). Under gentle argon flow, a given amount of each specimen powder was placed in a double-walled polycarbonate capsule. The samples were immediately cooled in a zero applied field to 5 K to preserve randomized magnetization of the nanocrystals, after which a 500 Oe magnetic field was applied and samples were heated up to 300 K and then from 300 K without turning the field off. To allow comparison among the different complexes, the  $M(T)$  curves were normalized by the amount (g) of each sample analysed and by the magnetization value of the specific sample at 300 K. No distinction between the terms of “superparamagnetic” or “single magnetic domain” will be done in this work, according to Prozorov et al. [2].  $T_B$  was calculated by subtracting the values of FC-C and ZFC-W at a given temperature and by

plotting these values over time.  $T_B$  was considered the minimum temperature value at which this difference was below the experimental error (0.3% of the measurement). In addition, hysteresis cycles for each type of nanoparticles and magnetoliposomes were run at 5 and 300 K.

### **Magnetic Hyperthermia Analysis**

The magnetic hyperthermia tests were carried out using an AC current generator at fixed frequency of 197 kHz and a variable magnetic field strength between 3 and 12 kA/m. Once the samples reached the desired temperature, it was maintained by reducing the magnetic field intensity. The heating coil was made with a double 5 turn coil, 20 mm in diameter and 50 mm in length, made of copper tube and water cooled at 34 °C. The temperature of the samples was recorded each 3 s by means of an Optocom Fotemp-4H thermometer (Germany) with a TS3 optic fibre and total time of 1, 10 and 30 min, with  $\pm 0.2$  °C accuracy. The optic fibre was inserted into a cylindrical glass vial with dimensions 8 mm diameter and 20 mm height, containing 0.5 mL of suspension and 24 mg/mL solids concentration.

From the initial slope of the temperature variation with time ( $dT/dt$ ), the specific absorption rate SAR (W/g) was obtained for each sample [39]. In addition, to evaluate the effect of the magnetic field over the lipid cover, aliquots of magnetoliposomes sample were exposed to the magnetic field during 1, 10, and 30 min as well and analysed by TEM. These TEM images were compared with those obtained from the control samples (sample without magnetic field applied).

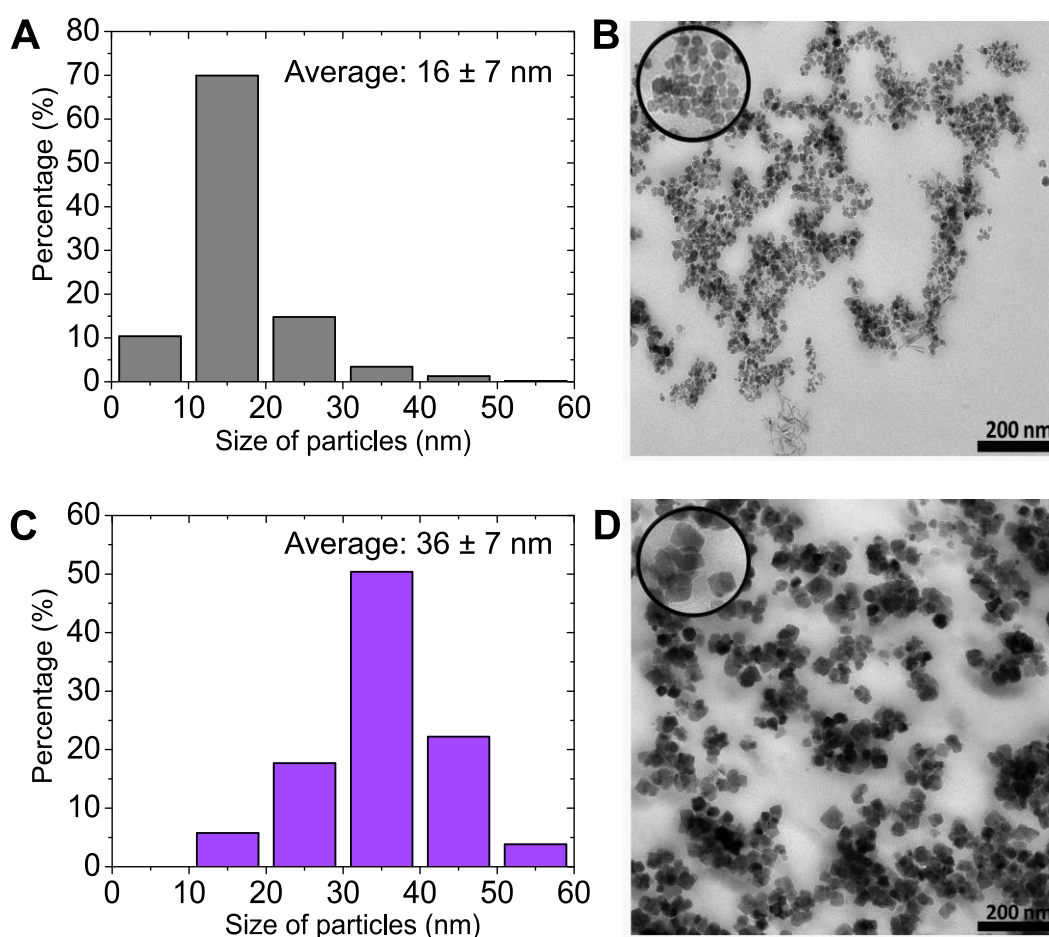
### **Colloidal Stability**

The stability of the samples was determined by means of recording the sedimentation process of the different naked nanoparticles (MNPs and BMNPs) and magnetoliposomes samples (MNPs-magnetoliposomes and BMNPs-magnetoliposomes). A volume of 1 mL 5 mg/mL of these different nanoparticles was shaken in a vortex for 1 min (time zero of the experiment) and let it sediment. For each experiment, the end of the sedimentation time was considered when a pellet formed at the bottom of the tubing.

## Results

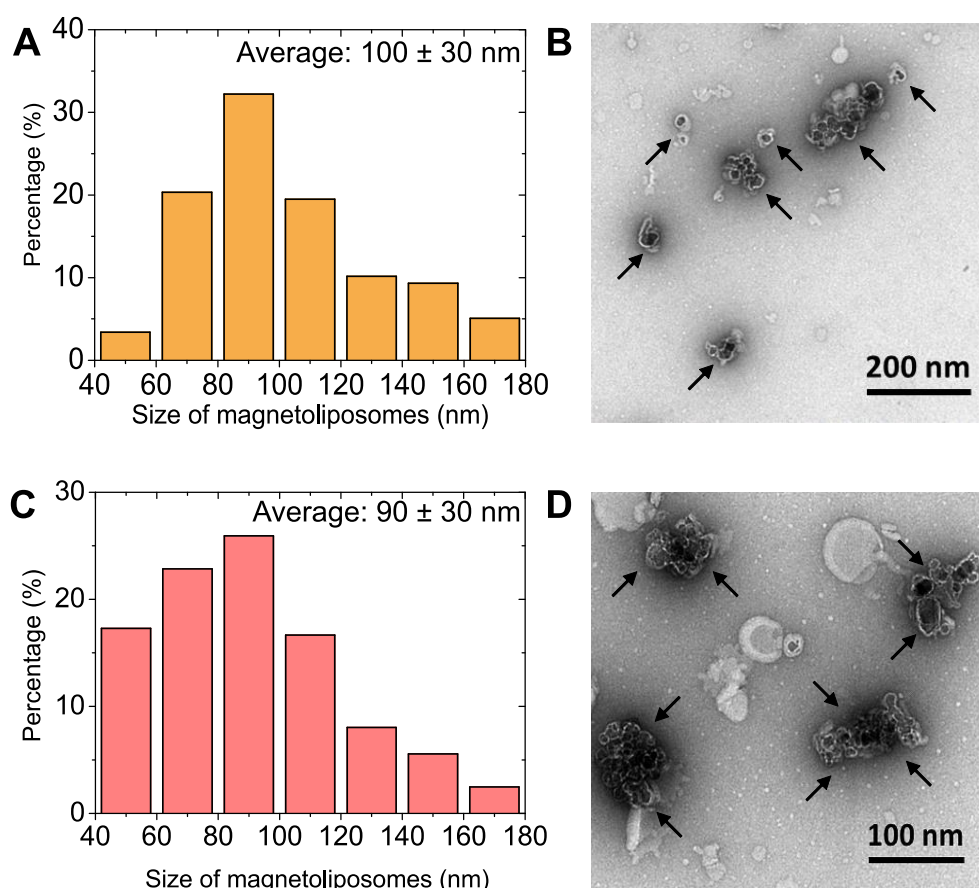
MamC purification was evaluated by electrophoresis. SDS-PAGE gel shows an intense band at 17.4 kDa, corresponding to purified MamC-His protein (Figure S1). In this case, the purity grade is higher than 95%, being this purity similar to that obtained previously by Valverde-Tercedor et al. [8] and Lopez-Moreno et al. [14].

TEM analyses show poorly faceted MNPs with an average size of  $16 \pm 7$  nm (Fig. 1A and B). On the contrary, BMNPs display well-defined faces with rectangular, square two-dimensional and rhombic morphologies and an average size of  $36 \pm 7$  nm (Fig. 1C and D). Statistical analysis (ANOVA test) reveals that the size differences between the two types of magnetic nanoparticles (MNPs and BMNPs) are statistically significant (at  $\alpha < 0.05$ ) (Table S1).



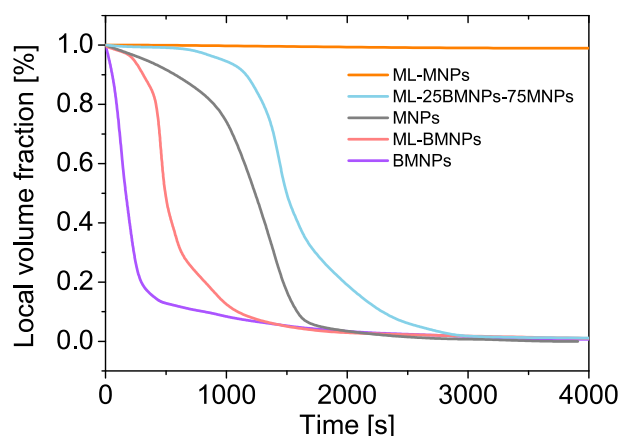
**Figure 1.** Size distribution and TEM image of MNPs (A, B) and BMNPs (C, D).

TEM analyses also show that very few uni-lamellar MNPs-magnetoliposomes formed at 1:1 MNP:PC mass ratio, since most of the liposomes were empty (Fig. S5). An increase on the ratio MNP:PC enhanced the formation of magnetoliposomes. In fact, at 4:1 MNP:PC mass ratio, a relatively high number of magnetoliposomes with an average size of  $100 \pm 30$  nm were detected in the samples (Fig. 2A and B) containing an average number of particles per liposome of 3 (Fig. S2A). Similarly at 8:1 MNP:PC, uni-lamellar magnetoliposomes with an average size of  $100 \pm 40$  nm (Fig. S3) containing an average of 6 particles per liposome were observed (Fig. S2B). Statistical analysis shows that these two samples (MNP:PC 4:1 and 8:1) are not statistically different with respect to the size of magnetoliposomes (Table S1) and, therefore, the ratio MNP:PC of 4:1 was chosen for all experiments. Identically, TEM analyses of BMNPs-magnetoliposomes (BMNP:PC 4:1) show magnetoliposomes with an average size of  $90 \pm 30$  nm (Fig. 2C and D) and an average number of 6 particles per liposome (Fig. S2C).



**Figure 2.** Size distribution and TEM image of MNPs-magnetoliposomes (A, B) and BMNPs-magnetoliposomes (C, D). Black arrows indicate the magnetoliposomes.

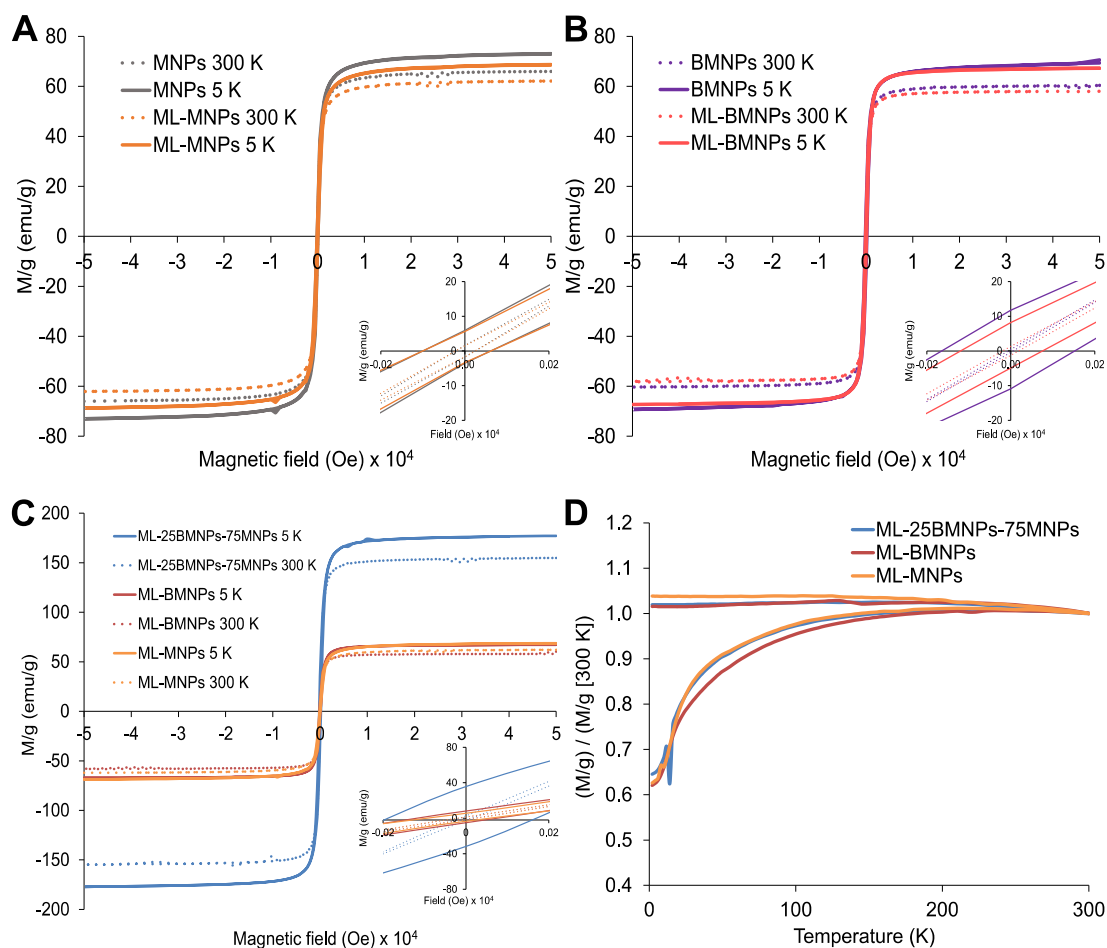
Colloidal stability analysis shows that the lipid cover increases the stability of the magnetoliposomes in comparison with the nude crystals, since the sedimentation time of the coated nanoparticles (at least, 4000 s for MNPs-magnetoliposomes and 1250 s for BMNPs-magnetoliposomes) is higher than that of the nude nanoparticles (1750 s for MNPs and 500 s for BMNPs; Fig. 3). Therefore, in the case of MNPs nanoparticles, the lipid cover increases, at least, in ~1250 s the stability of the molecules in the suspension. Similarly, in the case of BMNPs nanoparticles, the lipid cover increases in ~750 s the stability of the molecules in suspension.



**Figure 3.** Colloidal stability of BMNPs, BMNPs magnetoliposomes (ML-BMNPs), MNPs, MNPs-magnetoliposomes (ML-MNPs) and 25BMNPs-75MNPs magnetoliposomes (ML-25BMNPs-75MNPs) measured and expressed as local volume fraction of magnetite/magnetoliposome as a function of time.

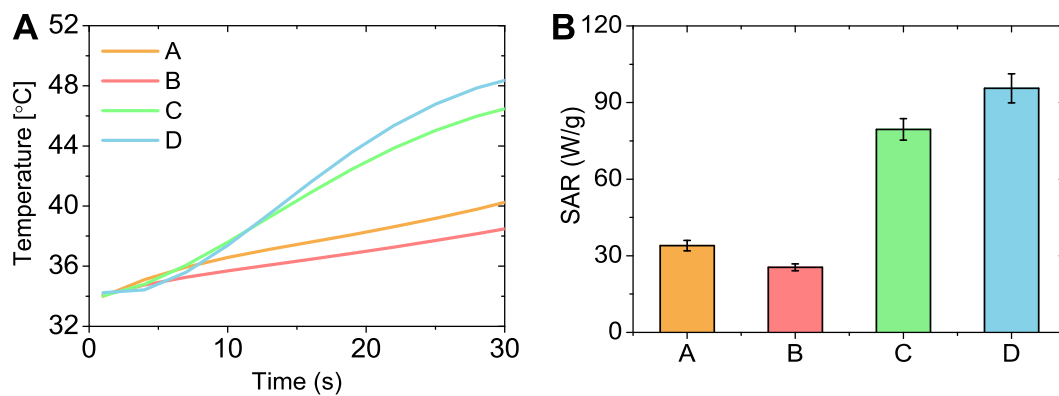
Regarding the magnetic characterization of the samples, ZFC-FC curves at 500 Oe show differences between the different magnetoliposomes nanoparticles (Fig. 4D). The blocking temperature is 190 K for MNPs-magnetoliposomes, 210 K for BMNPs-magnetoliposomes and 200 K for 25BMNPs–75MNPs magnetoliposomes, values similar to those obtained previously for nude nanoparticles [8]. Fig. 4A and B show that lipid cover does not interfere with magnetic response of the nanoparticles. In the case of MNPs, the saturation magnetization ( $M_s$ ) for nude MNPs is 66 emu/g, while that for MNPs-magnetoliposomes (ML-MNPs) is 62 emu/g. Respect to BMNPs, the  $M_s$  for nude BMNPs is 61 emu/g, while that for BMNPs-magnetoliposomes (ML-BMNPs) is 58 emu/g. Moreover, Fig. 4C shows that 25BMNPs–75MNPs magnetoliposomes exposes the highest  $M_s$  (155 emu/g). Therefore, the hysteresis loop of all samples tested (nude nanoparticles and magnetoliposomes) shows a typical ferromagnetic behaviour at 5 K

while, at 300 K, these molecules show zero coercivity, which indicates their superparamagnetic character (Fig. 4A-C). This is important, since at temperatures higher than  $T_B$ , such as 300 K and above, these particles will behave as no magnetic in the absence of an external magnetic field, thus preventing aggregation [2]. However, once an external magnetic field is applied, the molecules respond efficiently (Fig. 4A-C).



**Figure 4.** (A) Hysteresis cycle of MNPs and MNPs-magnetoliposomes (ML-MNPs) at 5 and 300 K. Inset: detail of the cycle in the absence of external magnetic field. (B) Hysteresis cycle of BMNPs and BMNPs-magnetoliposomes (ML-BMNPs) at 5 and 300 K. Inset: detail of the cycle in the absence of external magnetic field. (C) Hysteresis cycle of 25BMNPs-75MNPs magnetoliposomes (ML-25BMNPs-75MNPs), MNPs-magnetoliposomes (ML-MNPs) and BMNPs-magnetoliposomes (ML-BMNPs) at 5 and 300 K. Inset: detail of the cycle in the absence of external magnetic field. (D) ZFC-W and FC-C of 25BMNPs-75MNPs magnetoliposomes (ML-25BMNPs-75MNPs), MNPs-magnetoliposomes (ML-MNPs) and BMNPs-magnetoliposomes (ML-BMNPs).

Fig. 5A shows that the temperature increases rapidly from 37 °C to 42 °C in all samples, although some differences are appreciable. Thus, both 60BMNPs–40MNPs and 25BMNPs–75MNPs magnetoliposomes take just 15 s to produce that temperature jump, while it takes less than one minute for MNPs- and BMNPs-magnetoliposomes. The fasted temperature increase was observed for 25BMNPs–75MNPs magnetoliposomes (Fig. 5B, Table 1). The hyperthermia performance of the different types of magnetoliposomes is shown in Fig. 6. In all cases, the target temperature of 42-46 °C was reached and maintained to within  $\pm 0.6$  °C for the desired time interval. A manual control of the current through the coil was necessary for the constant temperature stage.



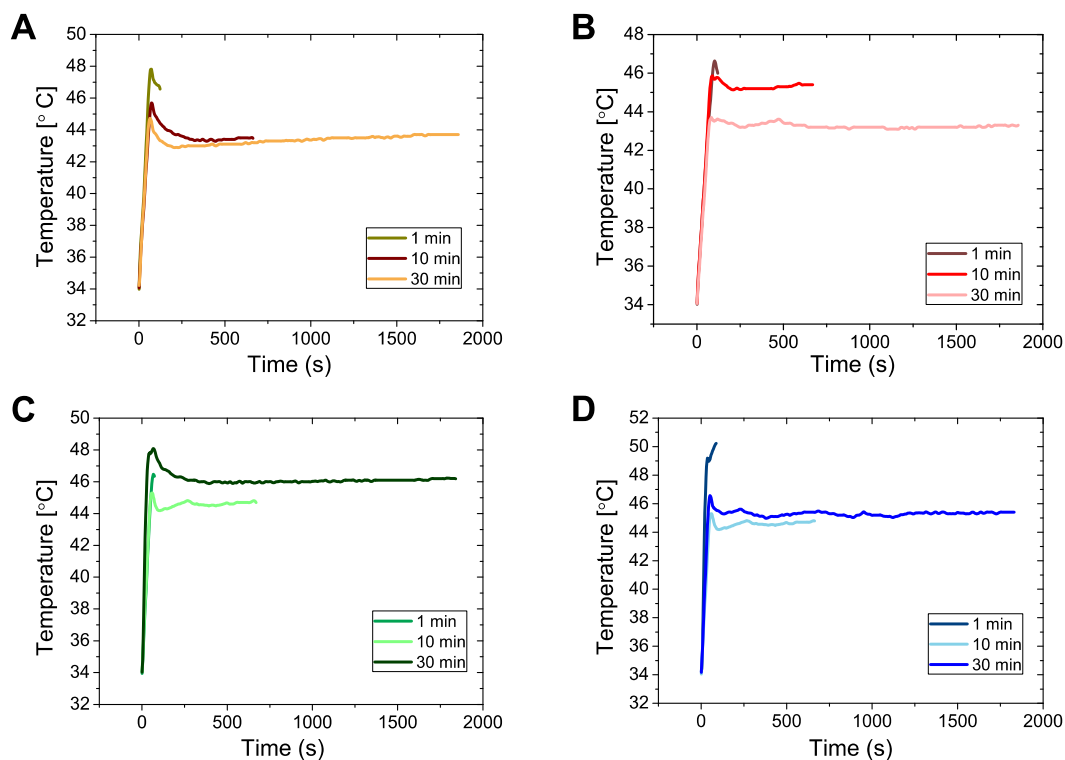
**Figure 5.** (A) Magnetic hyperthermia response for 30 s and (B) SAR of magnetic hyperthermia response of MNPs-magnetoliposomes (A-orange), BMNPs-magnetoliposomes (B-red), 60BMNPs-40MNPs magnetoliposomes (C- green) and 25BMNPs-75MNPs magnetoliposomes (D-blue).

**Table 1.** Heating properties of the samples ( $f = 197$  kHz and  $H = 12$  kA/m).

Sample	SAR (W/g)	$dT/dt$ (°C/s)
(A) MNPs -magnetoliposomes	$34 \pm 2$	$0.20 \pm 0.01$
(B) BMNPs -magnetoliposomes	$26 \pm 1$	$0.147 \pm 0.007$
(C) 60BMNPs - 40MNPs magnetoliposomes	$79 \pm 4$	$0.46 \pm 0.02$
(D) 25BMNPs - 75MNPs magnetoliposomes	$96 \pm 6$	$0.55 \pm 0.03$

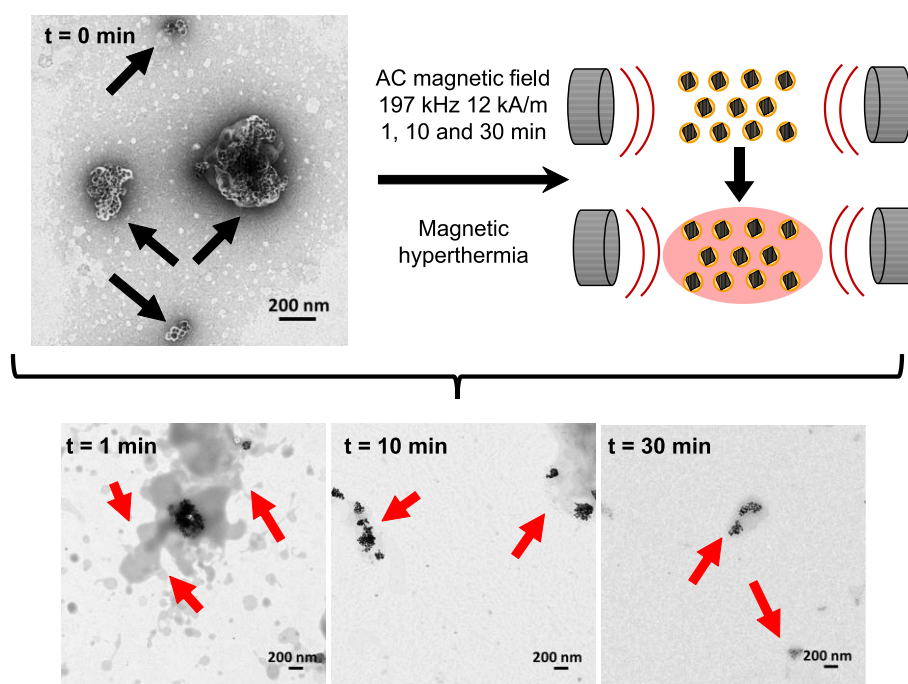
Finally, in order to check the magnetic hyperthermia effect on lipid coating, TEM images of the magnetoliposomes of the present study were taken before and after the application of the magnetic field. While intact liposomes were observed coating the

nanoparticles prior the application of the magnetic field (Fig. 7, time = 0 min), after applying such a magnetic field, no lipid cover around the different nanoparticles was detected in any of the samples, rather, drops of fat were detected, indicating that the lipid cover was broken (Fig. 7, time = 1, 10 and 30 min).



**Figure 6.** (A) Magnetic hyperthermia response of MNPs-magnetoliposomes (A-orange), BMNPs- magnetoliposomes (B-red), 60BMNPs-40MNPs magnetoliposomes (C-green) and 25BMNPs- 75MNPs magnetoliposomes (D-blue) for 1, 10 and 30 min with the magnetic field applied.





**Figure 7.** Effect of magnetic hyperthermia on lipid cover for 1, 10 and 30 min. Black arrows indicate the magnetoliposomes and red arrows indicate the drops of fat.

## Discussion

Interest of magnetoliposomes as active drug vehicles and hyperthermia agents is mainly based on their flexibility and biocompatibility [40,41]. The improvement proposed in this work relies, on one hand, (a) on developing a protocol that allows the formation of magnetoliposomes containing BMNPs as their magnetic core, (b) the testing on how the lipid cover affects the magnetic properties of the cores, (c) the testing of the possibility of breaking the lipid cover “on demand” and, (d) analysing the advantages in terms of hyperthermia, of using mixtures of inorganic (MNPs) and BMNPs as the core of the magnetoliposomes.

The stabilization of both MNPs and BMNPs prior to the coating was crucial to obtain magnetoliposomes. In fact, the suppression of that step led to low yield in magnetoliposome production. This finding was previously reported by other authors, who demonstrated that the stabilization of the ferrofluid suspension with acid/base substances prior to encapsulation resulted in the formation of small uni-lamellar magnetoliposomes [26,27,30,42–45]. Not only the formation of magnetoliposomes, but also the number of magnetic nanoparticles that they contain is an important aspect related with a prior

colloidal stabilization of the nanoparticle. Our protocol to stabilize the magnetic nanoparticles and to coat them with the lipid layer relies on a three-step method consisting on: (1) stabilization of the MNPs and/or BMNPs, (2) the production of a mixture of uni-lamellar magnetoliposomes with different sizes up to 500 nm, and (3) the extrusion of those magnetoliposomes to uni-lamellar magnetoliposomes of 100 nm with a low number of particles per liposome. With respect to step #1, the magnetic forces among nanoparticles that tend to aggregate the nanoparticles were compensated by increasing the repulsion electrostatic forces that exist if the particles are all charged by the same type of electric charge [46]. Since MNPs are neutral at pH 7 [46,47] and BMNPs negatively charged [17], electrostatic repulsions among them have been reinforced by means of coating them with citrate. As some authors point, citric acid may be adsorbed on the nanoparticles surface by coordinating one or two of the carboxylate functionalities, leaving, at least, one of the carboxylic acid group exposed on the surface, which makes the surface negatively charged (or reinforced this negative charge) [46–48]. Steps # 2 and #3 represent a novelty when compared to magnetoliposomes produced in previous studies [21,22,49,23–30]. Indeed, most of the methods developed so far to coat either magnetite or maghemite nanoparticles consist on sequential steps that first yield multi-lamellar magnetoliposomes that are then extruded to obtain uni-lamellar ones. The resulting magnetoliposomes usually display sizes of 100-200 nm and comprise a fairly large amount of particles inside. For example, Garnier and co-workers [26] produced maghemite magnetoliposomes with a size of 100 nm and an average number of 77 particles per liposome. For comparison, ~75% of the magnetoliposomes produced in the present study contain less than 10 particles/magnetoliposome (Fig. S2). The reduction of the number of particles in the magnetoliposomes is important in order to improve the stability, as the chances of clustering by magnetic aggregation are thus reduced [50]. In fact, as noted in Fig. 3, lipid coating improves the colloidal stability of nanoparticles in suspension.

The thickness of the non-magnetic coating is important because it could shield the magnetic properties of the magnetic core [2]. *A priori*, the production of uni-lamellar liposomes should represent an advantage with respect to producing multi-lamellar ones. Nevertheless, even uni-lamellar liposomes could shield the magnetic core. In agreement with magnetization data (Fig. 4A and B), there is a shielding of ~5% of the initial value, but the magnetoliposomes still present a magnetic saturation of 62 emu/g (MNPs-

magnetoliposomes) and 58 emu/g (BMNPs-magnetoliposomes) at 300 K. In spite of the shielding, both MNPs–magnetoliposomes and BMNPs-magnetoliposomes can be used as hyperthermia agents. However, the minimum SAR values are associated to 100% BMNPs-magnetoliposomes (Fig. 3). This can be related to the differences in chemical composition of MNPs and BMNPs and the effect on such differences on the particles rotation inside the liposome. As shown in [17], the MamC coating on BMNPs means about 4.9% of the particle mass. The MamC proteins of neighbour particles can interact in such a way that the motion of the particles (in turn, the main heat-generation mechanism from the sizes involved) becomes more difficult. The effect of bare MNPs size on the SAR values is also an important factor. Li et al. [51] have shown that for a given combination of magnetic field strength and frequency there is an optimum size interval maximising the hyperthermia achieves by both magnetic Néel and Brownian relaxations, and also by hysteresis losses. Specifically, they observed that for low field strength the highest heating efficiency was obtained for ~ 8 nm particles (mostly magnetic losses), whereas for high strength of the field, a significant contribution which adds a relaxation to achieve an optimum SAR for ~ 24 nm particle. For the experimental parameter of our hyperthermia setup (12 kA/m, 197 kHz), the theoretical optimum size for hyperthermia associated to relaxation is 14 nm [52] and if hysteresis must play a role, the size should increase up to 26 nm (according to equation in [51]). So the overall optimum range is 14-26 nm, and their includes MNPs ( $16 \pm 7$  nm) while excluding BMNPs ( $36 \pm 7$  nm) (Fig. 1). Strikingly, the samples in which both BMNPs and MNPs were mixed prior to forming the magnetoliposomes displayed the highest hyperthermia response compared to the pure component (either 100% MNPs or 100% BMNPs; Table 1 and Fig. 3). Previous studies suggest the use of nanoparticles with a broad size distribution to generate an optimized magnetic hyperthermia response [53]. The mixture of MNPs and BMNPs nanoparticles expand the size range of the nanoparticles compared to that of the pure two nanoparticles types. In addition, the system has to be stable enough to reach the effective hyperthermia temperature of tumor cells (42 – 46 °C, [37,54]), and to keep this temperature constant for a given time period [37,40,42]. All samples assayed in the present work reached the desired temperature in less than one minute and the system would be maintained stable at that temperature for 30 min (Fig. 6).

It is interesting that the combination of MNPs and BMNPs yielded the best results for the hyperthermia analyses, because it allows to take advantage of the strongest aspects

of each nanoparticle: the remarkable potential for hyperthermia of the MNPs and the ability of the BMNPs as pH-dependent nanocarriers [2,17,18,51]. In the context of the potential magnetic guidance of the magnetoliposome by means of an external magnetic field, the sample 25BMNPs-75MNPs magnetoliposomes (the composition that yielded the best results in term of hyperthermia) showed a magnetic saturation at 300 K of 155 emu/g, which is higher than the values of 58 and 62 emu/g yielded by BMNPs and MNPs magnetoliposomes, respectively.

In the context on whether or not the breakage of the liposome can be externally controlled, the effect of the applied magnetic field on the lipid cover was evaluated. While TEM images of the magnetoliposomes prior to the application of the AC magnetic field show liposomes intimately linked to magnetite crystals (Fig. 2B and C), TEM images of the magnetoliposomes following the application of the magnetic field show no evidence of the lipid cover on the nanoparticles, indicating that such a lipid cover has broken (Fig. 7). The stability of those liposomes might be compromised when these nanoparticles rotate and generate heat in response to the alternating magnetic field. Previous studies have observed a permeabilization of the lipid cover by application of an alternating magnetic field [30,45,55–57], although of the total breaking of the lipid coating was not observed in those studies as it has been observed here. This behaviour is important and could be used with advantage, since it permits to control the release of the nanoparticle from the magnetoliposome at the target site and at a specific time by an external parameter, as it is the application of the alternate magnetic field. This is fully compatible with the additional advantage of the liposome coating, namely, the fact magnetoliposomes improve internalization of the particles in the cells [20,34,37,44,58], while temperature elevation associated to hyperthermia further controls the bilayer fluidity and permeability.

## **Conclusions**

The synthesis optimization and characterization of new type of magnetoliposomes containing inorganic (MNPs) and biomimetic (BMNPs) magnetic nanoparticles have been described with the goal of combining the strengths of each one of the different nanoparticles (hyperthermia for MNPs and drug delivery for BMNPs). The target size was ~100 nm, and the number of magnetic NPs was keep moderately low (less than 10

particles per magnetoliposome) to minimize magnetic aggregation and improve stability. It was tested that the cover has a low effect on magnetic properties of magnetic core, having a shielding of ~5% on the magnetic saturation values. Respect to hyperthermia response, all the compositions prove to be useful as magnetic hyperthermia agents, capable to reach the target temperature in less than a minute and maintain it for at least 30 minutes. The best results are achieved with a mixed composition (25BMNPs-75MNPs magnetoliposomes), which expose the higher magnetic saturation values and heating rate. Moreover, the lipid coating of the magnetoliposomes breaks upon heating releasing the nanoparticles by application of the alternating magnetic field. This proof of concept opens the door for a potential application of these nanosystems as drug carriers and hyperthermia agents, in which the release of the nanoparticles could be controlled externally by the application of magnetic field of suitable frequency and strength.

## Acknowledgments

We want to thank FPU2016 grant (Ref. FPU16\_04580) from the Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte y Competitividad (SPAIN), Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 of the University of Granada, RYC-2014-16901(MINECO), MICINN, Spain (ProjectFIS2013-47666-C03-01-R) and Project PE2012-FQM-0694) This research was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2013-46612 and CGL2016-76723 projects) and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

## References

- [1] V.I. Shubayev, T.R. Pisanic, S. Jin, Magnetic nanoparticles for theragnostics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 467–477.
- [2] T. Prozorov, D.A. Bazylinski, S.K. Mallapragada, R. Prozorov, Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: Topical review, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* 74 (2013) 133–172.
- [3] V. V. Mody, A. Cox, S. Shah, A. Singh, W. Bevins, H. Parihar, Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor, *Appl. Nanosci.* 4 (2014) 385–392.
- [4] Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D-Applied Phys.* 36 (2003) R167–R181.

- [5] E. Alphandéry, S. Faure, L. Raison, E. Duguet, P.A. Howse, D.A. Bazylinski, Heat production by bacterial magnetosomes exposed to an oscillating magnetic field, *J. Phys. Chem. C*. 115 (2011) 18–22.
- [6] P.I.P. Soares, I.M.M. Ferreira, R.A.G.B.N. Igreja, C.M.M. Novo, J.P.M.R. Borges, Application of hyperthermia for cancer treatment: recent patents review., *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 7 (2012) 64–73.
- [7] Q. Li, C.W. Kartikowati, S. Horie, T. Ogi, T. Iwaki, K. Okuyama, Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles, *Sci. Rep.* 7 (2017) 9894.
- [8] C. Valverde-Tercedor, M. Montalbán-López, T. Perez-Gonzalez, M.S. Sanchez-Quesada, T. Prozorov, E. Pineda-Molina, M.A. Fernandez-Vivas, A.B. Rodriguez-Navarro, D. Trubitsyn, D.A. Bazylinski, C. Jimenez-Lopez, Size control of in vitro synthesized magnetite crystals by the MamC protein of *Magnetococcus marinus* strain MC-1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 5109–5121.
- [9] Y. Amemiya, A. Arakaki, S.S. Staniland, T. Tanaka, T. Matsunaga, Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6, *Biomaterials* 28 (2007) 5381–5389.
- [10] A. Arakaki, F. Masuda, Y. Amemiya, T. Tanaka, T. Matsunaga, Control of the morphology and size of magnetite particles with peptides mimicking the Mms6 protein from magnetotactic bacteria, *J. Colloid Interface Sci.* 343 (2010) 65–70.
- [11] T. Prozorov, S.K. Mallapragada, B. Narasimhan, L. Wang, P. Palo, M. Nilsen-Hamilton, T.J. Williams, D.A. Bazylinski, R. Prozorov, P.C. Canfield, Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals, *Adv. Funct. Mater.* 17 (2007) 951–957.
- [12] J.M. Galloway, A. Arakaki, F. Masuda, T. Tanaka, T. Matsunaga, S.S. Staniland, Magnetic bacterial protein Mms6 controls morphology, crystallinity and magnetism of cobalt-doped magnetite nanoparticles in vitro, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 15244–15254.
- [13] A. Arakaki, J. Webb, T. Matsunaga, A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 8745–8750.
- [14] R. Lopez-Moreno, A. Fernández-Vivas, C. Valverde-Tercedor, A.I. Azuaga Fortes, S. Casares Atienza, A.B. Rodriguez-Navarro, R. Zarivach, C. Jimenez-Lopez, Magnetite nanoparticles biomineralization in the presence of the magnetosome membrane protein MamC: effect of protein aggregation and protein structure on magnetite formation, *Cryst. Growth Des.* 17 (2017) 1620–1629.
- [15] H. Nudelman, C. Valverde-tercedor, S. Kolusheva, T. Perez, M. Widdrat, N. Grimberg, H. Levi, O. Nelkenbaum, G. Davidov, D. Faivre, C. Jimenez-lopez, R. Zarivach, Structure – function studies of the magnetite-biomineralizing magnetosome-associated protein MamC, *J. Struct. Biol.* 194 (2016) 1–9.

- [16] Y. Jabalera, S. Casares Atienza, A. Fernández-Vivas, A. Peigneux, A.I. Azuaga Fortes, C. Jimenez-Lopez, Protein conservation method affects mamc-mediated biomineralization of magnetic nanoparticles, *Cryst. Growth Des.* 19 (2019) 1064–1071.
- [17] G. García Rubia, A. Peigneux, Y. Jabalera, J. Puerma, F. Oltolina, K. Elert, D. Colangelo, J. Gómez Morales, M. Prat, C. Jimenez-Lopez, pH-Dependent Adsorption release of doxorubicin on MamC-Biomimetic magnetite nanoparticles, *Langmuir* 34 (2018) 13713–13724.
- [18] Functionalized biomimetic magnetic nanoparticles as effective nanocarriers for targeted chemotherapy (in press), *Part. Part. Syst. Charact.* (n.d.).
- [19] J. Sun, Y. Li, X.J. Liang, P.C. Wang, Bacterial magnetosome: a novel biogenetic magnetic targeted drug carrier with potential multifunctions, *J. Nanomater.* 2011 (2011) 1–13.
- [20] E. Alphanbéry, Applications of magnetosomes synthesized by magnetotactic bacteria in medicine, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2 (2014) 1–6.
- [21] S.J.H. Soenen, A.R. Brisson, M. De Cuyper, Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model, *Biomaterials* 30 (2009) 3691–3701.
- [22] M.S. Martina, J.P. Fortin, C. Ménager, O. Clément, G. Barratt, C. Grabielle-Madelmont, F. Gazeau, V. Cabuil, S. Lesieur, Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 10676–10685.
- [23] R. Sabaté, R. Barnadas-Rodríguez, J. Callejas-Fernández, R. Hidalgo-Álvarez, J. Estelrich, Preparation and characterization of extruded magnetoliposomes, *Int. J. Pharm.* 347 (2008) 156–162.
- [24] S. García-Jimeno, E. Escribano, J. Queralt, J. Estelrich, Magnetoliposomes prepared by reverse-phase followed by sequential extrusion: characterization and possibilities in the treatment of inflammation, *Int. J. Pharm.* 405 (2011) 181–187.
- [25] G.D. Bothun, A. Lelis, Y. Chen, K. Scully, L.E. Anderson, M.A. Stoner, Multicomponent folate-targeted magnetoliposomes: design, characterization, and cellular uptake, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 7 (2011) 797–805.
- [26] B. Garnier, S. Tan, S. Miraux, E. Bled, A.R. Brisson, Optimized synthesis of 100 nm diameter magnetoliposomes with high content of maghemite particles and high MRI effect, *Contrast Media Mol. Imaging* 7 (2012) 231–239.
- [27] B. Clares, R.A. Biedma-Ortiz, E. Sáez-Fernández, J.C. Prados, C. Melguizo, L. Cabeza, R. Ortiz, J.L. Arias, Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 329–338.
- [28] S.V. German, N.A. Navolokin, N.R. Kuznetsova, V.V. Zuev, O.A. Inozemtseva, A.A. Anis'kov, E.K. Volkova, A.B. Buchar'skaya, G.N. Maslyakova, R.F.

- Fakhrullin, G.S. Terentyuk, E.L. Vodovozova, D.A. Gorin, Liposomes loaded with hydrophilic magnetite nanoparticles: preparation and application as contrast agents for magnetic resonance imaging, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 135 (2015) 109–115.
- [29] A. Joniec, S. Sek, P. Krysinski, Magnetoliposomes as potential carriers of doxorubicin to tumours, *Chem. - A Eur. J.* 22 (2016) 17715–17724.
- [30] S. Nappini, S. Fogli, B. Castroflorio, M. Bonini, F. Baldelli Bombelli, P. Baglioni, Magnetic field responsive drug release from magnetoliposomes in biological fluids, *J. Mater Chem. Biol. Med.* 4 (2016) 716–725.
- [31] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. (Georgia) Chen, D.M. Shin, Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 1310–1316.
- [32] J.D.G. Durán, J.L. Arias, V. Gallardo, A. V. Delgado, Magnetic colloids as drug vehicles, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2948–2983.
- [33] S.J. Soenen, G. Vande Velde, A. Ketkar-Atre, U. Himmelreich, M. De Cuyper, Magnetoliposomes as magnetic resonance imaging contrast agents, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 3 (2011) 197–211.
- [34] A. Jesorka, O. Orwar, Liposomes: technologies and analytical applications, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1 (2008) 801–832.
- [35] E.C. Abenojar, S. Wickramasinghe, J. Bas-Concepcion, A.C.S. Samia, Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles, *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 26 (2016) 440–448.
- [36] R. Di Corato, A. Espinosa, L. Lartigue, M. Tharaud, S. Chat, T. Pellegrino, C. Ménager, F. Gazeau, C. Wilhelm, Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs, *Biomaterials* 35 (2014) 6400–6411.
- [37] L.H. Reddy, J.L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications, *Chem. Rev.* 112 (2012) 5818–5878.
- [38] T. Perez-Gonzalez, A. Rodriguez-Navarro, C. Jimenez-Lopez, Inorganic magnetite precipitation at 25 °C: a low-cost inorganic coprecipitation method, *J. Supercond. Nov. Magn.* 24 (2010) 549–557.
- [39] R.R. Wildeboer, P. Southern, Q.A. Pankhurst, On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials, *J. Phys. D Appl. Phys.* 47 (2014) 495003.
- [40] M. Gonzales, K.M. Krishnan, Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia, in: *J. Magn. Mater.* 293 (2005) 265–270.



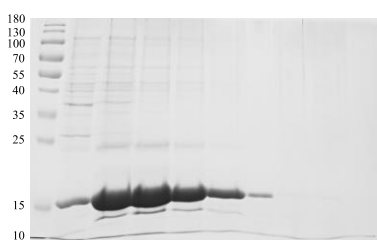
- [41] M. Babincová, P. Čičmanec, V. Altanerová, Č. Altaner, P. Babinec, AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy, *Bioelectrochemistry*. 55 (2002) 17–19.
- [42] M. Muñoz de Escalona, E. Sáez-Fernández, J.C. Prados, C. Melguizo, J.L. Arias, Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer, *Int. J. Pharm.* 504 (2016) 11–19.
- [43] P. Kulshrestha, M. Gogoi, D. Bahadur, R. Banerjee, In vitro application of paclitaxel loaded magnetoliposomes for combined chemotherapy and hyperthermia, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 96 (2012) 1–7.
- [44] G. Beálle, R. Di Corato, J. Kolosnjaj-Tabi, V. Dupuis, O. Cleent, F. Gazeau, C. Wilhelm, C. Meager, Ultra Magnetic Liposomes for MR Imaging, Targeting, and Hyperthermia, *Langmuir* 28 (2012) 11834–11842.
- [45] S. Nappini, T. Al Kayal, D. Berti, B. Nord Èn, P. Baglioni, Magnetically triggered release from giant unilamellar vesicles: visualization by means of confocal microscopy, *J. Phys. Chem. Lett.* 2 (2011) 713–718.
- [46] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R.N. Muller, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2064–2110.
- [47] E. Cheraghipour, S. Javadpour, A.R. Mehdizadeh, Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy, *J. Biomed. Sci. Eng.* 05 (2012) 715–719.
- [48] Y. Sahoo, A. Goodarzi, M. T Swihart, T.Y. Tymish, Y. Ohulchansky, N. Kaur, E.P. Furlani, P. N Prasad, Aqueous Ferrofluid of Magnetite Nanoparticles: Fluorescence Labeling and Magnetophoretic Control, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 3879–3885.
- [49] S. Lesieur, C. Grabielle-Madelmont, C. Ménager, V. Cabuil, D. Dadhi, P. Pierrot, K. Edwards, Evidence of surfactant-induced formation of transient pores in lipid bilayers by using magnetic-fluid-loaded liposomes, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5266–5267.
- [50] P.J. Vikesland, R.L. Rebodos, J.Y. Bottero, J. Rose, A. Masion, Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters, *Environ. Sci. Nano* 3 (2016) 567–577.
- [51] Z. Li, M. Kawashita, N. Araki, M. Mitsumori, M. Hiraoka, M. Doi, Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of cancer, *Mater. Sci. Eng. C*. 30 (2010) 990–996.
- [52] Z. Shaterabadi, G. Nabyouni, M. Soleymani, Physics responsible for heating efficiency and self-controlled temperature rise of magnetic nanoparticles in magnetic hyperthermia therapy, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 133 (2018) 9–19.

- [53] I. Obaidat, B. Issa, Y. Haik, Magnetic properties of magnetic nanoparticles for efficient hyperthermia, *Nanomaterials* 5 (2015) 63–89.
- [54] D.L. Huber, Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles, *Small*. 1 (2005) 482–501.
- [55] A. Salvatore, C. Montis, D. Berti, P. Baglioni, Multifunctional Magnetoliposomes for sequential controlled release, *ACS Nano*. 10 (2016) 7749–7760.
- [56] R. Spera, S. Petralito, M. Liberti, C. Merla, G. d’Inzeo, R. Pinto, F. Apollonio, Controlled release from magnetoliposomes aqueous suspensions exposed to a low intensity magnetic field, *Bioelectromagnetics* 35 (2014) 309–312.
- [57] Y. Chen, A. Bose, G.D. Bothun, Controlled release from bilayer-decorated magnetoliposomes *via* electromagnetic heating, *ACS Nano* 4 (2010) 3215–3221.
- [58] V.P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 145–160.

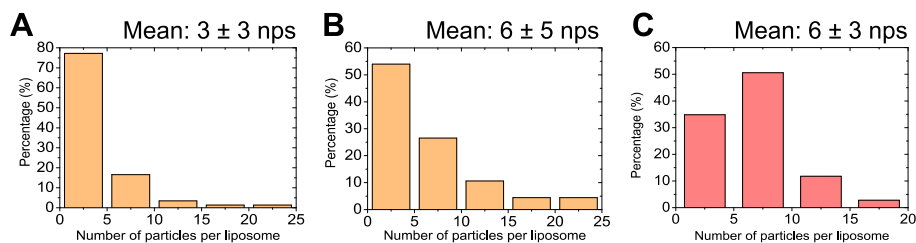
## Supporting Information

**Table S1.** ANOVA test of magnetite nanoparticles and magnetoliposomes. The difference between averages is significant when  $\alpha < 0.05$ .

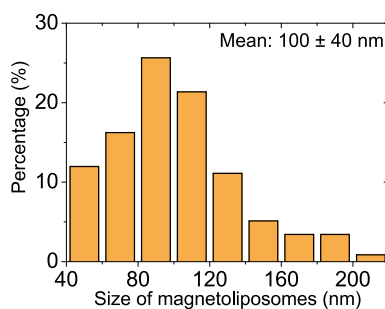
Sample		Probability	$\alpha$	Significante
MNPs	BMNPs	$3.33 \cdot 10^{-16}$	0.05	1
MNPs- magnetoliposomes (MNP:PC= 4:1)	MNPs- magnetoliposomes (MNP:PC= 8:1)	1	0.05	0



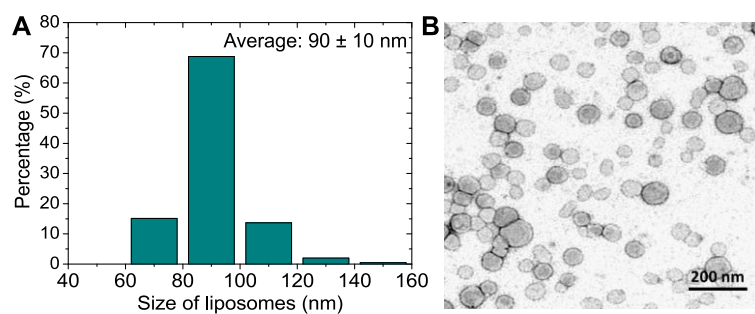
**Figure S1.** SDS-PAGE gel stained with Coomassie Brilliant Blue R250 of MamC protein (17.4 kDa).



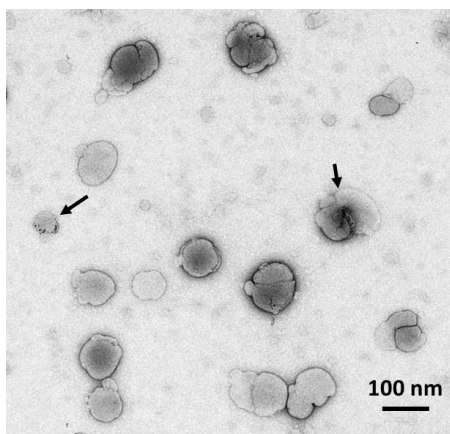
**Figure S2.** Number of particles per liposome. (A) MNPs-magnetoliposomes (MNP:PC=4:1), (B) MNPs-magnetoliposomes (MNP:PC= 8:1) and (C) BMNPs-magnetoliposomes (BMNP:PC=4:1).



**Figure S3.** Size distribution of MNPs-magnetoliposomes (MNP:PC =8:1).



**Figure S4.** Size distribution and TEM image of empty liposomes.



**Figure S5.** TEM image of MNPs-magnetoliposomes (MNP:PC=1:1). The arrows indicate the magnetoliposomes present in the image.

## **CAPÍTULO IV**



## **Huella biogeoquímica de la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) procedente de las bacterias magnetotácticas**

Alberto Pérez-Huerta<sup>1,\*</sup>, Tania Prozorov<sup>2</sup>, Concepcion Jimenez-Lopez<sup>3</sup>, Chiara Cappeli<sup>1</sup>, Ylenia Jabalera<sup>3</sup>, Alejandra Londono-Calderon<sup>2</sup>, Fernando Laiginhas<sup>1</sup> and Dennis A. Bzylinski<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Geological Sciences, University of Alabama, Tuscaloosa, Alabama 35487, USA

<sup>2</sup>Division of Material Sciences and Engineering, US DOE Ames Laboratory, Ames, Iowa 50011, USA

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Granada 18071, Spain

<sup>4</sup>School of Life Sciences, University of Nevada at Las Vegas, Las Vegas, Nevada 89154-4004, USA

\*Corresponding author.

### **Abstract**

Los cristales de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) de tamaño nanométrico (nanocristales), similares a los magnetosomas producidos por las bacterias magnetotácticas (MTB), se han utilizado como evidencia de la vida procariota temprana terrestre y extraterrestre. Las características físico-químicas de estas nanopartículas en sedimentos terrestres y meteoritos se han utilizado para distinguir la magnetita producida químicamente de la producida biológicamente. Sin embargo, la definición de una huella biológica directa para distinguir estos nanocristales de magnetita con origen biológico es un reto. En este estudio, se muestran los resultados preliminares que permitirían la determinación de dicha huella biogeoquímica. Así, se ha demostrado que mediante tomografía de sonda atómica (APT), la magnetita producida por las MTB está asociada a una clara señal de carbono que está ausente o disminuida en la magnetita producida químicamente. Esta señal sería el resultado de la presencia de componentes orgánicos intracristalinos asociados a

proteínas relacionadas con el proceso de formación del magnetosoma en las MTB, sin ser consecuencia de artefactos ligados a restos de membranas que pueden quedar de modo residual durante el proceso de preparación de muestras para su análisis. Estos resultados preliminares demuestran que la magnetita bacteriana sintetizada por las MTB se podría detectar y distinguir utilizando señales geoquímicas únicas a escala atómica encontradas dentro de los cristales de magnetita. Este hallazgo tiene importantes implicaciones para la detección de la presencia temprana de procariotas en el registro geológico de la Tierra y la posible existencia de vida en otros planetas.

## Introducción

Las huellas biogeoquímicas para la determinación del origen biogénico de magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ha sido un tema que ha generado una gran controversia en la comunidad científica en las últimas décadas. Concretamente, este aspecto es especialmente relevante en el caso de las partículas denominadas magnetofósiles (partículas de magnetita similares a magnetosomas), los cuales se han encontrado en sedimentos terrestres, así como en el meteorito marciano ALH84001. Dichas partículas se han utilizado como prueba de la presencia en el pasado de bacterias magnetotáticas (MTB) y, por tanto, de actividad microbiana en el registro fósil (1-4) e incluso en Marte (5-7). Sin embargo, a pesar de ello, los criterios y/o huellas biológicas definidos y utilizados hasta la fecha no son aceptados como criterios sólidos de manera unánime por la comunidad científica, existiendo por ello un gran debate alrededor de esta temática (5-9). Por lo tanto, se requiere la determinación de una huella biogeoquímica única en la magnetita MTB que permita distinguirla de aquellos cristales con origen químico, especialmente, cuando estos nanocristales se utilizan como prueba de la actividad microbiana vinculada a la vida en sedimentos terrestres y extraterrestres.

Tal y como se ha comentado anteriormente, existen varias huellas químicas que se han utilizado para diferenciar entre nanocristales de magnetita producidos biológicamente (por las MTB) y aquéllos producidos químicamente. Probablemente, desde un punto de vista práctico, el enfoque más sencillo sea aquel que implica la búsqueda de elementos químicos vinculados a la presencia de moléculas orgánicas dentro de la red cristalina de los cristales de magnetita. Con dicho objetivo, se han empleado diferentes metodologías, tales como la espectroscopía de rayos X por dispersión en



energía (EDXS, del inglés *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) y, más recientemente, la espectroscopía de pérdida de energía de electrones (EELS, del inglés *Electron Energy-Loss Spectroscopy*), utilizando tanto células enteras como magnetosomas purificados (10-12). A pesar de ello, el uso de la microscopía electrónica analítica avanzada para la detección de trazas de materia orgánica sigue siendo muy limitado, especialmente, para elementos ligeros como el carbono, lo que limita el análisis cuantitativo de estas muestras. Por lo tanto, los resultados de estos estudios anteriores no han logrado identificar de forma inequívoca una huella biológica en el magnetosoma y, en cambio, confirmaron que los cristales encontrados en los magnetosomas eran, en esencia, estructuralmente y estequiométricamente puros ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

Otro enfoque alternativo consiste en la búsqueda de diferencias, en términos cinéticos y en concentración total, en la incorporación de cationes extraños entre los cristales de magnetita MTB y sus contrapartes abióticos (9-11). Dichos estudios tampoco han proporcionado una huella biológica definitiva en la magnetita de las MTB, aunque se determinó que algunas MTB son capaces de incorporar iones de metales de transición distintos del hierro dentro de la red cristalina (10-11). La falta de detección se debe, probablemente, a la dificultad encontrada para determinar concentraciones absolutas de cationes diferentes al hierro que puedan estar incorporados al magnetosoma, así como a la falta de información relativa al mecanismo mediante el cual las MTB incorporan estos cationes (9, 12-14). Por último, también se ha investigado el fraccionamiento isotópico del hierro y oxígeno por parte de las MTB durante el proceso de biomineralización como posible huella biológica (8, 15).

En este Capítulo, se muestran los resultados preliminares de la aplicación de un nuevo enfoque para la caracterización directa de la composición química de los cristales de magnetita del magnetosoma de las MTB a escala atómica, utilizando la tomografía de sonda atómica (APT) (16-18), para identificar y cuantificar la presencia de moléculas orgánicas dentro de la red cristalina de la magnetita. Para ello, la hipótesis de partida se basa en que si la biomineralización de los cristales de magnetita del magnetosoma de las MTB está mediada por proteínas específicas, tal y como se ha demostrado en trabajos anteriores (19), dichas proteínas podrían imprimir el cristal con huellas biológicas de C que podrían detectarse utilizando una técnica de muy alta resolución como lo es la tomografía de sonda atómica (APT). En este contexto, la alta resolución química espacial de la APT es ideal para dimensiones a nanoescala de los cristales de magnetita de los

magnetosomas (17). De hecho, estudios anteriores en los que han aplicado esta técnica para el análisis químico de biominerales han obtenido excelentes resultados (20-22).

## Materiales y métodos

### Muestras

Con el objetivo de determinar la huella biogeoquímica de la magnetita MTB, los magnetosomas se compararon con un conjunto de nanopartículas de magnetita producidas en el laboratorio. Concretamente, se compararon con diferentes nanosistemas desarrollados en la presente Tesis Doctoral (MNPs, BMNPs, magnetoliposomas BMNPs y magnetoliposomas MNPs), los cuales se utilizaron como muestras control en la determinación y evaluación de la huella biogeoquímica de los cristales MTB. Las muestras utilizadas en este estudio y su metodología de preparación fueron las siguientes:

- a) *Magnetita bacteriana (magnetosomas)*: las nanopartículas de magnetita se obtuvieron a partir de magnetosomas procedentes de *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (10). Para obtener dichas nanopartículas, tanto el aislamiento como su posterior purificación se llevaron a cabo tras la eliminación completa de la membrana del magnetosoma. Así, una vez lisadas las células, la fracción magnética que contenía los magnetosomas se purificó utilizando un imán según la metodología descrita en Bazylnski et al. (23). Los magnetosomas se lavaron 25 veces en tampón 20 mM Tris-HCL pH 7,1. A continuación, los magnetosomas se suspendieron en tampón 20 mM Tris-HCL que contenía 1% de SDS para eliminar la membrana del magnetosoma. Esta suspensión se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente, con una agitación ocasional. Después, la suspensión se centrifugó a 14000 rpm (2 minutos, 4 °C), y el sedimento obtenido se recuperó, se secó y se almacenó bajo N<sub>2</sub> en un tubo Eppendorf hasta su preparación y análisis.
- b) *Nanopartículas de magnetita producidas en el laboratorio*: se utilizaron nanopartículas de magnetita (inorgánicas y/o biomiméticas) incluidas o no en liposomas sintetizadas en el laboratorio (24, 25), para evaluar el origen de la posible señal de carbono que pudiera encontrarse, así como para descartar posibles artefactos en la señal atribuibles al proceso de lavado de los magnetosomas descrito en el apartado (a).

Las nanopartículas magnéticas inorgánicas (MNPs) se usaron como control negativo de la señal de carbono. Se prepararon dos conjuntos de muestras: (1) muestra 1.1, que consiste en MNPs lavadas con agua y (2) muestra 2.1, que consiste en MNPs lavadas usando el mismo protocolo de lavado de magnetosomas descrito en el apartado (a). La idea era descartar que la potencial señal de carbono fuera un artefacto derivado del proceso de lavado.

La síntesis de MNPs se llevó a cabo a 25 °C y 1 atm de presión total en el interior de una cámara de anaerobiosis llena de H<sub>2</sub> 4% (24), a partir de la siguiente mezcla de reacción: 2,78 mM Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5,56 mM FeCl<sub>3</sub>, a pH = 9 (con o sin tampón carbonato a 3.5 mM). Las muestras se incubaron durante 30 días. A continuación, los sólidos se concentraron magnéticamente y se lavaron.

Con el objetivo de entender el origen biológico de la señal de carbono registrada en la magnetita bacteriana, estas nanopartículas MNPs se compararon con nanopartículas magnéticas biomiméticas (BMNPs) y con magnetoliposomas. La hipótesis era que la señal de carbono de los magnetosomas podría estar asociada a las proteínas de membrana que controlan el proceso de biomineralización o de los fosfolípidos de la membrana del magnetosoma. Para comprobar si el origen de la potencial huella de C procedía de las proteínas de membrana se usaron BMNPs como control positivo. Del mismo modo, para determinar si la señal procedía de la membrana del magnetosoma, se usaron como muestras control liposomas que contenían tanto MNPs (L-MNPs) como BMNPs (L-BMNPs). Las BMNPs se precipitaron utilizando la misma mezcla de reacción descrita para las MNPs, añadiendo tampón carbonato (3,5 mM) y la proteína recombinante MamC (10 µg/mL). La síntesis de magnetoliposomas se realizó siguiendo el protocolo de hidratación del *film* (25) descrito antes en esta Memoria. Brevemente, las nanopartículas magnéticas (MNPs precipitadas en ausencia de tampón carbonato y BMNPs, a una concentración de 12 mg/mL), se utilizaron para hidratar y dispersar la fina película lipídica compuesta por fosfatidilcolina de huevo (PC) (Avanti Polar Lipids, 6 mg/mL).

### Tomografía de sonda atómica

La caracterización a escala atómica de la composición química de los sólidos de magnetita se realizó empleando la novedosa técnica de tomografía de sonda atómica (APT del inglés *Atom Probe Tomography*), para identificar y cuantificar la presencia de

moléculas orgánicas en el interior de la red cristalina del mineral. Para ello, las muestras (denominadas “puntas de APT”) se fabricaron mediante la técnica de haz de iones focalizados (FIB del inglés *Focused Ion Beam*) descrita previamente en Thompson et al. 2007 (26). Las muestras se analizaron empleando un instrumento *LEAP 5000XS* (Cameca Instruments), equipado con un láser pulsado de fibra de picosegundos de 355 nm.

## Resultados y Discusión

Los resultados de APT proporcionan información significativa de los cristales de magnetita MTB a través de la identificación y cuantificación de picos únicos en los espectros de masas. Según los datos de los espectros obtenidos, se confirma en todas las muestras la composición general esperada de los cristales de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ya que las concentraciones atómicas de los elementos O y Fe son las más abundantes (en el caso de los magnetosomas, BMNPs y liposomas) o las únicas (en el caso de las MNPs) que se observan en los espectros (datos no mostrados).

En los magnetosomas se encontraron concentraciones relativamente altas de carbono (valor promedio del porcentaje atómico de  $10.930 \pm 0.002$ , Tabla 1), mucho más elevadas comparadas con las detectadas en las otras muestras de magnetita producida inorgánicamente, ya sea, MNPs, BMNPs, tanto desnudas como envueltas en liposomas (Tabla 1). Así, la presencia de carbono está ligada a la presencia de picos simples de  $\text{C}^+$  (12 y 13 Da) y  $\text{C}^{2+}$  (6 y 6.5 Da) y, aunque hubo variabilidad entre las diferentes puntas analizadas, todas las muestras analizadas mostraron más de un 8% atómico de concentración de carbono.

La metodología aplicada, aunque de una precisión atómica, puede introducir artefactos en la señal de carbono en algún paso. En particular, es necesario abordar el problema de la posible contaminación orgánica derivada del protocolo de aislamiento y purificación de magnetosomas y de la preparación de la muestra de APT. A continuación, se exponen algunas de las principales potenciales fuentes de contaminación. Tal y como se ha comentado anteriormente, se utilizó Tris-HCl y SDS para eliminar las membranas de los magnetosomas y extraerlos, siendo esta metodología una fuente potencial de contaminación de compuestos que contienen carbono. Para evaluar si el método de lavado dejaba residuos orgánicos en las muestras, se compararon los datos de porcentaje atómico de carbono entre los dos grupos de MNPs: uno lavado con agua (muestra 1.1) y otro

lavado siguiendo el protocolo diseñado para los magnetosomas (muestra 2.1). Los datos de la Tabla 1 indican que, a pesar de que la presencia de carbono debida al lavado no se detectó por análisis elemental en TEM, este residuo orgánico sí que se pudo detectar mediante APT, en el que la muestra 2.1 daba un valor promedio de porcentaje atómico de carbono significativamente superior al de la muestra 1.1. Este valor era de  $\sim 0,21\%$ , mientras que el de la muestra 1.1 era de  $\sim 0,04\%$ . No obstante, el residuo de carbono asociado al protocolo de lavado de los magnetosomas es 1,5 órdenes de magnitud menor que el porcentaje atómico detectado en los magnetosomas ( $\sim 11\%$ ), por lo que esta huella de carbono no puede atribuirse al protocolo de lavado.

**Tabla 1.** Comparación de la medida de la señal de carbono (para  $C^+$  en el pico 12 Da), de tres puntas (a excepción de la muestra L-MNPs de la que sólo se analizaron dos puntas), para nanopartículas de magnetita sintetizadas en el laboratorio y de los magnetosomas, donde sólo se muestra el valor promedio del porcentaje atómico.

	Señal de $C^+$	Número de átomos	Porcentaje atómico de C (%)	Error estándar
Magnetita (1.1)	3705	146	0,039	0,003
	3702	-		
	2775	537		
Magnetita (2.1)	3479	1806	0,205	0,006
	3476	209		
	3480	1277		
BMNPs	3468	1431	0,502	0,006
	2816	12817		
	2781	451		
L-MNPs	3733	9702	3,151	0,036
	3734	7001		
L-BMNPs	3489	1285	0,389	0,008
	3484	1031		
	3481	2842		
Magnetosomas (valor promedio)	-	-	10,930	0,002

Además, la medida mediante APT requiere la fabricación de puntas que contengan la muestra, de las que luego se eliminan las capas más externas y, por tanto, son más susceptibles de contaminación mediante el uso del adelgazador iónico. Al ser de tamaño nano, la fabricación de estas puntas de magnetita lleva aparejada la presencia de huecos entre los cristales, que crean una superficie porosa que podría facilitar la incorporación de carbono externo durante la preparación de las muestras por FIB. No obstante, este es un problema recurrente en todas las muestras y que puede explicar el porcentaje atómico de carbono detectado en las muestras de magnetita inorgánica lavadas con agua (~0,04%), valor que, de nuevo, se distancia mucho del detectado para los magnetosomas. Por tanto, la señal de carbono de los magnetosomas tampoco puede atribuirse a los huecos entre cristales en las puntas de APT.

Por otro lado, hay que descartar una fuente adicional de contaminación debida a la insuficiente eliminación de la membrana de la capa lipídica del magnetosoma, la cual podría ser la responsable de los resultados de la señal de carbono obtenida. De ser así, la señal de carbono del magnetosoma no podría considerarse huella biológica, ya que estos residuos orgánicos que estarían dando la señal no perdurarían con el tiempo y, por tanto, no estarían presentes en los magnetofósiles. Para comprobar qué porcentaje atómico de carbono máximo podría deberse a la membrana, se sintetizaron liposomas que contenían BMNPs (L-BMNPs) y MNPs (L-MNPs) y se analizaron mediante APT. En este caso, no se hizo ningún intento para eliminar el liposoma, ya que el objetivo era obtener valores máximos de contaminación, de manera que cualquier intento de eliminación de membrana del magnetosoma daría necesariamente, valores por debajo de estos máximos. Los datos químicos de APT, utilizando el pico a 12 Da como representante del carbono, indican claramente que el C representa sólo el ~3% para las nanopartículas L-MNPs, valor que está muy por debajo del detectado para los magnetosomas (~11%). El porcentaje atómico del carbono medido para las partículas L-BMNPs arroja un valor anómalo (~0.4%), que, probablemente, esté relacionado con la encapsulación de un mayor número de nanopartículas por liposoma, lo que disminuye el porcentaje de carbono respecto a los átomos de hierro y oxígeno dominantes. En cualquier caso, estos resultados confirman que el alto valor de porcentaje atómico de carbono observado en los magnetosomas no se debe a la presencia de la membrana residual que haya podido permanecer después del proceso de lavado.

Una vez descartada la contaminación por diferentes fuentes exógenas como responsable de la señal de carbono de los magnetosomas, la razón de la señal apunta a la presencia de orgánicos intracrystalinos. Para ello, nos basamos en los datos de las magnetitas BMNPs, en los que se ha puesto de manifiesto que MamC queda incorporada en el cristal, modificando sus propiedades (27). El porcentaje atómico de carbono detectado para BMNPs es del ~0.5%. Este valor, si bien es muy inferior que el detectado para los magnetosomas, sí apunta a que la técnica es capaz de detectar orgánicos intracrystalinos en cantidades trazas de manera directa, que ninguna de las otras técnicas (incluso TEM o HR-TEM) han podido detectar con anterioridad (27). Estos orgánicos intracrystalinos sí que suponen una huella biológica, ya que persisten con el cristal en los magnetofósiles.

Hay que tener en cuenta que las BMNPs se han producido usando sólo una proteína, MamC, pero en el magnetosoma de las bacterias magnetotácticas se han descrito muchas otras, que también intervienen en el proceso de biomineralización (19, 20, 24, 28-31). En base a los resultados obtenidos, se plantea la hipótesis de que la presencia de moléculas orgánicas dentro de los magnetosomas detectada por APT es el resultado de la incorporación de partes o proteínas enteras del magnetosoma, como MamC, Mms6 y otras que puedan intervenir en el proceso de biomineralización. La consideración de todo este conjunto de proteínas implicadas en el proceso de biomineralización y no una sola, como en el caso de BMNPs, se espera que resulte en la incorporación de una mayor cantidad de orgánicos y, por tanto, que aumente la señal de carbono del magnetosoma, tal y como manifiestan nuestros resultados.

Los resultados preliminares obtenidos en el presente estudio demuestran que la presencia de la señal química de C, en particular la presencia del dicho elemento en los estados +1 y +2, es significativamente mayor en los magnetosomas comparada con muestras de magnetita inorgánicas, biomiméticas y magnetoliposomas. Dado que se trata de un estudio preliminar, es necesario la realización de otros análisis para la confirmación de nuestra hipótesis de partida, tales como el análisis de la señal de nitrógeno, la presencia de su señal acoplada a la del carbono, así como el análisis de la distribución 3D de estos dos elementos en la reconstrucción tridimensional de las puntas. No obstante, nuestros resultados demuestran que los magnetosomas podrían reconocerse por la presencia de orgánicos intracrystalinos y que la técnica empleada, APT, es capaz de detectar esas huellas biogeoquímicas, indetectables hasta el momento, a escala atómica.

Este estudio tiene implicaciones muy relevantes para la identificación de magnetosomas y, por tanto, de actividad biogénica, en sedimentos terrestres o extraterrestres, así como en el reconocimiento de magnetofósiles.

## Agradecimientos

Este trabajo cuenta con la financiación de las becas NSF EAR-1647012 y EAR-150779, concedidas a A. P-H. T.P. agradece el apoyo del Programa de Investigación y Desarrollo Dirigido por el Laboratorio Ames. D.A.B. cuenta con la financiación EAR-1423939 de NSF. C.J-L. agradece el apoyo al proyecto CGL 2016-76723. Y.J. agradece al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de la beca FPU2016 (Ref. FPU16-04580).

## Bibliografía

1. R.E. Kopp, J.K. Kirschvink, *Earth-Science Rev.* **86**, 42 (2008).
2. J. Baumgartner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **110**, 14883 (2013).
3. R. Uebe, D. Schüler, *Nature Rev. Microbiol.* **14**, 621 (2016).
4. S-B.R. Chang, J.L. Kirschvink, *Ann. Rev. Earth Planet. Sci.* **17**, 169 (1989).
5. D.S. McKay *et al.*, *Science* **273**, 924 (1996).
6. K.L. Thomas-Keprta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 2164 (2001).
7. K.L. Thomas-Keprta, S.J. Clemett, D.S. McKay, E.K. Gibson, S.J. Wenworth, *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 6631 (2009).
8. K.W. Mandernack, D.A. Bazylinski, W.C. Shanks III, T.D. Bullen, *Science* **285**, 1892 (1999).
9. M. Amor *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **112**, 1699 (2015).
10. T. Prozorov *et al.*, *Eur. J. Min.* **26**, 457 (2014).
11. C.N. Keim, U. Lins, M. Faina, *FEMS Microbiol. Lett.* **292**, 250 (2009).
12. J. Baumgartner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **110**, 14883 (2013).
13. M. Tanaka *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3886 (2016).
14. M. Tanaka *et al.*, *J. Mater. Chem.* **22**, 11919 (2012).
15. M. Amor *et al.*, *Science* **352**, 705 (2016).
16. K.R. Kuhlman, R.L. Martens, T.F. Kelly, N.D. Evans, M.K. Miller, *Ultramicroscopy* **89**, 169 (2001).



17. D. Larson, T.F. Kelly, *Microsc. Anal.* **113**, 59 (2006).
18. M.K. Miller, R.G. Forbes, *Mater. Characteriz.* **60**, 461 (2009).
19. H. Nudelman, R. Zarivach, *Front. Microbiol.* **5**, 9 (2014).
20. L.M. Gordon, D. Joester, *Nature* **469**, 194 (2011).
21. L.M. Gordon, L. Tran, D. Joester, *ACS Nano* **6**, 10667 (2012).
22. L.M. Gordon *et al.*, *Science* **347**, 746 (2015).
23. D.A. Bazylinski, A.J. Garratt-Reed, R.B. Frankel, *Microsc. Res. Tech.* **27**, 389 (1994).
24. C. Valverde-Tercedor *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 5109 (2015).
25. Y. Jabalera, A. Fernandez-Vivas, G.R. Iglesias, A.V. Delgado, C. Jimenez-Lopez, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **183**, 110435 (2019).
26. K. Thompson, D. Lawrence, D.J. Larson, J.D. Olson, T.F. Kelly, B. Gorman, *Ultramicroscopy* **107**, 131 (2007).
27. G. García Rubia *et al.*, *Langmuir* **34**, 13713 (2018).
28. Yamagishi, K. Narumiya, M. Tanaka, T. Matsugana, A. Arakaki, *Sci. Rep.* **6**, 35670 (2016).
29. M. Tanaka, E. Mazuyama, A. Arakaki, T. Matsunaga, *J. Biol. Chem.* **286**, 6386 (2011).
30. Arakaki, D. Kikuchi, M. Tanaka, A. Yamagishi, T. Yoda, T. Matsunaga, *J. Bacteriol.* **198**, 2794 (2016).
31. H. Nudelman *et al.*, *J. Struct. Biol.* **194**, 244 (2016).



# **DISCUSIÓN**



En 1993, Stephen Mann revolucionó el concepto de la síntesis de materiales mediante la introducción del concepto de la biomimética, el aprendizaje de la propia naturaleza con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias de producción de nuevos materiales abióticos denominados biomiméticos que presentaban nuevas funcionalidades y, por lo tanto, facilitaba su uso en numerosas aplicaciones (Mann 1993). En el caso de las nanopartículas de magnetita (principal material objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral), su aplicación biotecnológica, especialmente en nanomedicina, está condicionada por sus propiedades de forma y tamaño, factores que determinan sus propiedades magnéticas y, por tanto, su respuesta a un campo magnético, así como por la presencia de grupos funcionales en su superficie que faciliten la adsorción de diferentes moléculas y que condicionan su versatilidad y aplicabilidad (Arruebo et al. 2007; El-Boubbou 2018; Laurent et al. 2008; Prozorov et al. 2013). En este aspecto, los protocolos clásicos de obtención de nanopartículas de magnetita inorgánica (MNPs), o bien no permiten ejercer un control exhaustivo sobre la morfología y/o tamaño del cristal dando lugar a nanopartículas muy pequeñas y/o polidispersas o, aquellas metodologías que sí lo ejercen, presentan un gran coste económico y un gran impacto medioambiental que imposibilita su posible escalado. En este aspecto, la química sintética biomimética se ha posicionado como una alternativa real para la obtención de nanopartículas de magnetita a través de un protocolo potencialmente escalable, rentable y ecológico (coprecipitación a 1 atm de presión y a temperatura ambiente) que permite ejercer el control sobre el tamaño y la morfología del cristal, así como dotar a las nanopartículas de grupos funcionales en su superficie. Uno de los enfoques aplicados por esta nueva aproximación es el uso de poli-aminoácidos como aditivos para el control de la síntesis de nanopartículas mediante la metodología de coprecipitación. De hecho, son varios los estudios en los que, utilizando composiciones aleatorias de poli-aminoácidos como agentes de control en el procedimiento de química sintética biomimética, se ha demostrado que características como el tamaño, la morfología, la estabilidad coloidal y, por tanto, las propiedades magnéticas de las nanopartículas de magnetita se pueden modular en función de la concentración y composición de los poli-aminoácidos utilizados como aditivos (Baumgartner et al. 2014; Lenders et al. 2015, 2017). Partiendo de esta hipótesis, en la presente Tesis Doctoral se ha abordado el estudio para la producción de nuevos cristales de magnetita mediante el uso de dos aminoácidos simples (Lisina-Lys- y Arginina-Arg-) como aditivos biológicos. Para ello, se ensayaron diferentes

concentraciones (0,1, 2 y 10 mM) de aminoácidos en experimentos de coprecipitación bajo condiciones biomiméticas y se evaluó el efecto de dichos aditivos sobre las características de los cristales híbridos obtenidos (denominados Lys-MNP o Arg-MNP).

En relación al tamaño y la morfología, los cristales Lys-MNP presentaban un tamaño mayor y unas morfologías más definidas que aquellos cristales obtenidos en el control sin aditivos (MNP-control). Por el contrario, los cristales Arg-MNP no diferían ni en tamaño ni en forma de los cristales MNP-control. La presencia de aditivos puede afectar al proceso de precipitación de los cristales (y, por tanto, las características de los mismos) al proporcionar numerosos sitios de nucleación, especialmente si dichos aditivos presentan grupos funcionales cargados negativamente y/o positivamente con capacidad de interactuar tanto con los cationes de hierro como con las superficies del cristal cargadas negativamente. En nuestro caso particular, tanto la Arg como la Lys presentan un pKa2 próximo a  $\text{pH} = 9$  (Lys 9,04, Arg 8,95),  $\text{pH}$  al que tiene lugar la precipitación de magnetita (véase sección *Materiales y Métodos*), lo que posibilita que ambos sean *zwitteriónicos* con el grupo  $\alpha$ -amino neutro, el grupo carboxilo cargado negativamente y los grupos laterales de amina (Lys) y guanidina (Arg) cargados positivamente. Así, tanto el grupo amino en su estado neutro, como el grupo carboxilo podrían interactuar débilmente con los cationes de hierro en lo que se conoce como coordinación de tipo glicina (Aliyu and Na'aliya 2012). En dicho supuesto, ambos aminoácidos podrían quelar los cationes de hierro del sistema modificando la supersaturación del mismo con respecto a la magnetita y, por lo tanto, podrían afectar al tamaño de las MNPs. Este mecanismo se conoce como efecto ionotrópico y se ha descrito previamente en el uso de poli-aminoácidos cargados negativamente (Bereczk-Tompa et al. 2017).

Por otro lado, dichos aminoácidos presentan sus cadenas laterales cargadas positivamente a  $\text{pH} 9$ . Durante el proceso de precipitación, la superficie hidratada de la magnetita permanece neutra a  $\text{pH}$  fisiológico, siendo  $\equiv\text{Fe(II,III)OH}$  la especie dominante. Al aumentar el valor del  $\text{pH}$  a valores más altos (nuestras condiciones de experimentación), la especie dominante es  $\text{Fe(II,III)O}^-$ , presentando la magnetita una superficie cargada negativamente (Sun et al. 1998). De esta manera, el grupo amonio de la Lys y el grupo guanidino de la Arg, podrían interactuar electrostáticamente con la superficie del cristal cargada negativamente, pudiendo modificar las propiedades de las MNPs resultantes. Este mecanismo, en el cual se produce la unión y estabilización de núcleos de magnetita pre-formados, es un mecanismo más específico que el efecto

ionotrópico y se ha probado y descrito previamente en estudios donde utilizaban polilisina y poli-arginina como aditivos (Baumgartner et al. 2014; Lenders et al. 2015). Por lo tanto, en un primer momento, dado que nuestros aminoácidos de interés presentan las características estructurales necesarias para ejercer ambos mecanismos de acción, se podría postular que dichos mecanismos estarían implicados en nuestro proceso de precipitación. Sin embargo, dado que se ha demostrado que la capacidad de secuestrar cationes de hierro mediante la formación de complejos de hierro entre el grupo  $\alpha$ -amina y los grupos carboxílicos de ambos aminoácidos se produce mediante una reacción de tipo isoenergético, sería el mecanismo de estabilización y unión de núcleos y no el mecanismo ionotrópico el que explicaría el diferente efecto ejercido por estos dos aminoácidos tan similares en el proceso de precipitación y, por tanto, las diferencias observadas entre los cristales Lys-MNP y Arg-MNP.

Tal y como se ha comentado anteriormente, las cadenas laterales de estos dos aminoácidos difieren. En el caso de la Lys, la basicidad de su grupo amonio es significativamente menor que la del grupo guanidino presente en la Arg. Además, dicho grupo guanidinio es capaz de formar enlaces de hidrógeno estables con grupos de oxianiones (Baker et al. 2003; Li et al. 2013b; Vazdar et al. 2013). Así, se puede postular que la capacidad de estabilización electrostática de los núcleos por parte de estos aminoácidos puede ser diferente, pudiendo afectar a la cinética del crecimiento del cristal en función de la fuerza de la unión, ya que ésta va a condicionar la liberación y disolución de núcleos más pequeños previamente unidos para la formación de núcleos más grandes. En nuestro sistema particular, donde hay limitación de hierro, en el caso de la Arg, los núcleos se encuentran fuertemente estabilizados y, probablemente, no se redisolven fácilmente, dando lugar a cristales de tamaño similar o incluso menor que los cristales MNP-control. Por el contrario, en el caso de la Lys, el efecto estabilizador es más débil, permitiendo la redisolución de los núcleos más pequeños en favor de los grandes a medida que la sobresaturación del sistema disminuye, actuando como un “tampón” de hierro, dando lugar a cristales con un tamaño mayor y con una morfología más definida.

En relación a las propiedades superficiales, los análisis termogravimétricos (TGA) mostraron que ambos aminoácidos interactúan con la superficie del cristal de magnetita. Además, el análisis de potencial- $\zeta$  mostró que tanto los cristales Lys-MNP como Arg-MNP presentaban carga negativa a pH fisiológico (pH 7,4), poniendo de

manifiesto que tal interacción se produciría, probablemente, a través de la parte básica del aminoácido, exponiendo hacia la superficie los grupos cargados negativamente, concretamente, los grupos carboxilos, tal y como se ha postulado anteriormente en el mecanismo de acción. Esta característica es muy relevante ya que posibilita que estas nanopartículas sean estables coloidalmente a través de repulsiones electrostáticas entre sus superficies (Park et al. 2009), así como puedan ser funcionalizadas mediante interacciones electrostáticas, siendo la liberación de la carga en respuesta a cambios en el pH (Mura et al. 2013).

En relación a las propiedades magnéticas, todos los cristales obtenidos mediante esta metodología de química sintética biomimética presentaban un comportamiento superparamagnético y un valor de temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) más alto que aquel mostrado por los cristales MNP-control. Los cristales Lys10-MNP (mejor condición ensayada), mostraron la  $T_B$  más alta y un aumento de magnetización más lento, características relacionadas con una gran cristalinidad, mayor tamaño y un mayor momento magnético por partícula (Prozorov et al. 2013). Estas propiedades magnéticas son muy importantes para la posible aplicación de estas nanopartículas, ya que en ausencia de un campo magnético externo las nanopartículas no presentan magnetización lo que previene su agregación magnética, mientras que son capaces de responder de manera eficiente una vez se aplique un campo magnético. Por lo tanto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que esta metodología de química sintética biomimética, concretamente aquella que utiliza el aminoácido Lys como aditivo, supone una metodología potencialmente escalable para la obtención de nanopartículas magnéticas que presenten los requisitos para su aplicación en biotecnología, especialmente, en nanomedicina.

Por otro lado, existe otra aproximación de la química sintética biomimética que ha permitido la obtención de nanopartículas con unas propiedades diferentes de aquellas obtenidas inorgánicamente mediante el método de coprecipitación. Tal y como se ha comentado en la *Introducción*, el proceso de mineralización controlada biológicamente (BCM) que tiene lugar en las bacterias magnetotácticas (MTB) da lugar a unas nanopartículas de magnetita recubiertas por una membrana lipídica, denominadas magnetosomas (Frankel and Bazylinski 2003). El alto control genético ejercido sobre el proceso de formación del magnetosoma a través de la expresión de proteínas asociadas al magnetosoma (MAPs) (Schübbe et al. 2003), proteínas responsables del proceso de



biomineralización de los cristales de magnetita, permite la producción de cristales con una características magnéticas, biológicas, químicas y físicas únicas que las convierten en la nanopartícula magnética ideal (Alphandéry 2014; Bazylinski et al. 1994; Thomas-Keprta et al. 2000). Sin embargo, a pesar de que dicho proceso tiene lugar en condiciones de temperatura ambiente y 1 atm de presión, y de las excepcionales características que estos cristales exponen, es imposible la producción de magnetosomas a nivel industrial, dadas las estrictas necesidades fisiológicas de las MTB, las cuales presentan un crecimiento muy lento y dificultoso. Todo ello, junto con la falta de conocimiento real del proceso de biomineralización, ha imposibilitado la aplicación estos cristales en nanotecnología. En este contexto, la química sintética biomimética se ha posicionado como una alternativa real y con potencial de escalado para la obtención de nanopartículas de magnetita que, si bien difieren de las ideales partículas magnéticas presentes en los magnetosomas de las MTB, sí que permite la obtención de unas nanopartículas magnéticas con unas características biológicas, químicas y magnéticas similares y con un gran potencial. Para ello, dicha aproximación implica el uso de MAPs (expresadas de manera heteróloga) o péptidos sintéticos de estas MAPs, las cuales desempeñan un papel importante en el control del tamaño y la forma en el proceso de biomineralización de los magnetosomas en las MTB, para su aplicación como aditivos biológicos en experimentos de precipitación de magnetita *in vitro* (Amemiya et al. 2007; Arakaki et al. 2010, 2003; Bird et al. 2016b; Galloway et al. 2011; Kashyap et al. 2014b; Liu et al. 2015; Lopez-Moreno et al. 2017; Nudelman et al. 2016, 2018a, 2018b; Prozorov et al. 2007a, 2007b; Rawlings et al. 2014; Valverde-Tercedor et al. 2015). De todas las nanopartículas producidas mediante esta aproximación, son de especial relevancia las nanopartículas magnéticas biomiméticas de magnetita mediadas por la proteína MamC del magnetosoma de la MTB *Magnetococcus marinus* MC-1 (referidas en esta Tesis Doctoral como BMNPs). Estas nanopartículas, cuya producción y aplicación están recogidas en la patente de nuestro grupo de investigación (referencia P201831064), son las nanopartículas biomiméticas de mayor tamaño producidas hasta la fecha, con un comportamiento superparamagnético a 300 K, compuestas por un 95% en peso de magnetita y 5% en peso de la proteína MamC, con un punto isoeléctrico (*iep*) de 4,4 y una superficie específica de 90 m<sup>2</sup>/g (García Rubia et al. 2018; Valverde-Tercedor et al. 2015). Además, son capaces de responder a un campo magnético alterno (AMF) generando una respuesta de hipertermia magnética. En su conjunto, estas características

las convierten las nanopartículas biomiméticas con mayor potencial para suplir a los ansiados magnetosomas en el campo de la nanotecnología.

En la *Introducción*, se ha expuesto que existen diferentes barreras biológicas y limitaciones de diseño racional que han frenado, hasta la fecha, la explosión de la nanotecnología en el campo de la nanomedicina a pesar de las numerosas ventajas que el uso de nanotransportadores en la liberación de fármacos ofrece. Prueba de ello es el bajo número de nanoformulaciones aprobadas por la FDA no consistentes en liposomas para su uso como nanotransportadores. Sin embargo, las características enumeradas anteriormente no sólo convierten a estas nanopartículas (BMNPs) en el principal candidato para suplir a los ansiados magnetosomas en el campo de la nanotecnología, sino que las han posicionado como un prometedor candidato en la búsqueda de nuevos materiales para el desarrollo de nuevas nanoformulaciones para su uso como nanotransportadores de fármacos con la capacidad de superar estas barreras. De esta manera, su tamaño, comprendido entre 30-40 nm, y su carga superficial (negativa pH fisiológico), permiten reducir los procesos de opsonización a través de la reducción de la interacción con las proteínas del plasma, reducir el aclaramiento renal, así como potenciar la interacción eficiente con células y su posterior internalización (Aillon et al. 2009; Alexis et al. 2008; Corot et al. 2006; Weissleder et al. 1995; Wilhelm et al. 2002).

Por otro lado, esta carga neta negativa, junto con su carácter superparamagnético, evitan la aglomeración de estas nanopartículas (Corot et al. 2006). Además, dado que son las nanopartículas biomiméticas de mayor tamaño producidas hasta la fecha, presentan uno de los mayores momentos magnéticos por partícula, lo que posibilita una respuesta eficiente a la aplicación de un campo magnético externo, permitiendo su transporte y concentración en el lugar deseado (Neuberger et al. 2005). Por otro lado, la presencia de la proteína MamC en su composición modifica las propiedades superficiales de las BMNPs, dotándoles de grupos funcionales en dicha superficie (sin necesidad de aplicarles procesos posteriores de modificación superficial que pueden afectar a las propiedades magnéticas), los cuales, junto con su gran área superficial por partícula, permiten que tengan el potencial de anclar y, por lo tanto, transportar una gran cantidad de fármaco unido a través de interacciones de tipo electrostático (García Rubia et al. 2018). Además, su capacidad de generar calor en respuesta a un AMF posibilita la aplicación de un tratamiento de hipertermia en el lugar deseado. Finalmente, en relación a sus propiedades biológicas de toxicidad y biodegradabilidad, puesto que son nanopartículas de óxido de

hierro, presentan un bajo carácter inmunoestimulador y no son tóxicas, pudiendo ser internalizadas y metabolizadas por las células (Aderem and Underhill 1999; Klausner et al. 1993; Lemke et al. 2004; Lübbe et al. 1996).

Por todo ello, dado el potencial que estas nanopartículas presentan, esta Tesis Doctoral ha pretendido desarrollar y evaluar la aplicabilidad de nanosistemas magnéticos basados en estas BMNPs como nanotransportadores y agentes de hipertermia. Con tal fin, se ha abordado el estudio y caracterización de las BMNPs como nanotransportadores de dos agentes terapéuticos (el compuesto antitumoral de nueva síntesis Ff35 y la bacteriocina AS-48) en combinación con la aplicación de un tratamiento de hipertermia magnética para el tratamiento de dos modelos de enfermedades localizadas: cáncer y enfermedades infecciosas. En un primer momento se evaluó y modeló la capacidad de carga de las nanopartículas con los dos agentes terapéuticos. Tal y como se ha comentado anteriormente, las BMNPs presentan un *iep* de 4,4, exponiendo una carga neta negativa a pH fisiológico gracias a los grupos carboxilo e hidroxilo cargados negativamente procedentes de la proteína MamC. De esta manera, estas nanopartículas posibilitan su funcionalización a través interacciones de tipo electrostático con moléculas que se encuentran cargadas positivamente a dicho pH. En el caso del compuesto antitumoral Ff35, esta molécula expone dos grupos básicos cargados positivamente y con capacidad de interaccionar con las BMNPs (Venkatesan 2017). En el caso de la bacteriocina AS-48, la forma hidrosoluble de esta molécula presenta dos hélices cargadas positivamente expuestas hacia la superficie y con capacidad de interaccionar con las BMNPs (Cebrián et al. 2015; Sánchez-Barrena et al. 2003).

Los datos de las isothermas de adsorción de ambas moléculas se ajustaron al modelo de Langmuir-Freundlich (LF), con una capacidad de carga máxima ( $Q_{max}$ ) de 0.0026 mg Ff35 ( $r = 1,5$ ,  $R^2 = 0.93$ ) y 0.064 mg de AS-48 ( $r = 3,5$ ,  $R^2 = 0.97$ ) por mg de magnetita. Este modelo introduce los efectos derivados de la heterogeneidad energética de la superficie de las BMNPs y la cooperatividad positiva existente entre las moléculas a transportar, en la cual las moléculas adsorbidas pueden interaccionar tanto con el sustrato (superficie de las BMNPs) como entre ellas, disminuyendo de esta manera la energía de adsorción de la siguiente molécula (Luo and Andrade 1998). Por lo tanto, la capacidad de carga de nuestras nanopartículas reside tanto en la formación de enlaces de tipo electrostático entre la molécula a transportar y las BMNPs, como en las uniones de tipo cooperativo que se producen entre las moléculas. Este hecho es de especial relevancia

para la potencial aplicación clínica de los nanosistemas formados en relación a su estabilidad y capacidad de transporte y liberación del fármaco en el lugar deseado. Dado que a pH fisiológico las BMNPs se encuentran cargadas negativamente, no se espera la liberación de la carga siendo el nanosistema estable durante el almacenamiento del mismo o incluso tras su administración en el torrente sanguíneo. De hecho, el estudio de la estabilidad del nanosistema AS-48-BMNPs a pH fisiológico reveló una liberación de AS-48 inferior al 7% tras 96 horas de incubación, mostrando una estabilidad muy superior a la ofrecida por otros nanosistemas que comprenden bacteriocinas (Heunis et al. 2011; Radaic et al. 2020). Por el contrario, una vez se modifica el pH ambiental y éste se aproxima al *iep* de las BMNPs (pH ácido), la estabilidad del nanosistema se ve comprometida liberando la carga. En nuestras dos enfermedades modelo a estudiar, nuestro nanosistema sería capaz de transportar de manera estable la carga a través del torrente sanguíneo y, una vez llegase al lugar deseado, sería capaz de liberar la carga en respuesta a estímulos internos tales como el pH ácido que se localiza en el microambiente tumoral y/o en compartimentos celulares ácidos como lisosomas-endosomas, o en infecciones bacterianas como consecuencia de la fermentación anaerobia y procesos de inflamación (Deng et al. 2011; Min et al. 2010; Mura et al. 2013; Radovic-Moreno et al. 2012). Por otro lado, el recubrimiento de las BMNPs con estas moléculas no afectó a las propiedades magnéticas de las mismas, manteniendo los nuevos nanosistemas (Ff35-BMNPs y AS-48-BMNPs) un comportamiento superparamagnético y valores de saturación magnética similares a los de BMNPs, posibilitando esto su respuesta eficiente a un campo magnético externo.

En relación al mecanismo de acción de nuestro primer agente terapéutico, el compuesto Ff35, éste constituye un inhibidor del enzima colina quinasa  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ). Las investigaciones recientes han puesto de manifiesto que el metabolismo de la colina se encuentra asociado al inicio, desarrollo y progresión de tumores. Debido a ello, este enzima es considerada como un biomarcador de la progresión tumoral y carcinogénesis, posicionándose como una de las dianas terapéuticas más prometedoras en el cáncer (Cao et al. 2016; Glunde et al. 2011; Iorio et al. 2016).

Sin embargo, a pesar de su potencial, el uso de compuestos inhibidores de este enzima se encuentra comprometido debido a los efectos secundarios adversos derivados de la inhibición de la toma de colina y el impedimento de la síntesis de acetilcolina (Arlauckas et al. 2016; Sola-Leyva et al. 2019). Este hecho se puso de manifiesto en los

experimentos *in vitro* realizados en este estudio. Al evaluar la toxicidad de la molécula en la línea celular derivada de hepatoblastoma humano HepG2, se observó que la molécula inhibía el crecimiento celular de una manera dependiente de concentración, siendo su  $IC_{50}$   $6.23 \pm 0.39 \mu\text{M}$  tras 24 horas. Las causas de esta inhibición se producían por los dos mecanismos descritos anteriormente: (1) el mecanismo por el cual la molécula fue diseñada, es decir, la inhibición del enzima  $\text{ChoK}\alpha 1$  con un  $IC_{50}$   $0.46 \pm 0.079 \mu\text{M}$ ; (2) así como, por el indeseable mecanismo de la inhibición de la toma de colina, causante de los efectos adversos. En este contexto, se observó que, a una concentración de Ff35  $1 \mu\text{M}$  y tras 10 minutos de exposición, la toma de colina se inhibía un 75%, siendo este efecto mucho más agudo tras 48 horas de exposición. Por lo tanto, los resultados indicaron claramente que nuestra molécula modelo inhibía fuertemente tanto la actividad como la toma de colina, siendo la suma de estos dos mecanismos la causante de la disminución de la proliferación celular.

Interesantemente, al analizar los datos de citotoxicidad e inhibición de la toma de colina bajo las mismas condiciones pero en presencia de las BMNPs y del nanosistema Ff35-BMNPs, se obtuvieron resultados muy diferentes. En relación a la citotoxicidad, se comprobó la citocompatibilidad de las BMNPs en la línea HepG2, tal y como se había demostrado en estudios anteriores utilizando otras líneas celulares (García Rubia et al. 2018; Jabalera et al. 2019). Por el contrario, al recubrir las BMNPs con el compuesto dando lugar al nanosistema Ff35-BMNPs, éste sí era capaz de inhibir la proliferación celular mostrando resultados similares de inhibición a aquéllos obtenidos con el fármaco soluble. Al analizar el mecanismo por el cual se ejercía dicho efecto citotóxico, se observó que la exposición del nanosistema Ff35-BMNPs durante 10 min, no producía ningún cambio significativo en la toma de colina, así como que, tras 48 horas de exposición, sólo se observaba una ligera inhibición en comparación con las células control. De esta manera, se probó que el transporte de la molécula Ff35 utilizando las BMNPs como nanotransportador reducía de manera significativa el efecto secundario de la toma de colina sin afectar al efecto antiproliferativo del compuesto a la misma concentración. Los análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) confirmaron este hecho. En dichos análisis, no se observó ningún daño celular ultraestructural tras la internalización de las BMNPs, resaltando la biocompatibilidad celular de las BMNPs a la dosis testada. Por el contrario, las células tratadas con el nanosistema mostraron una notable alteración ultraestructural poniendo de manifiesto el daño ocasionado por el compuesto

internalizado. En ambos casos, se demostró que tanto las BMNPs como el nanosistema Ff35-BMNPs eran internalizados vía endocitosis, evitando así los transportadores dependientes de colina. Por lo tanto, mientras que la molécula soluble requiere de un transportador de colina para internalizarse en la célula, el nanosistema es capaz de entrar en la célula vía endocitosis, transportando el compuesto a través de una vía independiente de transportadores de colina, evitando así, la inhibición de la toma de esta molécula y los consiguientes efectos adversos. En consecuencia, el transporte de la molécula Ff35 utilizando las BMNPs como nanotransportador incrementa su especificidad inhibiendo y/o reduciendo el mecanismo por el cual la molécula soluble produce los efectos secundarios adversos, posibilitando todo ello la potencial aplicación clínica de este tipo de moléculas, la cual de otra manera no sería posible.

Finalmente, dado los resultados preliminares indicativos de efectos sinérgicos y/o aditivos entre quimioterapia e hipertermia y, aprovechando la capacidad de las BMNPs de responder a un AMF, se evaluó el efecto del tándem Ff35-hipertermia magnética. La aplicación de un AMF incrementó la citotoxicidad tanto de las BMNPs como de Ff35-BMNPs. En el caso de las BMNPs, tras la exposición de un AMF, especialmente tras 2 o 3 horas de tratamiento, se produjo una disminución significativa de la viabilidad (70%) revelando el efecto citotóxico de la hipertermia magnética. Dado que la concentración de nanopartículas utilizada no era suficiente para generar un incremento de temperatura macroscópico, este efecto citotóxico se habría producido, tal y como han demostrado otros estudios, a través del incremento nanométrico de temperatura (efecto conocido como “local-termia”) o por el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cazares-Cortes et al. 2019; Clerc et al. 2018; Creixell et al. 2011; Domenech et al. 2013; Sola-Leyva et al. 2020). En relación al efecto citotóxico del nanosistema, su combinación con un AMF incrementó la citotoxicidad celular en comparación con los valores obtenidos en ausencia de AMF, resaltando el efecto sinérgico y/o aditivo entre quimioterapia e hipertermia magnética, tal y como han señalado diferentes autores (Alvarez-Berríos et al. 2013; Ren et al. 2012; Willerding et al. 2016). Concretamente, la aplicación de un AMF no sólo produce su efecto a través del daño mecánico, la generación de ROS o el incremento local de temperatura, sino que también podría potenciar la liberación del compuesto en las células, tal y como se ha demostrado para otros compuestos (Iglesias et al. 2018). En resumen, el uso de BMNPs como nanotransportador del compuesto Ff35 en la enfermedad localizada modelo del

cáncer (modelo aplicable a otros inhibidores de ChoK $\alpha$ 1), incrementa las funcionalidades de dichas moléculas al inhibir los efectos adversos provocados por las mismas, así como potenciar su efecto citotóxico en las células tumorales tras la aplicación de una terapia dual basada tanto en su capacidad para transportar y liberar la molécula en el lugar deseado, como en su capacidad para responder a estímulos externos (AMF).

Continuando con nuestra segunda molécula modelo estudiada, la bacteriocina AS-48, ésta constituye un péptido catiónico cíclico de 70 residuos de longitud, producido por *Enterococcus faecalis*, el cual presenta un fuerte efecto bactericida sobre las bacterias Gram-positivas y otros patógenos humanos (Abengózar et al. 2017; Galvez et al. 1991; Martín-Escolano et al. 2020; Martínez-García et al. 2018). La molécula en solución se organiza en dos formas diméricas en función del entorno físico-químico: la forma hidrosoluble dimérica I (DF-I), en la que las moléculas están unidas por interacciones hidrofóbicas, y la forma hidrofóbica dimérica II (DF-II) en la que las moléculas están unidas por interacciones hidrofílicas (Cebrián et al. 2015; Sánchez-Barrena et al. 2003). En relación a su mecanismo de acción, su efecto bactericida se produce a través del avance producido por interacciones de tipo electrostático y la acumulación de la forma DF-I en la membrana celular (cargada negativamente), seguido de la disociación de la molécula a la forma DF-II, lo que da lugar a la inserción en la bicapa lipídica y la formación de poros. Por el contrario, las bacterias Gram-negativas muestran una resistencia natural a AS-48, debido a la presencia de la membrana externa, requiriendo de un daño sub-letal previo de esta membrana para sensibilizarlas a AS-48 (Gálvez et al. 1989; Maqueda et al. 2004). Los ensayos *in vitro* en cultivos plantónicos en ausencia de AMF utilizando la molécula acoplada a las BMNPs (AS-48-BMNPs) demostraron que el nanosistema preservaba el efecto bactericida de la bacteriocina sobre todas las bacterias Gram-positivas probadas (*E. faecium*, *E. faecalis* y *Staphylococcus aureus*). Además, también puso nuevamente de manifiesto la citocompatibilidad de las BMNPs, tal y como sucedía en el estudio descrito anteriormente utilizando cultivos de células eucariotas. Curiosamente, el comportamiento de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* fue muy similar al de las bacterias Gram-positivas, en el cual no se detectó crecimiento tras 15 minutos de tratamiento. Por el contrario, el nanosistema ralentizó el crecimiento de las dos bacterias Gram-negativas restantes analizadas (*Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*). Sin embargo, en estos dos últimos casos se seguían detectando células viables tras 90 minutos de tratamiento. Por lo tanto, estos ensayos en

ausencia de AMF demostraron la capacidad de las BMNPs para transportar y concentrar eficazmente la bacteriocina AS-48 hasta la superficie bacteriana, probablemente impulsada por las interacciones de tipo electrostático entre la pared celular y el nanosistema (Qu et al. 2019; Vihodceva et al. 2021). Una vez allí, los resultados obtenidos demuestran que la molécula sería capaz de inhibir totalmente y de manera rápida el crecimiento de las bacterias Gram-positivas analizadas y de *E. coli*, siendo esta inhibición parcial para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. En relación a los ensayos *in vitro* realizados en presencia del nanosistema en combinación con un AMF, los resultados obtenidos fueron muy diferentes. En este caso, no se detectó ningún crecimiento tras 15 minutos de tratamiento tanto para las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas. Estos resultados son de especial relevancia en comparación con aquéllos obtenidos en los experimentos *in vitro* en presencia de un AMF y BMNPs libres (en ausencia de AS-48), en los que se observó que la hipertermia magnética no presentaba un efecto bactericida claro.

En base a los diferentes resultados obtenidos en las distintas condiciones ensayadas, se propuso el siguiente posible mecanismo de acción del nanosistema. Tal y como se ha comentado anteriormente y, en base a los resultados obtenidos en estudios previos (Qu et al. 2019; Vihodceva et al. 2021), el nanosistema, en respuesta a un campo magnético externo, sería capaz de transportar y concentrar la molécula AS-48 en el lugar deseado, siendo capaz de transportarla a la inmediatez de la pared celular impulsado por interacciones de tipo electrostático. Una vez allí, la desorción (parcial o total) de la molécula AS-48 facilitaría el cambio de la forma DF-I a DF-II y su inserción en la membrana celular bacteriana (Cebrián et al. 2015; Sánchez-Barrena et al. 2003). En este escenario, existen dos interacciones electrostáticas que compiten en la interfaz de la pared celular bacteriana: (1) la interacción electrostática entre AS-48 y la pared celular; y (2) la interacción entre AS-48 y las BMNPs. Si la primera de ellas es predominante, se favorecería la liberación de AS-48 y la formación de poros. De hecho, el pH ácido que rodea a la membrana celular como consecuencia del metabolismo bacteriano, reduce la carga neta de las BMNPs, debilitando la segunda interacción y permitiendo la liberación de AS-48. Así, bajo estas condiciones, las moléculas de AS-48 que se encuentran más alejadas de la superficie de las BMNPs se desprenderían fácilmente, continuando con las capas internas del nanosistema hasta alcanzar el equilibrio. Además, tal y como se ha comentado anteriormente, la aplicación de un AMF potenciaría este desprendimiento



como consecuencia del aumento de la energía térmica de las BMNPs, la cual debilitaría aún más la interacción electrostática (García Rubia et al. 2018; Jabalera et al. 2019; Peigneux et al. 2019). Esta hipótesis se confirma con los resultados obtenidos en los ensayos con bacterias Gram-negativas. Así, el nanosistema es capaz de ejercer su acción antibacteriana frente a *E. coli* (fermentación ácido-mixta y, por lo tanto, un pH más bajo), a cualquier temperatura, presentando un efecto antibacteriano leve frente a *K. pneumoniae* (fermentación butilenglicólica y que, además, dispone de una cápsula donde el EPS dificultaría aún más la eficacia de AS-48) y un efecto insignificante frente a *P. aeruginosa* (metabolismo respiratorio). Sin embargo, la aplicación del tratamiento de hipertermia magnética permitió superar estas barreras, presentando el nanosistema un efecto bactericida rápido y potente frente a todas las bacterias ensayadas.

Esta conclusión se confirmó gracias a los resultados obtenidos en un segundo ensayo realizado utilizando bacterias Gram-negativas. En dicho ensayo, se añadieron diferentes concentraciones de AS-48 soluble a cultivos expuestos previamente a un AMF en presencia de BMNPs. En todos los casos, se observó una sorprendente reducción del crecimiento bacteriano en una manera dependiente de concentración. En el caso de *E. coli* y *K. pneumoniae*, los resultados fueron muy similares y mostraron que las BMNPs expuestas a AMF son capaces de reducir ligeramente el recuento celular, probablemente, debido a daños estructurales en la membrana celular externa (tal y como se ha demostrado previamente en estudios en células eucariotas, (Sola-Leyva et al. 2020)) y/o por la rotura de la cápsula en el caso de *K. pneumoniae*, pero sin capacidad de ejercer una muerte celular notable. Por lo tanto, la exposición a un AMF sería capaz de superar las diferencias en el valor de pH condicionadas por los diferentes tipos de metabolismo bacteriano y/o la protección de la cápsula en *Klebsiella*, lo que resulta en un efecto bactericida idéntico al observado en *E. coli*. En el caso de la tercera bacteria Gram-negativa, *P. aeruginosa*, los resultados obtenidos fueron notablemente diferentes. En este caso, las BMNPs en combinación con un AMF parecen tener un efecto bactericida, efecto potenciado cuando se combina con AS-48. Así, las BMNPs en combinación con un AMF, podrían alterar localmente la membrana externa comprometiendo la viabilidad celular, ya sea por un aumento local de la temperatura y/o por un daño mecánico local debido a la rotación de las nanopartículas (Sola-Leyva et al. 2020). En consecuencia, esta alteración facilitaría la entrada de AS-48 alcanzando la membrana celular y ejerciendo una acción bactericida más fuerte. Por lo tanto, en nuestro mecanismo de acción propuesto, el nanosistema AS-

48-BMNPs, además de crear altas dosis locales de AS-48, sería capaz de potenciar el efecto antibacteriano de AS-48 frente a bacterias Gram-negativas a través de la alteración de las estructuras celulares inducida por las BMNPs bajo la influencia de un AMF.

En resumen, al igual que sucedía con el modelo propuesto anteriormente mediante el uso del compuesto Ff35 en el contexto del tratamiento de la enfermedad modelo del cáncer, la inmovilización de la molécula AS-48 sobre las BMNPs, en combinación con la capacidad de estas nanopartículas de responder a un AMF, potencia la funcionalidad de la molécula teniendo efecto sobre bacterias Gram-negativas. Este resultado no se ha observado con anterioridad y pone de manifiesto el potencial de la sinergia entre los dos tratamientos (terapia antibacteriana dirigida e hipertermia magnética), constituyendo una alternativa innovadora como terapia potencial contra infecciones. Además, es importante destacar que las bacterias *E. faecium* y *E. coli* utilizadas en el estudio, son resistentes a vancomicina y a  $\beta$ -lactámicos, respectivamente, lo que refuerza aún más la idoneidad y el potencial de este tratamiento para su aplicación en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias resistentes a antibióticos.

Los estudios descritos anteriormente han demostrado que la capacidad de las BMNPs como nanotransportadores de fármacos es innegable. Sin embargo, a pesar de tener la capacidad de responder a la aplicación de un AMF, muchas de las características que potencian su habilidad como nanotransportador, merman su potencial como agentes de hipertermia. Por un lado, el recubrimiento de la proteína MamC compromete la rotación de las BMNPs, ya que la presencia de MamC en las nanopartículas, podría propiciar la interacción entre diferentes nanopartículas vecinas, lo que dificultaría el movimiento de dichas nanopartículas. Por otro lado, su mayor tamaño las posiciona fuera del rango óptimo para la obtención de una respuesta magnética maximizada a través de los mecanismos de pérdida de histéresis y relajación (Néel y Brown) (García Rubia et al. 2018; Li et al. 2010; Nudelman et al. 2016).

Por el contrario, las MNPs (nanopartículas de magnetita inorgánica) han demostrado ser excelentes agentes de hipertermia gracias a su pequeño tamaño (< 30 nm), el cual optimiza su respuesta de hipertermia magnética a través de los mecanismos mencionados anteriormente (Li et al. 2010). Este hecho se comprobó a través de los análisis de respuesta de hipertermia magnética realizados utilizando nanopartículas MNPs y BMNPs. Dichos análisis mostraron que, si bien ambas eran capaces de alcanzar

la temperatura efectiva de hipertermia en pocos segundos (42–46 °C (Huber 2005; Reddy et al. 2012)), la tasa de incremento de temperatura y, por tanto, la eficiencia de la respuesta fue mayor en el caso de las MNPs, tal y como revelaron los valores de tasa de absorción de calor específica (SAR) obtenidos. Así, para los valores máximos de frecuencia e intensidad de campo magnético ensayados, las MNPs y BMNPs mostraron un SAR de  $87 \pm 6$  y  $47 \pm 3$  W/g, respectivamente. Sin embargo, a pesar de ser unos excelentes agentes de hipertermia, las MNPs no son buenos nanotransportadores debido a su menor tamaño, el cual compromete el momento magnético por partícula y, por tanto, la eficiencia de guía magnética (Li et al. 2017), así como su superficie neutra dificulta los procesos de funcionalización con la molécula de interés, requiriendo de la adición de grupos funcionales que comprometen el ya de por sí poco eficiente momento magnético por partícula (Arruebo et al. 2007; El-Boubbou 2018).

En base a estas características, se realizó el diseño de un nuevo nanosistema que combinara y potenciara las ventajas individuales cada nanopartícula en una misma nanoformulación. En un primer momento, se analizó el efecto de la combinación de los dos tipos de nanopartículas sobre la capacidad de respuesta de hipertermia magnética de las diferentes nanoformulaciones. De las dos combinaciones ensayadas (25% BMNPs + 75% MNPs (25 B + 75 M) y 60% BMNPs + 40% MNPs (60 B + 40 M)), aquella que dio lugar a una mayor respuesta de eficiencia magnética fue la nanoformulación 25 B + 75 M. Concretamente, dicha nanoformulación expuso los valores máximos de SAR ( $96 \pm 2$  W/g), valores superiores a aquéllos expuestos por las MNPs y BMNPs bajo las mismas condiciones experimentales. Algunos estudios han demostrado que suspensiones de nanopartículas con distribuciones de tamaño amplias dan lugar a una respuesta de hipertermia magnética óptima, ya que, en este caso, se maximiza la probabilidad de que un porcentaje de las nanopartículas del sistema se encuentre siempre girando en respuesta a un determinado AMF (Obaidat et al. 2015). Este fenómeno explicaría el incremento en los valores de SAR obtenidos para nuestro sistema mixto, en el cual se combinan nanopartículas magnéticas de hasta 70 nm, presentando una distribución de tamaño más amplia en comparación con la distribución de las BMNPs y/o MNPs de manera individual (hasta 30 nm en MNPs y 70 nm en BMNPs). En consecuencia, al ampliar los valores de la distribución de tamaño, se incrementa el porcentaje de nanopartículas con capacidad de responder al AMF en comparación con el de las nanoformulaciones compuestas por

un solo tipo de nanopartícula, lo que se traduce en un aumento de temperatura más eficiente en nuestra nanoformulación de estudio.

Además, se analizaron otras propiedades de dicha nanoformulación. En relación a las propiedades magnéticas, la nanoformulación 25 B + 75 M mostraba el mayor valor de saturación magnética (70 emu/g, en comparación con los valores de 66 y 55 emu/g mostrados por MNPs y BMNPs, respectivamente) y la mayor  $T_B$  (180 K en comparación con los valores de 103 y 145 K mostrados por MNPs y BMNPs, respectivamente), así como preservaba el comportamiento superparamagnético a 300 K. En relación a las propiedades de estabilidad coloidal, la nanoformulación 25 B + 75 M mostró la mayor estabilidad coloidal, entendida como el tiempo necesario para que la muestra sedimente. Este hecho podría ser el resultado de un efecto estabilizador mediado por la interacción entre las MNPs (de menor tamaño) y las BMNPs. Así, las MNPs podrían intercalarse entre las BMNPs y potenciar la repulsión de ambos tipos de nanopartículas incrementando la estabilidad de la nanoformulación (Sanz et al. 2015). Además, este incremento en la estabilidad coloidal de la mezcla estaría relacionado con el incremento en los valores de SAR mencionados anteriormente, ya que la agregación afecta negativamente a la rotación de las nanopartículas bajo la influencia de un AMF y, en consecuencia, al incremento de temperatura en base a esta respuesta.

Por lo tanto, esta nueva nanoformulación no sólo permite combinar las ventajas individuales de las BMNPs y MNPs en una sola nanoformulación, sino que además incrementa y/o potencia la respuesta de hipertermia magnética de la misma en comparación con la respuesta obtenida bien por MNPs bien por BMNPs, así como mejora las propiedades magnéticas y de estabilidad coloidal de las mismas.

Una vez se determinó la combinación óptima de nanopartículas que potenciaba la respuesta de hipertermia magnética, se evaluó la capacidad de la nanoformulación desarrollada como nanotransportador de fármacos. Para ello, se seleccionó el agente quimioterapéutico modelo Doxorubicina (DOXO), dado su amplio espectro de actividad antitumoral (Beretta and Zunino 2007). Además, con el fin de mejorar la capacidad de transporte activo de la nanoformulación al sitio diana y como complemento a la habilidad de las BMNPs de responder a un campo magnético externo (orientación magnética), se puede aplicar la estrategia del uso de ligandos como anticuerpos monoclonales (mAb) o péptidos localizados en la superficie del nanotransportador, los cuales reconocen

específicamente biomarcadores expresados de manera específica en las células tumorales. De hecho, se ha demostrado que la combinación de estas dos estrategias, en lo que se define como mecanismo de doble guía, resulta en un incremento de la capacidad guía del nanotransportador al sitio diana (Peigneux et al. 2019; Schleich et al. 2014). En consecuencia, las BMNPs se conjugaron con el anticuerpo monoclonal AR-3, elegido como modelo de ligando dada su reactividad frente a un biomarcador expresado en diferentes tipos de carcinomas, en particular, aquéllos del tracto gastro-entérico, denominado CAR-3 y formado por una molécula similar a la mucina con un peso molecular de 400 kDa, siendo su epítipo de naturaleza carbohidratada (Prat et al. 1989, 1985). Así, se realizó el diseño de un nanosistema multifuncional (denominado 25 TBM + 75 M) compuesto por MNPs (M) y BMNPs funcionalizadas tanto con DOXO como el mAb AR-3 (nanoformulación denominada TBM) y se evaluó su potencial como nanotransportador de fármacos mediante doble guía (orientación magnética y anticuerpos monoclonales) y con capacidad de combinar dos enfoques terapéuticos (quimioterapia dirigida y la hipertermia magnética).

La funcionalización de las BMNPs se realizó en base a las características superficiales que la proteína MamC confiere a estas nanopartículas descritas anteriormente. Así, al valor de pH al que se realiza la funcionalización, las BMNPs están cargadas negativamente, mientras que el mAb AR-3 se encuentra cargado positivamente y la DOXO también muestra esta carga positiva gracias a la exposición de los grupos  $\text{-NH}_3^+$  en solución, lo que posibilita el acoplamiento de estas dos moléculas a las BMNPs en base a uniones de tipo electrostático. De hecho, se obtuvo una eficiencia de funcionalización del 50% en el caso del mAb AR-3 y del 80% en el caso de la DOXO. Por otro lado, la presencia de estas dos moléculas en la nanoformulación 25 TBM + 75 M no afectó a la capacidad de respuesta de hipertermia magnética ni a la estabilidad coloidal de la misma. De esta manera, la nanoformulación mostró la mayor estabilidad coloidal en comparación con aquella obtenida por las formulaciones compuestas por MNPs (M) o BMNPs funcionalizadas con ambas moléculas (TBM), así como mostró valores de SAR similares a aquéllos obtenidos por la nanoformulación sin funcionalizar bajo condiciones experimentales similares ( $86 \pm 4$  frente a  $96 \pm 2$  W/g).

En relación a la capacidad de la nanoformulación como nanotransportador del agente quimioterapéutico DOXO, éste preservó aquellas características que previamente habíamos observado para las BMNPs en su evaluación como nanotransportadores de las

moléculas Ff35 y AS-48 descritas en los modelos anteriores. De esta manera, la nanoformulación presentó una liberación inferior al 2% tras 75 min de incubación a pH fisiológico, indicando la estabilidad de la nanoformulación a este pH. Por el contrario, la incubación de la nanoformulación a pH 5, valor que mimetiza el ambiente presente en el compartimento endosomal/lisosomal (Geisow and Evans 1984; Mura et al. 2013), dio lugar a un incremento en la liberación de DOXO de más del 25%. Este porcentaje de liberación se incrementó aún más, hasta el 44%, cuando se aplicó un tratamiento AMF en combinación con pH ácido. Estos resultados indican una sinergia existente entre el pH ácido y el AMF sobre la liberación de fármaco transportado. Al tratarse de una unión de tipo electrostático, valores de pH altos previenen la liberación de la DOXO unida de las BMNPs (cargadas negativamente), mientras que valores de pH cercanos al *iep* de las BMNPs debilitan esta unión desencadenando la liberación de la molécula. Además, la aplicación de un AMF potencia este desprendimiento como consecuencia del aumento de la energía térmica de las BMNPs, la cual debilitaría aún más la interacción electrostática (García Rubia et al. 2018; Jabalera et al. 2019; Peigneux et al. 2019). Sin embargo, este incremento de energía térmica no es suficiente para romper el enlace electrostático a valores de pH fisiológico (la liberación de DOXO aumentó del 2 al 5% tras la aplicación del AMF), mientras que, a valores de pH ácido, sí que es suficiente para debilitar este enlace una vez que la superficie de las BMNPs ya no es tan negativa.

Tal y como se ha comentado en la *Introducción*, este efecto potenciador de la liberación de fármacos inducido por la combinación de estímulos externos (hipertermia magnética) e internos (pH ácido) ya ha sido demostrado previamente por otros autores utilizando diferentes fármacos y nanotransportadores magnéticos. Dicho efecto justifica el desarrollo y aplicación de nuestro nanosistema como una plataforma multifuncional en la que la eficacia del tratamiento podría incrementarse combinado las dos terapias de liberación de fármacos e hipertermia magnética y que, además, permitiría su transporte y concentración a través de una estrategia de doble guía (orientación magnética y anticuerpos monoclonales). Con tal fin, se evaluó la toxicidad y citocompatibilidad de la nanoformulación, de sus respectivos componentes, así como de su homólogo sin funcionalizar (25 B + 75 M) en la línea celular de carcinoma de colon HT-29, la cual expresa el biomarcador reconocido por el mAb AR-3. Los resultados demostraron que las BMNPs, MNPs y la nanoformulación 25 B + 75 M son citocompatibles con valores de viabilidad celular superiores al 80% en todos los casos (INTERNATIONAL

STANDARD 2009). Por el contrario, tanto la muestra TBM como la nanoformulación 25 TBM + 75 M mostraron una toxicidad significativa. Concretamente, para dosis más altas de DOXO, aquéllas presentes en la muestra TBM, no se observaron diferencias con respecto a la misma cantidad de DOXO soluble. En el caso de dosis más bajas de DOXO, aquéllas presentes en la nanoformulación 25 TBM + 75 M, éstas presentaron una toxicidad menor en comparación aquella toxicidad obtenida para la misma cantidad de DOXO soluble (Iafisco et al. 2013; Oltolina et al. 2019; Shi et al. 2009).

En relación a los estudios de toxicidad en presencia de un AMF, todas las muestras y nanoformulaciones ensayadas (M, TBM y 25 TBM + 75 M) mostraron una reducción significativa de la viabilidad en comparación con las células control. Además, a pesar de que la muestra TBM presentaba una mayor cantidad de DOXO que la nanoformulación 25 TBM + 75 M, ésta última presentó una disminución de la viabilidad más significativa, reducción condicionada, probablemente, por la mayor respuesta de hipertermia magnética generada por esta nanoformulación en comparación con la muestra TBM. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la combinación de dos tipos de nanopartículas para la generación de un nanosistema multifuncional con una capacidad de respuesta de hipertermia magnética y de direccionalidad mejoradas, permite incrementar la eficacia del tratamiento local utilizando una menor cantidad de fármaco gracias a la sinergia existente entre estas dos terapias, hecho el cual constituye una de las bases que justifica y respalda la aplicación de la nanotecnología en el campo de la nanomedicina.

Continuando con la línea del desarrollo y caracterización de nanosistemas que mejoren y potencien las capacidades intrínsecas expuestas por las nanopartículas de magnetita, especialmente, las de las BMNPs, se abordó el estudio de uno de los elementos cruciales para la aplicabilidad biotecnológica de estas nanopartículas, su estabilización para la obtención de ferrofluidos coloidales magnéticos estables frente a la agregación. En este contexto, dentro de todas las estrategias utilizadas para el recubrimiento y estabilización de nanopartículas magnéticas, destaca la encapsulación de las mismas en liposomas para la formación de magnetoliposomas. Este recubrimiento se ha demostrado que mejora la estabilidad de las nanopartículas, facilita la funcionalización de éstos con numerosas sustancias bioactivas para la obtención de nanosistemas multifuncionales muy flexibles, protege al agente terapéutico transportado por las nanopartículas, disminuye las interacciones con las proteínas del plasma, así como incrementa la internalización, biocompatibilidad y biodegradabilidad de las nanopartículas (Babincová et al. 2002; Cho

et al. 2008; Durán et al. 2008; Gonzales and Krishnan 2005). En consecuencia, se optimizó un protocolo para el recubrimiento de nanopartículas de magnetita (MNPs, BMNPs y el nanosistema mixto que combina ambas) y se evaluó el efecto de dicho recubrimiento en la respuesta magnética, así como su efecto en la respuesta de hipertermia magnética del núcleo magnético encapsulado. El protocolo de encapsulamiento, basado en tres pasos claves (estabilización de las nanopartículas magnéticas con ácido cítrico para incrementar las repulsiones electrostáticas, producción de una mezcla de magnetoliposomas de diferentes tamaños mediante el método de hidratación del *film* y, finalmente, la extrusión de esta mezcla para la unificación de su tamaño) permitió la obtención de magnetoliposomas unilaminares de 100 nm que presentaban un bajo número de partículas por liposoma (menor de 10). Las características de los magnetoliposomas obtenidos contrastaban con aquéllas mostradas por otros estudios que aplicaban metodologías similares, en los que se obtuvieron magnetoliposomas de 100 nm y una media de 77 partículas por liposoma (Garnier et al. 2012). Esta reducción del número de partículas por liposoma es importante para la mejora de la estabilidad coloidal, ya que disminuye las posibilidades de agrupación por agregación magnética (Vikesland et al. 2016). De hecho, la presencia de la capa lipídica incrementó la estabilidad coloidal de las nanopartículas en suspensión en comparación con la estabilidad expuesta por las nanopartículas desnudas. Por otro lado, el grosor del recubrimiento no magnético es otro factor limitante dado que podría tener un efecto de apantallamiento de las propiedades magnéticas del núcleo magnético (Prozorov et al. 2013). Debido a ello, la producción de magnetoliposomas unilaminares frente a aquéllos multilaminares es una opción preferente y determinante. Además, incluso en el caso de los liposomas unilaminares, dicha capa puede ejercer dicho efecto de apantallamiento. Así, los datos de magnetización obtenidos demostraron hay un ligero efecto negativo en las propiedades magnéticas de las nanopartículas recubiertas, mostrando un apantallamiento del 5% en comparación con los valores obtenidos por las nanopartículas desnudas. Por otro lado, al igual que sucedía en los estudios descritos anteriormente, la nanoformulación 25 B + 75 M recubierta por la membrana lipídica (denominada magnetoliposomas 25BMNPs-75MNPs) potenció la respuesta magnética de la nanoformulación presentando el mayor valor de saturación magnética a 300 K, seguido por las muestras de magnetoliposomas de MNPs y BMNPs. Además, en todos los casos, las nanoformulaciones mostraron un comportamiento superparamagnético a 300 K.



En relación a la capacidad de respuesta de hipertermia magnética de las nuevas nanoformulaciones, el recubrimiento lipídico tiene un bajo impacto sobre esta propiedad. De esta manera, los valores de SAR obtenidos para las nuevas nanoformulaciones fueron similares a aquéllos expuestos por las mismas composiciones de núcleo magnético sin recubrir bajo condiciones experimentales similares, presentando la nanoformulación compuesta por magnetoliposomas 25BMNPs-75MNPs la mayor respuesta de hipertermia magnética. Además, en relación a la capacidad de las nanoformulaciones de alcanzar la temperatura de hipertermia y mantenerla constante durante un periodo de tiempo (Gonzales and Krishnan 2005; Muñoz de Escalona et al. 2016; Reddy et al. 2012), todas las nanoformulaciones ensayadas en este estudio alcanzaron la temperatura efectiva en menos de un minuto y la mantuvieron de manera estable durante, al menos, 30 minutos. Finalmente, se evaluó el efecto de la respuesta del núcleo magnético a la presencia de un AMF sobre el recubrimiento lipídico.

Un dato muy notable es el mostrado por las imágenes de microscopía electrónica que revelan que, tras la exposición de los magnetoliposomas a un AMF, la cubierta lipídica desaparece indicando su rotura. De esta manera, la estabilidad de la cubierta podría verse comprometida cuanto estas nanopartículas giran y generan calor en respuesta al AMF. De hecho, estudios previos han observado la permeabilización de la cubierta lipídica tras la aplicación de un AMF (Chen et al. 2010; Nappini et al. 2016, 2011; Salvatore et al. 2016; Spera et al. 2014). Esta característica supone una ventaja, ya que permitiría controlar la liberación de la nanopartícula (y, por tanto, la carga de la misma) del magnetoliposoma mediante control remoto, en el sitio deseado y en un momento determinado en respuesta a un estímulo externo (AMF). En resumen, este estudio constituye la primera prueba de concepto para la mejora de la nanoformulación desarrollada en los dos estudios anteriores (25 TBM + 75 M), a través de un diseño que preserve la estrategia de combinar las ventajas de ambos tipos de nanopartículas, pero, que además, mejore sus funcionalidades gracias al recubrimiento lipídico en el que el fármaco transportado por las BMNPs esté protegido en el interior de la capa lipídica decorada con un anticuerpo. En este diseño ideal, los magnetoliposomas cargados con la mezcla 25 TBM + 75 M y decorados con un mAb, serían dirigidos hacia el sitio diana mediante el mecanismo de doble guía para, una vez allí y en respuesta al estímulo externo (AMF), liberar el núcleo magnético de composición mixta, el cual ejercería su efecto a través de la combinación sinérgica de las dos terapias descritas en el estudio anterior.

Sin embargo, a pesar del potencial y de todas las ventajas que las BMNPs ofrecen (ya sea de manera individual o en combinación con las MNPs), a día de hoy, no se ha abordado uno de los aspectos clave que constituyen la principal barrera tecnológica para la traslación y aplicación de estas nanopartículas: el escalado de la producción de las mismas (Shi et al. 2017). A pesar de que el proceso de la química sintética biomimética para su obtención sea un procedimiento *a priori* sencillo, reproducible, económico, sostenible y potencialmente escalable, el hecho de que se utilice como aditivo una proteína de membrana expresada de manera heteróloga, la proteína MamC, incrementa la complejidad del escalado al añadir nuevos factores condicionantes que constituyen uno de los cuellos de botella de este procedimiento: la producción y conservación de la proteína. Tal y como se ha comentado en la *Introducción*, MamC es una proteína de membrana constituida por dos dominios transmembrana helicoidales conectados por un bucle con estructura en  $\alpha$ -hélice (Nudelman and Zarivach 2014). En relación a su posible mecanismo de acción, si bien todavía no se ha conseguido descifrar el mecanismo de acción específico de la proteína sobre el cristal, sí que se ha postulado que podría ejercer su efecto a través de dos mecanismos complementarios. En el primero de ellos, al igual que ocurría con las regiones cargadas negativamente de los poli-aminoácidos utilizados como aditivos biológicos en la aproximación descrita al principio de este apartado (Bereczk-Tompa et al. 2017), las regiones ácidas localizadas en las regiones C-terminal y en el bucle podrían unir cationes de hierro creando sitios locales de sobresaturación con respecto a la magnetita, favoreciendo de esta manera la nucleación de esta fase mineral (Kashyap et al. 2014a; Nudelman and Zarivach 2014; Valverde-Tercedor et al. 2015). Por otro lado, en relación al segundo mecanismo, conocido como efecto molde, los aminoácidos Asp70 y Glu66 localizados en la estructura helicoidal del bucle tendrían un papel fundamental en la interacción de la proteína con el cristal. De hecho, se ha demostrado que la distancia entre estos dos aminoácidos coincide con la distancia entre planos atómicos de hierro en varias caras de la magnetita (Nudelman et al. 2016; Subagyo and Sueoka 2007). Además, en los estudios realizados por Nudelman et al. 2018b, Lopez-Moreno et al. 2017 y Ubago-Rodríguez et al. 2019 se puso de manifiesto que si la estructura de la proteína, especialmente la región del bucle, se ve alterada de algún modo, las BMNPs resultantes son indistinguibles de aquellas obtenidas inorgánicamente. Por todo ello, se requiere la definición de una metodología de conservación de esta proteína que permita preservar las características de conformación, estado de agregación y funcionalidad de la misma con la finalidad de obtener lotes de nanopartículas de un

volumen mayor y reproducible, como un primer paso hacia el escalado de la producción de estas nanopartículas.

En base a ello, se analizaron diferentes metodologías de conservación (crioconservación, liofilización y refrigeración) evaluando su efecto en la conformación y estado de oligomerización de la proteína, así como evaluando el efecto en la funcionalidad de la misma mediante el análisis de la morfología y tamaño de los cristales obtenidos en su presencia. Los análisis de dicroísmo circular (CD) revelaron el mismo espectro para todas las metodologías de conservación utilizadas, poniendo de manifiesto que MamC preservaba su conformación de estructura secundaria en  $\alpha$ -hélice (Nudelman and Zarivach 2014). Sin embargo, sí que se apreciaron diferencias en los análisis de dispersión de luz dinámica (DLS). De acuerdo con el estudio realizado por Wilkins et al. 1999, el radio hidrodinámico del estado monomérico de la proteína MamC en forma globular varía entre 2 nm para una conformación compacta hasta 3.6 nm en un conformación extendida. Así, los radios hidrodinámicos comprendidos entre 3-5, 6-10 y 15-25 nm, pueden considerarse como monómeros, dímeros y trímeros, respectivamente. De esta manera, los resultados de DLS mostraron que el 90% de las especies presentes en la muestra control y en la muestra MamC N<sub>2</sub> (muestra crioconservada) presentaban un estado monomérico, el 100% de la especie de la muestra MamC Lyo (muestra liofilizada) mostraba un estado trimérico y, en el caso de las muestras de refrigeración (MamC 15, 30 o 60 days), el 90% de las especies mostraban un estado dimérico. Dadas las diferencias encontradas en los estados de oligomerización, se evaluó cómo dicho estado afectaba a la funcionalidad de la proteína mediante el análisis de los cristales obtenidos. Los cristales producidos en presencia de MamC N<sub>2</sub> mostraron tamaños y morfologías similares a aquéllos obtenidos en la muestra MamC Control, mientras que las muestras obtenidas en presencia de la proteína conservada mediante refrigeración o liofilización, si bien sí que preservaban morfologías similares a aquéllas expuestas por la muestra control, su tamaño era menor. Estos resultados se encuentran alineados con los resultados expuestos en el trabajo de Lopez-Moreno et al. 2017, donde se observó que los cristales más grandes y facetados se obtenían en presencia del estado monomérico activo de la proteína. En dicho estado, la proteína muestra el plegamiento funcional óptimo para la precipitación de las nanopartículas de magnetita, exponiendo correctamente los aminoácidos clave Glu66 y Asp70, así como exhibiendo una superficie extendida

implicada en la formación de la magnetita (Nudelman et al. 2018b, 2016; Ubago-Rodríguez et al. 2019).

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que los diferentes estados de agregación podrían afectar, o incluso suprimir, el efecto molde mediante diferentes mecanismos (Lopez-Moreno et al. 2017; Nudelman et al. 2018b, 2016; Ubago-Rodríguez et al. 2019): (1) modificando la orientación espacial de los aminoácidos Glu66 y Asp70, (2) ocultando estos residuos, y/o (3) evitando la interacción del bucle con la superficie de la magnetita mediante impedimentos estéricos. En resumen, dado que MamC es una proteína de membrana, cuando se encuentra en una solución acuosa, su tendencia es a blindar los aminoácidos hidrofóbicos presentes en su estructura. De esta manera, la proteína se encuentra en un equilibrio entre diferentes estados de asociación variando entre el monomérico al trimérico, estados que se van a ver modificados en función de la metodología de conservación aplicada. En el caso de la liofilización, a pesar de que se ha descrito como una buena metodología para la conservación de proteínas (Manning et al. 2010), existen numerosas etapas del proceso que generan estrés en la proteína, especialmente los diferentes pasos de deshidratación, conduciendo a un cambio en el estado de agregación con un desplazamiento del equilibrio hacia la especie trimérica inactiva, en la que el entorno del bucle se encuentra comprometido sin posibilidad de ejercer su efecto. En el caso de la refrigeración a 4 °C, con el transcurso del tiempo la proteína pasa de un estado monomérico a un estado dimérico (comprometiendo parcialmente el ambiente del bucle) y, finalmente, a un estado trimérico, el cual parece constituir el estado de asociación más estable de la proteína MamC en un medio acuoso en ausencia de detergente o estabilizador. Por el contrario, la crioconservación, la cual ha sido descrita como una buena alternativa para la conservación de proteínas a largo plazo dado el bajo estrés sufrido por la proteína tras la aplicación de tasas de enfriamiento muy rápidas (Bhatnagar et al. 2007; Carpenter et al. 1993; Pikal-Cleland and Carpenter 2001), sí que es capaz de mantener el correcto estado de conformación y agregación de la proteína y, por tanto su funcionalidad, siendo ésta última la metodología propuesta para solventar el problema del escalado de las síntesis de BMNPs.

Finalmente, dado que las BMNPs se han obtenido tomando como inspiración el proceso de bioimineralización de las MTB a través del proceso de la química sintética biomimética, estas nanopartículas conservan y/o mimetizan algunas de las propiedades presentes en los magnetosomas. Debido a ello, estas nanopartículas, en conjunto con

otros nanosistemas desarrollados en la presente Tesis Doctoral (MNPs, magnetoliposomas BMNPs y magnetoliposomas MNPs), se utilizaron como muestras control en la determinación y evaluación de la huella biogeoquímica de los magnetosomas, mediante el uso de la metodología de tomografía con sonda atómica (APT). Este estudio, donde la contribución de esta Tesis Doctoral se basó en la producción de las muestras descritas anteriormente, se llevó a cabo en la Universidad de Alabama y fue dirigido por el Dr. Pérez-Huerta.

Tal y como se ha comentado en la *Introducción*, la determinación de una huella biológica definitiva que permita distinguir los cristales MTB de aquéllos producidos de manera abiótica, ha sido tema de discusión y controversia en la comunidad científica en las últimas décadas. De todas las metodologías desarrolladas, el enfoque con mayor potencial es aquel centrado en la búsqueda de moléculas orgánicas en el interior de la red cristalina de la magnetita de los magnetosomas (los denominados “criterios químicos”). Estos elementos constituirían la huella biológica de estos cristales y serían el resultado del efecto ejercido por las MAPs en el proceso de síntesis de magnetosoma. En este contexto, se abordó el estudio de la existencia de señales (huellas biológicas) de carbono en los magnetosomas a escala atómica mediante la técnica APT y se comparó con la señal obtenida en cristales de magnetita y magnetoliposomas biomiméticos sintéticos o producidos inorgánicamente, con el fin de evaluar la potencial aplicación de esta técnica en la identificación de la huella biológica de los cristales MTB.

La metodología APT es una técnica que permite el análisis a escala atómica de la composición química de los cristales de magnetita, proporcionando información relevante en base a la identificación y cuantificación de picos únicos en los espectros de masas (Gordon et al. 2015, 2012; Gordon and Joester 2011; Kuhlman et al. 2001; Miller and Forbes 2009). En base a ello, los resultados obtenidos mostraron que los magnetosomas estaban compuestos principalmente por O y Fe a concentraciones atómicas similares a aquéllas expuestas por los cristales de magnetita sintética. Sin embargo, se encontraron concentraciones relativamente altas de C (estados +1 y +2), señales no encontradas en las muestras producidas inorgánicamente, las cuales constituían el ~11% de la concentración atómica.

Como se ha comentado anteriormente, con el fin de validar la metodología de APT para la determinación de la huella biológica de los cristales MTB, así como descartar que

dicha señal fuera resultado de la suma de varios artefactos y/o contaminaciones durante la preparación de las muestras, se comparó la señal éstos con la de diferentes tipos de cristales, nanopartículas y nanosistemas compuestos por magnetita (algunos de ellos desarrollados y caracterizados en la presente Tesis Doctoral). Concretamente, el protocolo experimental para la preparación y análisis de los cristales MTB presentaba dos fuentes principales de contaminación: (1) la contaminación orgánica producida durante el protocolo de aislamiento y purificación de los magnetosomas y la preparación de la muestra de APT; y (2) la insuficiente eliminación de la membrana lipídica de los magnetosomas, la cual podría dar lugar a una señal de C.

Para descartar la primera fuente potencial de contaminación, se analizó la señal de muestras de nanopartículas de magnetita inorgánicas (MNPs), separadas en dos lotes, uno sin tratar y otro tratado siguiendo el mismo protocolo aplicado para la extracción de los magnetosomas. Los análisis de APT revelaron la presencia de picos de C (+1), pero en concentraciones de, al menos, un orden de magnitud menor, probablemente, condicionadas por la síntesis de estas nanopartículas en material de vidrio.

En relación a la segunda fuente potencial de contaminación, los restos de la membrana lipídica del magnetosoma podrían también contribuir a esta señal de carbono en los magnetosomas. Para descartarlo, se analizaron muestras de magnetoliposomas de magnetita inorgánica (L-MNPs) y magnetita biomimética (L-BMNPs) y se analizó su señal de C. Los datos obtenidos mostraron porcentajes atómicos de carbono muy inferiores a aquéllos obtenidos en los magnetosomas, excluyendo la posibilidad de esta contaminación. En base a estos resultados, se podría afirmar que la señal C presente en los magnetosomas obtenida mediante APT, es el resultado de la presencia de componentes orgánicos intracristalinos incorporados dentro de la red del cristal de magnetita, tal y como se ha demostrado previamente en el estudio realizado por Gordon and Joester 2011, donde se observó una señal C en los cristales de magnetita presente en dientes de quitón.

En relación al origen de estos componentes orgánicos, éstos podrían ser el resultado de la incorporación de las MAPs (total o parcialmente) implicadas en el proceso de síntesis de magnetosomas en las MTB. De hecho, recientemente se ha sugerido como hipótesis, aunque sin evidencia experimental, que proteínas que intervienen en el proceso de biomineralización podrían incorporarse en la estructura cristalina (Arakaki et al. 2016;

Nudelman et al. 2016; Tanaka et al. 2011; Yamagishi et al. 2016). En el caso de las BMNPs mediadas por MamC, aunque no se ha podido determinar de manera directa la presencia de MamC asociada/incorporada al cristal de magnetita, su presencia se ha podido demostrar por el cambio en las propiedades magnéticas y superficiales de la nanopartícula biomimética (García Rubia et al. 2018; Valverde-Tercedor et al. 2015).

Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que los magnetosomas pueden identificarse y distinguirse directamente mediante huellas químicas presentes a escala atómica (señal C, en particular, la presencia de ambos elementos en los estados +1 y +2), y que la técnica empleada, APT, es capaz de ponerlos de manifiesto, constituyendo esta señal única una potencial nueva huella biogeoquímica de los magnetosomas con numerosas implicaciones en el ámbito de la astrobiología y geomicrobiología.





# **CONCLUSIONES**



De acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se exponen las siguientes conclusiones.

- I. La crioconservación es la única metodología efectiva para la correcta conservación de la proteína MamC, que facilitaría el posible escalado de la síntesis de nanopartículas magnéticas biomiméticas de magnetita mediadas por la proteína MamC (BMNPs). Dicha metodología permite conservar la estructura funcional de la proteína, así como preservar el estado monomérico activo de la misma.
- II. La arginina no ejerce control sobre el tamaño de los cristales de magnetita. Por el contrario, la lisina controla el tamaño de los cristales obtenidos, probablemente, mediante la estabilización de los núcleos por el grupo lateral amonio. Los cristales Lys10-MNP tienen un tamaño promedio de 30 nm, presentan carga negativa a pH 7,4 (punto isoeléctrico igual a 4), son superparamagnéticos a temperatura ambiente y muestran un gran momento magnético por partícula, así como una alta saturación de magnetización. Esta metodología de síntesis utilizando el aminoácido de lisina como aditivo biológico supone una alternativa económica al uso de proteínas y poli-aminoácidos para el escalado industrial de la producción biomimética de nanopartículas de magnetita.
- III. La unión cooperativa del inhibidor del enzima colina quinasa  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ) Ff35 a las BMNPs incrementa la especificidad del fármaco por su diana terapéutica, facilitando la internalización celular del mismo y evitando su interacción con la captación de colina. El uso combinado del nanosistema (Ff35-BMNPs) y la hipertermia magnética incrementa el efecto citotóxico del mismo como consecuencia del incremento local de temperatura, así como, previsiblemente, por la inducción de la liberación del agente terapéutico.
- IV. La unión cooperativa de la bacteriocina AS-48 a las BMNPs presenta un fuerte efecto bactericida sobre bacterias Gram-positivas y, sorprendentemente, sobre *Escherichia coli*. El uso combinado del nanosistema (AS-48-BMNPs) y la hipertermia magnética incrementa el espectro de acción de la bacteriocina mostrando un fuerte y rápido efecto bactericida sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. El mecanismo de acción revela un efecto potenciador en la liberación del fármaco como consecuencia del efecto aditivo de la hipertermia magnética y del pH ácido localizado en la superficie bacteriana, derivado del daño

- a estructuras celulares causado por la rotación de las BMNPs, que permite que AS-48 alcance la diana y ejerza su función antibacteriana.
- V. La combinación en una misma nanoformulación de nanopartículas de magnetita inorgánicas (MNPs) y BMNPs, especialmente, la mezcla compuesta por 25% BMNPs + 75% MNPs incrementa la respuesta de hipertermia magnética en comparación con la respuesta obtenida cuando la nanoformulación está compuesta de manera exclusiva por un tipo de nanopartículas magnéticas.
- VI. Las nanopartículas BMNPs se pueden funcionalizar mediante unión electrostática con doxorubicina (DOXO) y el anticuerpo monoclonal AR-3, siendo esta unión estable a pH fisiológico. La combinación de estas nanopartículas funcionalizadas (TBM) con MNPs en la proporción 25% TBM + 75% MNPs da lugar a un nanosistema multifuncional capaz de ser guiado al sitio diana mediante la aplicación de un mecanismo de doble guía (anticuerpo monoclonal y orientación magnética) y que incrementa la eficacia de su efecto citotóxico *in vitro* mediante la combinación de una mejora en la respuesta de hipertermia magnética del nanosistema y la liberación localizada y controlada del fármaco en respuesta a estímulos internos (pH) y externos (incremento local de temperatura en respuesta al campo magnético alterno -AMF-).
- VII. El protocolo de hidratación del *film* genera magnetoliposomas compuestos por BMNPs y/o MNPs con un tamaño de 100 nm y con un bajo número de partículas por liposoma. El recubrimiento lipídico de las nanopartículas incrementa la estabilidad coloidal de las mismas con un bajo impacto en las propiedades magnéticas del núcleo magnético en términos de saturación magnética, así como en la respuesta de hipertermia magnética de las nanoformulaciones. Además, se ha comprobado que, tras la aplicación del AMF, dicho recubrimiento se rompe liberando las nanopartículas al medio, posibilitando de esta manera el control remoto de la liberación de las nanopartículas mediante la aplicación de estímulos externos (AMF).
- VIII. Los cristales de magnetita producidos por las bacterias magnetotácticas (MTB) pueden distinguirse directamente de aquellos cristales con origen abiótico o biomimético mediante el uso de huellas químicas a escala atómica mediante APT. La señal acoplada de carbono, especialmente, la presencia de dicho elemento en los estados +1 y +2, es significativamente más alta en los magnetosomas comparada con el resto de muestras inorgánicas o biomiméticas analizadas, y

supone el descubrimiento de una nueva huella biogeoquímica de estos cristales para su aplicación en la determinación e identificación de magnetofósiles.



## **CONCLUSIONS**





In agreement with the results obtained during the development of this Doctoral Thesis, the following conclusions are presented:

- I. Cryopreservation is the unique effective methodology for the right conservation of MamC protein and the possible scale-up of the synthesis of MamC protein-mediated biomimetic magnetic magnetite nanoparticles (BMNPs). This methodology allows to maintain the protein functional structure, as well as, to preserve its active monomeric state.
- II. Arginine does not exert control over the magnetite crystals size. On the other hand, lysine is able to control the size of crystals obtained, probably, through the stabilization of the magnetite nuclei by its lateral ammonium group. Lys10-MNP crystals show an average size of 30 nm, are negative charged at 7.4 (with isoelectric point of 4), superparamagnetic at room temperature and expose a fairly large magnetic moment per particle, as well as, a high magnetic saturation. This approach using lysine as biological additive provides an economical alternative to the use of proteins and polyamino acids for the biomimetic production scale-up of magnetite nanoparticles.
- III. The cooperative binding of choline kinase  $\alpha 1$  (ChoK $\alpha 1$ ) inhibitor Ff35 to BMNPs increases the drug specificity for its therapeutic target, thus easing its internalization and avoiding the interaction with choline uptake. The combined use of Ff35-BMNPs nanosystem and magnetic hyperthermia increases the nanosystem cytotoxic effect, as a consequence of the local temperature increment, as well as, probably, by triggering the release of the therapeutic agent.
- IV. The cooperative binding of AS-48 bacteriocin to BMNPs shows a strong bactericidal effect against Gram-positive bacteria and, surprisingly, against *Escherichia coli*. The combined use of AS-48-BMNPs nanosystem and magnetic hyperthermia amplifies the spectrum of peptide action exposing a strong bactericidal effect against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The mechanism of action reveals a potentiating effect on the drug release due to the additive effect of magnetic hyperthermia and the acidic pH located at bacterial surface, probably caused by the damage of cell structure by the BMNPs rotation that allows AS-48 to reach the target.
- V. The mixture of inorganic magnetic nanoparticles (MNPs) and BMNPs in the same nanoformulation, in particular, that mixture composed of 25% BMNPs + 75%

MNPs, improves the magnetic hyperthermia response compared to those responses obtained by nanoformulations composed of only one type of magnetic nanoparticles.

- VI. BMNPs can be functionalized with doxorubicin (DOXO) and monoclonal antibody AR-3 by electrostatic interaction, being this binding stable at physiological pH. The mixture of these functionalized nanoparticles (TBM) and MNPs using the proportion 25% TBM + 75% MNPs results in a multifunctional nanoplatform. This multifunctional platform is able to be guided to the target site by the application of a dual guidance (monoclonal antibodies and magnetic orientation) and increases the efficacy of its *in vitro* cytotoxic effect through the combination of a nanosystem enhanced magnetic hyperthermia response and the controlled localized drug release in response to internal (pH) and external stimuli (local temperature increment induced by the response to the alternating magnetic field –AMF-).
- VII. Thin film hydration preparation method results in the production of magnetoliposomes composed of BMNPs and/or MNPs with a size of 100 nm and with a low number of particles per liposome. The nanoparticles lipid coating improves their colloidal stability and has a low impact on the nuclei magnetic properties, in terms of magnetic saturation and magnetic hyperthermia response. After the application of AMF, this lipid coating is broken releasing the nanoparticles into the environment, which thus possibilities to remote control the release of nanoparticles through the application of external stimuli (AMF).
- VIII. The magnetite crystal produced by magnetotactic bacteria (MTB) can be directly distinguished from those crystals of abiotic or biomimetic origin by atomic-scale chemical biosignatures detected by APT. The carbon signal, in particular, the presence of this element at +1 y +2 states, is significantly higher in magnetosomes compared to that of the other inorganic and/or biomimetic magnetites analyzed, and yields the discovery of a new biogeochemical fingerprinting for its application in the magnetofossils determination and identification.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abengózar, M.Á., Cebrián, R., Saugar, J.M., Gárate, T., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Rivas, L., 2017. Enterocin AS-48 as evidence for the use of bacteriocins as new leishmanicidal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e02288-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02288-16>
- Abenojar, E.C., Wickramasinghe, S., Bas-Concepcion, J., Samia, A.C.S., 2016. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **26**, 440–448. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2016.09.004>
- Abu Bakar, M., Tan, W.L., Abu Bakar, N.H.H., 2007. A simple synthesis of size-reduce magnetite nanocrystals via aqueous to toluene phase-transfer method. *J. Magn. Magn. Mater.* **314**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2007.01.018>
- Aderem, A., Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Ahn, H.K., Jung, M., Sym, S.J., Shin, D.B., Kang, S.M., Kyung, S.Y., Park, J.W., Jeong, S.H., Cho, E.K., 2014. A phase II trial of Cremorphor EL-free paclitaxel (Genexol-PM) and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **74**, 277–282. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2498-5>
- Aillon, K.L., Xie, Y., El-Gendy, N., Berkland, C.J., Forrest, M.L., 2009. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.010>
- Akai, J., Iida, A., Akai, K., Chiba, A., 1997. Mn and Fe minerals of possible biogenic origin from two Precambrian stromatolites in Western Australia. *J. - Geol. Soc. Japan* **103**, 484–488. <https://doi.org/10.5575/geosoc.103.484>
- Albanell, J., Baselga, J., 1999. Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer. *Drugs of Today* **35**, 931–946.
- Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R.J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S., Lubbe, A.S., 2000. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.* **60**, 6641–6648.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., Farokhzad, O.C., 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **5**, 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Alexis, F., Pridgen, E.M., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2010. Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.* **197**, 55–86. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_2)
- Aliyu, H.N., Na'aliya, J., 2012. Potentiometric studies on transition metal(II) essential amino acid complexes. *Glob. Adv. Res. J. Microbiol.* **1**, 72–78.
- Allen, T.M., 2002. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 750–763. <https://doi.org/10.1038/nrc903>
- Allen, T.M., 1994. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(94\)90314-x](https://doi.org/10.1016/0165-6147(94)90314-x)
- Alphandéry, E., 2014. Applications of Magnetosomes Synthesized by Magnetotactic Bacteria in Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2**, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00005>
- Alvarez-Berríos, M.P., Castillo, A., Mendéz, J., Soto, O., Rinaldi, C., Torres-Lugo, M., 2013. Hyperthermic potentiation of cisplatin by magnetic nanoparticle heaters is correlated with an increase in cell membrane fluidity. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 1003–1013. <https://doi.org/10.2147/IJN.S38842>
- Amemiya, Y., Arakaki, A., Staniland, S.S., Tanaka, T., Matsunaga, T., 2007. Controlled formation of

- magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6. *Biomaterials* **28**, 5381–5389. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.051>
- Amor, M., Busigny, V., Durand-Dubief, M., Tharaud, M., Ona-Nguema, G., Gélabert, A., Alphanbéry, E., Menguy, N., Benedetti, M.F., Chebbi, I., Guyot, F., 2015. Chemical signature of magnetotactic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1699–1703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414112112>
- Amor, M., Busigny, V., Louvat, P., Gélabert, A., Cartigny, P., Durand-Dubief, M., Ona-Nguema, G., Alphanbéry, E., Chebbi, I., Guyot, F., 2016. Mass-dependent and -independent signature of Fe isotopes in magnetotactic bacteria. *Science* **352**, 705–708. <https://doi.org/10.1126/science.aad7632>
- Amor, M., Busigny, V., Louvat, P., Tharaud, M., Gélabert, A., Cartigny, P., Carlut, J., Isambert, A., Durand-Dubief, M., Ona-Nguema, G., Alphanbéry, E., Chebbi, I., Guyot, F., 2018. Iron uptake and magnetite biomineralization in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1: An iron isotope study. *Geochim. Cosmochim. Acta* **232**, 225–243. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.04.020>
- Amor, M., Mathon, F.P., Monteil, C.L., Busigny, V., Lefevre, C.T., 2020. Iron-biomineralizing organelle in magnetotactic bacteria: function, synthesis and preservation in ancient rock samples. *Environ. Microbiol.* **22**, 3611–3632. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15098>
- Ananou, S., Muñoz, A., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E., 2008. Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. *Int. Dairy J.* **18**, 923–927. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.02.001>
- Ananta, J.S., Godin, B., Sethi, R., Moriggi, L., Liu, X., Serda, R.E., Krishnamurthy, R., Muthupillai, R., Bolskar, R.D., Helm, L., Ferrari, M., Wilson, L.J., Decuzzi, P., 2010. Geometrical confinement of gadolinium-based contrast agents in nanoporous particles enhances T1 contrast. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 815–821. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.203>
- Anselmo, A.C., Mitragotri, S., 2016. Nanoparticles in the clinic. *Bioeng. Transl. Med.* **1**, 10–29. <https://doi.org/10.1002/btm2.10003>
- Antony, A.C., 1992. The biological chemistry of folate receptors. *Blood* **79**, 2807–2820. <https://doi.org/10.1182/blood.v79.11.2807.bloodjournal79112807>
- Arakaki, A., Kikuchi, D., Tanaka, M., Yamagishi, A., Yoda, T., Matsunaga, T., 2016. Comparative subcellular localization analysis of magnetosome proteins reveals a unique localization behavior of Mms6 protein onto magnetite crystals. *J. Bacteriol.* **198**, JB.00280-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00280-16>
- Arakaki, A., Masuda, F., Amemiya, Y., Tanaka, T., Matsunaga, T., 2010. Control of the morphology and size of magnetite particles with peptides mimicking the Mms6 protein from magnetotactic bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **343**, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.11.043>
- Arakaki, A., Nakazawa, H., Nemoto, M., Mori, T., Matsunaga, T., 2008. Formation of magnetite by bacteria and its application. *J. R. Soc. Interface* **5**, 977–999. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0170>
- Arakaki, A., Webb, J., Matsunaga, T., 2003. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 8745–8750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211729200>
- Arakaki, A., Yamagishi, A., Fukuyo, A., Tanaka, M., Matsunaga, T., 2014. Co-ordinated functions of Mms proteins define the surface structure of cubo-octahedral magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Mol. Microbiol.* **93**, 554–567. <https://doi.org/10.1111/mmi.12683>
- Arató, B., Szányi, Z., Flies, C., Schüller, D., Frankel, R.B., Buseck, P.R., Pósfai, M., 2005. Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker. *Am. Mineral.* **90**, 1233–1241. <https://doi.org/10.2138/am.2005.1778>

- Arias, J.L., Clares, B., E. Morales, M., Gallardo, V., A. Ruiz, M., 2011a. Lipid-Based Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. *Curr. Drug Targets* **12**, 1151–1165. <https://doi.org/10.2174/138945011795906570>
- Arias, J.L., Gallardo, V., Gómez-Lopera, S.A., Plaza, R.C., Delgado, A. V., 2001. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Release* **77**, 309–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00519-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00519-3)
- Arias, J.L., Reddy, L.H., Othman, M., Gillet, B., Desmaële, D., Zouhiri, F., Dosio, F., Gref, R., Couvreur, P., 2011b. Squalene based nanocomposites: A new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano* **5**, 1513–1521. <https://doi.org/10.1021/nn1034197>
- Arlaukas, S.P., Popov, A. V., Delikatny, E.J., 2016. Choline kinase alpha-Putting the ChoK-hold on tumor metabolism. *Prog. Lipid Res.* **63**, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.03.005>
- Arrieta, O., Medina, L.A., Estrada-Lobato, E., Ramírez-Tirado, L.A., Mendoza-García, V.O., De La Garza-Salazar, J., 2014. High liposomal doxorubicin tumour tissue distribution, as determined by radiopharmaceutical labelling with <sup>99m</sup>Tc-LD, is associated with the response and survival of patients with unresectable pleural mesothelioma treated with a combination of liposomal doxorubicin and cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **74**, 211–215. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2477-x>
- Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M.R., Santamaría, J., 2007. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* **2**, 22–32. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(07\)70084-1](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70084-1)
- Ashton, S., Song, Y.H., Nolan, J., Cadogan, E., Murray, J., Odedra, R., Foster, J., Hall, P.A., Low, S., Taylor, P., Ellston, R., Polanska, U.M., Wilson, J., Howes, C., Smith, A., Goodwin, R.J.A., Swales, J.G., Strittmatter, N., Takáts, Z., Nilsson, A., Andren, P., Trueman, D., Walker, M., Reimer, C.L., Troiano, G., Parsons, D., De Witt, D., Ashford, M., Hrkach, J., Zale, S., Jewsbury, P.J., Barry, S.T., 2016. Aurora kinase inhibitor nanoparticles target tumors with favorable therapeutic index in vivo. *Sci. Transl. Med.* **8**, 325ra17. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad2355>
- Azzopardi, E.A., Ferguson, E.L., Thomas, D.W., 2012. The enhanced permeability retention effect: a new paradigm for drug targeting in infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 257–274. <https://doi.org/10.1093/JAC>
- Babes, L., Denizot, B., Tanguy, G., Le Jeune, J.J., Jallet, P., 1999. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: A parametric study. *J. Colloid Interface Sci.* **212**, 474–482. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.6053>
- Babincová, M., Čičmanec, P., Altanerová, V., Altaner, Č., Babinec, P., 2002. AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: Design of a method for site-specific chemotherapy. *Bioelectrochemistry* **55**, 17–19. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00171-2](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00171-2)
- Bacri, J.C., Perzynski, R., Salin, D., Cabuil, V., Massart, R., 1990. Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. *J. Magn. Magn. Mater.* **85**, 27–32. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(90\)90010-N](https://doi.org/10.1016/0304-8853(90)90010-N)
- Baker, H.M., Anderson, B.F., Baker, E.N., 2003. Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3579–3583. <https://doi.org/10.1073/pnas.0637295100>
- Baldeshwiler, A.M., 2003. History of FDA good laboratory practices. *Qual. Assur. J.* **7**, 157–161. <https://doi.org/10.1002/qaj.228>
- Balkwill, D.L., Maratea, D., Blakemore, R.P., 1980. Ultrastructure of a Magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* **141**, 1399–1408. <https://doi.org/10.1128/jb.141.3.1399-1408.1980>
- Bareford, L.M., Swaan, P.W., 2007. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 748–758. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.008>

- Barenholz, Y., 2012. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control. Release* **160**, 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>
- Barua, S., Yoo, J.W., Kolhar, P., Wakankar, A., Gokarn, Y.R., Mitragotri, S., 2013. Particle shape enhances specificity of antibody-displaying nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 3270–3275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216893110>
- Baumgartner, J., Antonietta Carillo, M., Eckes, K.M., Werner, P., Faivre, D., 2014. Biomimetic magnetite formation: From biocombinatorial approaches to mineralization effects. *Langmuir* **30**, 2129–2136. <https://doi.org/10.1021/la404290c>
- Baumgartner, J., Morin, G., Menguy, N., Gonzalez, T.P., Widdrat, M., Cosmidis, J., Faivre, D., 2013. Magnetotactic bacteria form magnetite from a phosphate-rich ferric hydroxide via nanometric ferric (oxyhydr)oxide intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 14883–14888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307119110>
- Bazak, R., Houri, M., El Achy, S., Kamel, S., Refaat, T., 2015. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 769–784. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1767-3>
- Bazyliniski, D., Schübbe, S., 2007. Controlled Biomineralization by and Applications of Magnetotactic Bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **62**, 21–62. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)62002-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)62002-4)
- Bazyliniski, D.A., Frankel, R.B., 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 217–230. <https://doi.org/10.1038/nrmicro842>
- Bazyliniski, D.A., Frankel, R.B., 2003. Biologically Controlled Mineralization in Prokaryotes. *Rev. Mineral. Geochemistry* **54**, 217–247. <https://doi.org/10.2113/0540217>
- Bazyliniski, D.A., Frankel, R.B., Heywood, B.R., Mann, S., King, J.W., Donaghay, P.L., Hanson, a K., 1995. Controlled Biomineralization of Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) and Greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) in a Magnetotactic Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3232–3239. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.9.3232-3239.1995>
- Bazyliniski, D.A., Frankel, R.B., Konhauser, K.O., 2007. Modes of biomineralization of magnetite by microbes. *Geomicrobiol. J.* **24**, 465–475. <https://doi.org/10.1080/01490450701572259>
- Bazyliniski, D.A., Garratt-Reed, A.J., Frankel, R.B., 1994. Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microsc. Res. Tech.* **27**, 389–401. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270505>
- Bennet, M., Bertinetti, L., Neely, R.K., Schertel, A., Körnig, A., Flors, C., Müller, F.D., Schüler, D., Klumpp, S., Faivre, D., 2015. Biologically controlled synthesis and assembly of magnetite nanoparticles. *Faraday Discuss.* **181**, 71–83. <https://doi.org/10.1039/c4fd00240g>
- Benzerara, K., Menguy, N., 2009. Looking for traces of life in minerals. *Comptes Rendus - Palevol* **8**, 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.crpv.2009.03.006>
- Bereczk-Tompa, É., Vonderviszt, F., Horváth, B., Szalai, I., Pósfai, M., 2017. Biotemplated synthesis of magnetic filaments. *Nanoscale* **9**, 15062–15069. <https://doi.org/10.1039/c7nr04842d>
- Beretta, G.L., Zunino, F., 2007. Molecular mechanisms of anthracycline activity. *Top. Curr. Chem.* **283**, 1–19. [https://doi.org/10.1007/128\\_2007\\_3](https://doi.org/10.1007/128_2007_3)
- Berger, P., Adelman, N.B., Beckman, K.J., Campbell, D.J., Ellis, A.B., Lisensky, G.C., 1999. Preparation and Properties of an Aqueous Ferrofluid. *J. Chem. Educ.* **76**, 943–948. <https://doi.org/10.1021/ed076p943>
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., Farokhzad, O.C., 2014. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **66**, 2–25.



<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>

- Bharde, A., Rautaray, D., Bansal, V., Ahmad, A., Sarkar, I., Yusuf, S.M., Sanyal, M., Sastry, M., 2006. Extracellular Biosynthesis of Magnetite using Fungi. *Small* **2**, 135–141. <https://doi.org/10.1002/sml.200500180>
- Bhatnagar, B.S., Bogner, R.H., Pikal, M.J., 2007. Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm. Dev. Technol.* **12**, 505–523. <https://doi.org/10.1080/10837450701481157>
- Bird, S.M., El-Zubir, O., Rawlings, A.E., Leggett, G.J., Staniland, S.S., 2016a. A novel design strategy for nanoparticles on nanopatterns: interferometric lithographic patterning of Mms6 biotemplated magnetic nanoparticles. *J. Mater. Chem. C* **4**, 3948–3955. <https://doi.org/10.1039/C5TC03895B>
- Bird, S.M., Rawlings, A.E., Galloway, J.M., Staniland, S.S., 2016b. Using a biomimetic membrane surface experiment to investigate the activity of the magnetite biomineralisation protein Mms6. *RSC Adv.* **6**, 7356–7363. <https://doi.org/10.1039/C5RA16469A>
- Black, K.C.L., Wang, Y., Luehmann, H.P., Cai, X., Xing, W., Pang, B., Zhao, Y., Cutler, C.S., Wang, L., V., Liu, Y., Xia, Y., 2014. Radioactive <sup>198</sup>Au-doped nanostructures with different shapes for in vivo analyses of their biodistribution, tumor uptake, and intratumoral distribution. *ACS Nano* **8**, 4385–4394. <https://doi.org/10.1021/nn406258m>
- Blanco-Andujar, C., Teran, F.J., Ortega, D., 2018. Current Outlook and Perspectives on Nanoparticle-Mediated Magnetic Hyperthermia. In 'Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications'. Elsevier, pp. 197–245. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101925-2.00007-3>
- Blanco-Andujar, C., Walter, A., Cotin, G., Bordeianu, C., Mertz, D., Felder-Flesch, D., Begin-Colin, S., 2016. Design of iron oxide-based nanoparticles for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine* **11**, 1889–1910. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-5001>
- Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M., 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>
- Blaney, L., 2007. Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): Properties, Synthesis, and Applications. *Lehigh Preserv.* **15**, 5.
- Bobo, D., Robinson, K.J., Islam, J., Thurecht, K.J., Corrie, S.R., 2016. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **33**, 2373–2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
- Bock, N., Riminucci, A., Dionigi, C., Russo, A., Tampieri, A., Landi, E., Goranov, V.A., Marcacci, M., Dediu, V., 2010. A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds. *Acta Biomater.* **6**, 786–796. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.017>
- Bogart, L.K., Pourroy, G., Murphy, C.J., Puentes, V., Pellegrino, T., Rosenblum, D., Peer, D., Lévy, R., 2014. Nanoparticles for imaging, sensing, and therapeutic intervention. *ACS Nano* **8**, 3107–3122. <https://doi.org/10.1021/nn500962q>
- Borowitzka, M.A., 1982. Morphological and Cytological Aspects of Algal Calcification. *Int. Rev. Cytol.* **74**, 127–162. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61171-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61171-7)
- Boswell, G.W., Buell, D., Bekersky, I., 1998. Ambisome (liposomal amphotericin B): A comparative review. *J. Clin. Pharmacol.* **38**, 583–592. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1998.tb04464.x>
- Bourrinet, P., Bengelé, H.H., Bonnemain, B., Dencausse, A., Idee, J.M., Jacobs, P.M., Lewis, J.M., 2006. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest. Radiol.* **41**, 313–324. <https://doi.org/10.1097/01.rli.0000197669.80475.dd>
- Braet, F., Wisse, E., Bomans, P., Frederik, P., Geerts, W., Koster, A., Soon, L., Ringer, S., 2007.

- Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions. *Microsc. Res. Tech.* **70**, 230–242. <https://doi.org/10.1002/jemt.20408>
- Bragg, W.H., 1915. The structure of magnetite and the spinels. *Nature* **95**, 561. <https://doi.org/10.1038/095561a0>
- Braun, V., Hantke, K., Köster, W., 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met. Ions Biol. Syst.* **35**, 67–145.
- Breulmann, M., Cölfen, H., Hentze, H.P., Antonietti, M., Walsh, D., Mann, S., 1998. Elastic magnets: Template-controlled mineralization of iron oxide colloids in a sponge-like gel matrix. *Adv. Mater.* **10**, 237–241. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(199802\)10:3<237::AID-ADMA237>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(199802)10:3<237::AID-ADMA237>3.0.CO;2-6)
- Bringas, E., Köysüren, Ö., Quach, D. V., Mahmoudi, M., Aznar, E., Roehling, J.D., Marcos, M.D., Martínez-Mañez, R., Stroeve, P., 2012. Triggered release in lipid bilayer-capped mesoporous silica nanoparticles containing SPION using an alternating magnetic field. *Chem. Commun.* **48**, 5647–5649. <https://doi.org/10.1039/c2cc31563g>
- Byrne, J.D., Betancourt, T., Brannon-Peppas, L., 2008. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1615–1626. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.005>
- Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M.R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N., Kataoka, K., 2011. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 815–823. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.166>
- Cao, M.D., Cheng, M., Rizwan, A., Jiang, L., Krishnamachary, B., Bhujwalla, Z.M., Bathen, T.F., Glunde, K., 2016. Targeting choline phospholipid metabolism: GDPD5 and GDPD6 silencing decrease breast cancer cell proliferation, migration, and invasion. *NMR Biomed.* **29**, 1098–1107. <https://doi.org/10.1002/nbm.3573>
- Carmen Bautista, M., Bomati-Miguel, O., Del Puerto Morales, M., Serna, C.J., Veintemillas-Verdaguer, S., 2005. Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.038>
- Carnevale, J., Ko, A.H., 2016. MM-398 (nanoliposomal irinotecan): Emergence of a novel therapy for the treatment of advanced pancreatic cancer. *Futur. Oncol.* **12**, 453–464. <https://doi.org/10.2217/fon.15.333>
- Carpenter, J.F., Prestrelski, S.J., Arakawa, T., 1993. Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins Using Stress-Specific Stabilization: I. Enzyme Activity and Calorimetric Studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 456–464. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1993.1309>
- Carrey, J., Mehdaoui, B., Respaud, M., 2011. Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization. *J. Appl. Phys.* **109**, 083921. <https://doi.org/10.1063/1.3551582>
- Caster, J.M., Patel, A.N., Zhang, T., Wang, A., 2017. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **9**. <https://doi.org/10.1002/wnan.1416>
- Cazares-Cortes, E., Cabana, S., Boitard, C., Nehlig, E., Griffete, N., Fresnais, J., Wilhelm, C., Abou-Hassan, A., Ménager, C., 2019. Recent insights in magnetic hyperthermia: From the “hot-spot” effect for local delivery to combined magneto-photo-thermia using magneto-plasmonic hybrids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **138**, 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.016>

- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiol.* **30**, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002>
- Cebrián, R., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Albert, A., Maqueda, M., Sánchez-Barrena, M.J., 2015. The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity. *J. Struct. Biol.* **190**, 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.006>
- Chan, C.S., Fakra, S.C., Edwards, D.C., Emerson, D., Banfield, J.F., 2009. Iron oxyhydroxide mineralization on microbial extracellular polysaccharides. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 3807–3818. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.02.036>
- Chang, L., Heslop, D., Roberts, A.P., Rey, D., Mohamed, K.J., 2016. Discrimination of biogenic and detrital magnetite through a double Verwey transition temperature. *J. Geophys. Res. Solid Earth* **121**, 3–14. <https://doi.org/10.1002/2015JB012485>
- Chang, S.B.R., Kirschvink, J.L., 1989. Magnetofossils, the Magnetization of Sediments, and the Evolution of Magnetite Biomineralization. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **17**, 169–195. <https://doi.org/10.1146/annurev.ea.17.050189.001125>
- Chang, S.B.R., Stolz, J.F., Kirschvink, J.L., Awramik, S.M., 1989. Biogenic magnetite in stromatolites. II. Occurrence in ancient sedimentary environments. *Precambrian Res.* **43**, 305–315. [https://doi.org/10.1016/0301-9268\(89\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0301-9268(89)90062-4)
- Charles, S.W., Popplewell, J., 1982. Properties and applications of magnetic liquids. *Endeavour* **6**, 153–161. [https://doi.org/10.1016/0160-9327\(82\)90070-9](https://doi.org/10.1016/0160-9327(82)90070-9)
- Chauhan, V.P., Jain, R.K., 2013. Strategies for advancing cancer nanomedicine. *Nat. Mater.* **12**, 958–962. <https://doi.org/10.1038/nmat3792>
- Chauhan, V.P., Popović, Z., Chen, O., Cui, J., Fukumura, D., Bawendi, M.G., Jain, R.K., 2011. Fluorescent nanorods and nanospheres for real-time in vivo probing of nanoparticle shape-dependent tumor penetration. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 11417–11420. <https://doi.org/10.1002/anie.201104449>
- Chen, D., Xu, R., 1998. Hydrothermal synthesis and characterization of nanocrystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> powders. *Mater. Res. Bull.* **33**, 1015–1021. [https://doi.org/10.1016/S0025-5408\(98\)00073-7](https://doi.org/10.1016/S0025-5408(98)00073-7)
- Chen, F., Gao, Q., Hong, G., Ni, J., 2008. Synthesis and characterization of magnetite dodecahedron nanostructure by hydrothermal method. *J. Magn. Magn. Mater.* **320**, 1775–1780. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2008.02.117>
- Chen, L.T., Weiss, L., 1973. The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. *Blood* **41**, 529–537. <https://doi.org/10.1182/blood.V41.4.529.529>
- Chen, Y., Bose, A., Bothun, G.D., 2010. Controlled release from bilayer-decorated magnetoliposomes via electromagnetic heating. *ACS Nano* **4**, 3215–3221. <https://doi.org/10.1021/nn100274v>
- Cheng, Y., Morshed, R.A., Auffinger, B., Tobias, A.L., Lesniak, M.S., 2014. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **66**, 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.006>
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. (Georgia), Shin, D.M., 2008. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1310–1316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-1441>
- Choi, H.S., Liu, W., Liu, F., Nasr, K., Misra, P., Bawendi, M.G., Frangioni, J. V., 2010. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 42–47. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.314>

- Choi, H.S., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J.P., Ito, B., Bawendi, M.G., Frangioni, J. V., 2007. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1165–1170. <https://doi.org/10.1038/nbt1340>
- Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J.J., Jallet, P., 1996. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencapsul.* **13**, 245–255. <https://doi.org/10.3109/02652049609026013>
- Clares, B., Biedma-Ortiz, R.A., Sáez-Fernández, E., Prados, J.C., Melguizo, C., Cabeza, L., Ortiz, R., Arias, J.L., 2013. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85**, 329–338. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2013.01.028>
- Clark, A.J., Wiley, D.T., Zuckerman, J.E., Webster, P., Chao, J., Lin, J., Yen, Y., Davis, M.E., 2016. CRLX101 nanoparticles localize in human tumors and not in adjacent, nonneoplastic tissue after intravenous dosing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 3850–3854. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603018113>
- Clerc, P., Jeanjean, P., Hallali, N., Gougeon, M., Pipy, B., Carrey, J., Fourmy, D., Gigoux, V., 2018. Targeted Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia produces lysosomal reactive oxygen species and causes Caspase-1 dependent cell death. *J. Control. Release* **270**, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.050>
- Cole, A.J., David, A.E., Wang, J., Galbán, C.J., Hill, H.L., Yang, V.C., 2011a. Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting. *Biomaterials* **32**, 2183–2193. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.040>
- Cole, A.J., David, A.E., Wang, J., Galbán, C.J., Yang, V.C., 2011b. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 6291–6301. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.024>
- Cornell, R.M., Schwertmann, U., 2006. The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. John Wiley & Sons.
- Corot, C., Robert, P., Idée, J.M., Port, M., 2006. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1471–1504. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.013>
- Creixell, M., Bohórquez, A.C., Torres-Lugo, M., Rinaldi, C., 2011. EGFR-targeted magnetic nanoparticle heaters kill cancer cells without a perceptible temperature rise. *ACS Nano* **5**, 7124–7129. <https://doi.org/10.1021/nn201822b>
- Cui, Y., Zhang, M., Zeng, F., Jin, H., Xu, Q., Huang, Y., 2016. Dual-Targeting Magnetic PLGA Nanoparticles for Codelivery of Paclitaxel and Curcumin for Brain Tumor Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 32159–32169. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b10175>
- De Cuyper, M., Joniau, M., 1991. Mechanistic Aspects of the Adsorption of Phospholipids onto Lauric Acid Stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanocolloids. *Langmuir* **7**, 647–652. <https://doi.org/10.1021/la00052a010>
- De Cuyper, M., Soenen, S.J.H., Coenegrachts, K., Beek, L. Ter, 2007. Surface functionalization of magnetoliposomes in view of improving iron oxide-based magnetic resonance imaging contrast agents: Anchoring of gadolinium ions to a lipophilic chelate. *Anal. Biochem.* **367**, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.05.006>
- Dai, Z., Meiser, F., Möhwald, H., 2005. Nanoengineering of iron oxide and iron oxide/silica hollow spheres by sequential layering combined with a sol-gel process. *J. Colloid Interface Sci.* **288**, 298–300. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.02.076>
- Dauty, E., Remy, J.S., Zuber, G., Behr, J.P., 2002. Intracellular delivery of nanometric DNA particles via the folate receptor. *Bioconjug. Chem.* **13**, 831–839. <https://doi.org/10.1021/bc0255182>

- Davis, M.E., Zuckerman, J.E., Choi, C.H.J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C.A., Yen, Y., Heidel, J.D., Ribas, A., 2010. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* **464**, 1067–1070. <https://doi.org/10.1038/nature08956>
- Deng, Z., Zhen, Z., Hu, X., Wu, S., Xu, Z., Chu, P.K., 2011. Hollow chitosan-silica nanospheres as pH-sensitive targeted delivery carriers in breast cancer therapy. *Biomaterials* **32**, 4976–4986. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.050>
- Devouard, B., Pósfai, M., Hua, X., Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., Buseck, P.R., 1998. Magnetite from magnetotactic bacteria: Size distributions and twinning. *Am. Mineral.* **83**, 1387–1398. <https://doi.org/10.2138/am-1998-11-1228>
- Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S.E., 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 469–478. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.223>
- Dobson, J., 2006. Magnetic micro- and nano-particle-based targeting for drug and gene delivery. *Nanomedicine* **1**, 31–37. <https://doi.org/10.2217/17435889.1.1.31>
- Domenech, M., Marrero-Berrios, I., Torres-Lugo, M., Rinaldi, C., 2013. Lysosomal membrane permeabilization by targeted magnetic nanoparticles in alternating magnetic fields. *ACS Nano* **7**, 5091–5101. <https://doi.org/10.1021/nn4007048>
- Du, B., Yu, M., Zheng, J., 2018. Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 358–374. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0038-3>
- Durán, J.D.G., Arias, J.L., Gallardo, V., Delgado, A. V., 2008. Magnetic colloids as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* **97**, 2948–2983. <https://doi.org/10.1002/jps.21249>
- Ecker, D.M., Jones, S.D., Levine, H.L., 2015. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* **7**, 9–14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>
- Egg PC | Avanti Polar Lipids [WWW Document], n.d. URL <https://avantilipids.com/product/840051> (accessed 4.15.20).
- El-Boubbou, K., 2018. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery. *Nanomedicine* **13**, 929–952. <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0320>
- Elias, A., Tsourkas, A., 2009. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 720–726. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.720>
- Espelin, C.W., Leonard, S.C., Geretti, E., Wickham, T.J., Hendriks, B.S., 2016. Dual HER2 targeting with trastuzumab and liposomal-encapsulated doxorubicin (MM-302) demonstrates synergistic antitumor activity in breast and gastric cancer. *Cancer Res.* **76**, 1517–1527. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1518>
- Espinosa, A., Kolosnjaj-Tabi, J., Abou-Hassan, A., Plan Sangnier, A., Curcio, A., Silva, A.K.A., Di Corato, R., Neveu, S., Pellegrino, T., Liz-Marzán, L.M., Wilhelm, C., 2018. Magnetic (Hyper)Thermia or Photothermia? Progressive Comparison of Iron Oxide and Gold Nanoparticles Heating in Water, in Cells, and In Vivo. *Adv. Funct. Mater.* **28**, 1803660. <https://doi.org/10.1002/adfm.201803660>
- Farokhzad, O.C., Cheng, J., Teply, B.A., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P.W., Richie, J.P., Langer, R., 2006. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6315–6320. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601755103>
- Farokhzad, O.C., Langer, R., 2009. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* **3**, 16–20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>
- Fortin, D., Beveridge, T.J., 2000. Mechanistic routes to biomineral surface development. In 'Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application'. pp. 7–24.

- Fortin, J.P., Wilhelm, C., Servais, J., Ménager, C., Bacri, J.C., Gazeau, F., 2007. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2628–2635. <https://doi.org/10.1021/ja067457e>
- Fox, J.L., 1995. FDA advisors okay NeXstar's daunoxome. *Bio/Technology* **13**, 635–636. <https://doi.org/10.1038/nbt0795-635>
- Foy, S.P., Manthe, R.L., Foy, S.T., Dimitrijevic, S., Krishnamurthy, N., Labhasetwar, V., 2010. Optical imaging and magnetic field targeting of magnetic nanoparticles in tumors. *ACS Nano* **4**, 5217–5224. <https://doi.org/10.1021/nn101427t>
- Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., 2003. Biologically Induced Mineralization by Bacteria. *Rev. Mineral. Geochemistry* **54**, 95–114. <https://doi.org/10.2113/0540095>
- Frankel, R.B., Blakemore, R.P., Wolfe, R.S., 1979. Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science* **203**, 1355–1356. <https://doi.org/10.1126/science.203.4387.1355>
- Freeman, M.W., Arrott, A., Watson, J.H.L., 1960. Magnetism in medicine. *J. Appl. Phys.* **31**, S404–S405. <https://doi.org/10.1063/1.1984765>
- Freitas, R.A.J., 1999. Basic Capabilities. In 'Nanomedicine, Vol 1'. Landes Bioscience.
- Funkhouser, J., 2002. Reinventing pharma: The theranostic revolution. *Curr. Drug Discov.* **2**, 17–19.
- Galloway, J.M., Arakaki, A., Masuda, F., Tanaka, T., Matsunaga, T., Staniland, S.S., 2011. Magnetic bacterial protein Mms6 controls morphology, crystallinity and magnetism of cobalt-doped magnetite nanoparticles in vitro. *J. Mater. Chem.* **21**, 15244–15254. <https://doi.org/10.1039/c1jm12003d>
- Galloway, J.M., Bramble, J.P., Rawlings, A.E., Burnell, G., Evans, S.D., Staniland, S.S., 2012. Biotemplated Magnetic Nanoparticle Arrays. *Small* **8**, 204–208. <https://doi.org/10.1002/smll.201101627>
- Galvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., 1991. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **173**, 886–892. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.886-892.1991>
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., 1989. Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* **140**, 57–68. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(89\)90060-0](https://doi.org/10.1016/0923-2508(89)90060-0)
- Gao, J., Xie, J.P., Ding, J.N., Kang, J., Cheng, H.N., Qiu, G.Z., 2006. Extraction and purification of magnetic nanoparticles from strain of *Leptospirillum ferriphilum*. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China (English Ed.)* **16**, 1417–1420. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(07\)60030-2](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(07)60030-2)
- García-Ruiz, J.M., Melero-García, E., Hyde, S.T., 2009. Morphogenesis of self-assembled nanocrystalline materials of barium carbonate and silica. *Science* **323**, 362–365. <https://doi.org/10.1126/science.1165349>
- García Rubia, G., Peigneux, A., Jabalera, Y., Puerma, J., Oltolina, F., Elert, K., Colangelo, D., Gómez Morales, J., Prat, M., Jimenez-Lopez, C., 2018. pH-Dependent adsorption release of doxorubicin on MamC-Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Langmuir* **34**, 13713–13724. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03109>
- Garnier, B., Tan, S., Miraux, S., Bled, E., Brisson, A.R., 2012. Optimized synthesis of 100 nm diameter magnetoliposomes with high content of maghemite particles and high MRI effect. *Contrast Media Mol. Imaging* **7**, 231–239. <https://doi.org/10.1002/cmml.487>
- Garrels, R.M., Christ, C.L., 1990. Solutions, Minerals, and Equilibria. Jones and Bartlett, Boston.

- Ge, S., Shi, X., Sun, K., Li, C., Uher, C., Baker, J.R., Banaszak Holl, M.M., Orr, B.G., 2009. Facile hydrothermal synthesis of iron oxide nanoparticles with tunable magnetic properties. *J. Phys. Chem. C* **113**, 13593–13599. <https://doi.org/10.1021/jp902953t>
- Gehring, A.U., Kind, J., Charilaou, M., García-Rubio, I., 2013. S-band ferromagnetic resonance spectroscopy and the detection of magnetofossils. *J. R. Soc. Interface* **10**. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0790>
- Geisow, M.J., Evans, W.H., 1984. pH in the endosome. Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis. *Exp. Cell Res.* **150**, 36–46. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(84\)90699-2](https://doi.org/10.1016/0014-4827(84)90699-2)
- Gentile, F., Chiappini, C., Fine, D., Bhavane, R.C., Peluccio, M.S., Cheng, M.M.C., Liu, X., Ferrari, M., Decuzzi, P., 2008. The effect of shape on the margination dynamics of non-neutrally buoyant particles in two-dimensional shear flows. *J. Biomech.* **41**, 2312–2318. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.03.021>
- Gerlowski, L.E., Jain, R.K., 1986. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc. Res.* **31**, 288–305. [https://doi.org/10.1016/0026-2862\(86\)90018-X](https://doi.org/10.1016/0026-2862(86)90018-X)
- Ghozlan, H.A., Abouelkheir, S.S., Sabry, S.A., 2018. Microbial Fabrication of Magnetic Nanoparticles and Their Applications. In 'Magnetic Nanostructured Materials: From Lab to Fab'. Elsevier, pp. 117–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813904-2.00004-8>
- Gilchrist, R.K., Medal, R., Shorey, W.D., Hanselman, R.C., Parrott, J.C., Taylor, C.B., 1957. Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann. Surg.* **146**, 596–606. <https://doi.org/10.1097/0000658-195710000-00007>
- Gill, S.C., von Hippel, P.H., 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326.
- Glunde, K., Bhujwala, Z.M., Ronen, S.M., 2011. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 835–848. <https://doi.org/10.1038/nrc3162>
- Goldhawk, D.E., Rohani, R., Sengupta, A., Gelman, N., Prato, F.S., 2012. Using the magnetosome to model effective gene-based contrast for magnetic resonance imaging. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **4**, 378–388. <https://doi.org/10.1002/wnan.1165>
- Goldstein, L.S., Dewhirst, M.W., Repacholi, M., Kheifets, L., 2003. Summary, conclusions and recommendations: Adverse temperature levels in the human body. *Int. J. Hyperth.* **19**, 373–384. <https://doi.org/10.1080/0265673031000090701>
- Gonzales, M., Krishnan, K.M., 2005. Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.02.020>
- Gorby, A., Beveridge, T.J., Blakemore, R.P., 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**, 834–841. <https://doi.org/10.1128/jb.170.2.834-841.1988>
- Gordon, L.M., Cohen, M.J., MacRenaris, K.W., Pasteris, J.D., Seda, T., Joester, D., 2015. Amorphous intergranular phases control the properties of rodent tooth enamel. *Science* **347**, 746–750. <https://doi.org/10.1126/science.1258950>
- Gordon, L.M., Joester, D., 2011. Nanoscale chemical tomography of buried organic-inorganic interfaces in the chiton tooth. *Nature* **469**, 194–198. <https://doi.org/10.1038/nature09686>
- Gordon, L.M., Tran, L., Joester, D., 2012. Atom probe tomography of apatites and bone-type mineralized tissues. *ACS Nano* **6**, 10667–10675. <https://doi.org/10.1021/nn3049957>
- Gordon, R.T., Hines, J.R., Gordon, D., 1979. Intracellular hyperthermia a biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. *Med. Hypotheses* **5**, 83–102.

[https://doi.org/10.1016/0306-9877\(79\)90063-X](https://doi.org/10.1016/0306-9877(79)90063-X)

- Gould, G.W., Lippincott-Schwartz, J., 2009. New roles for endosomes: From vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 287–292. <https://doi.org/10.1038/nrm2652>
- Gradishar, W.J., 2006. Albumin-bound paclitaxel: A next-generation taxane. *Expert Opin. Pharmacother.* **7**, 1041–1053. <https://doi.org/10.1517/14656566.7.8.1041>
- Gradishar, W.J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., Hawkins, M., O'Shaughnessy, J., 2005. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7794–7803. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.937>
- Gribanov, N.M., Bibik, E.E., Buzunov, O. V., Naumov, V.N., 1990. Physico-chemical regularities of obtaining highly dispersed magnetite by the method of chemical condensation. *J. Magn. Magn. Mater.* **85**, 7–10. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(90\)90005-B](https://doi.org/10.1016/0304-8853(90)90005-B)
- Gupta, A.K., Curtis, A.S.G., 2004. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**, 493–496. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000021126.32934.20>
- Haferburg, G., Kothe, E., 2007. Microbes and metals: Interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* **47**, 453–467. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700275>
- Han, L., Zhou, X., 2016. Synthesis and characterization of liposomes nano-composite-particles with hydrophobic magnetite as a MRI probe. *Appl. Surf. Sci.* **376**, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.03.164>
- Han, Y., Lei, S.L., Lu, J.H., He, Y., Chen, Z.W., Ren, L., Zhou, X., 2016. Potential use of SERS-assisted theranostic strategy based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au cluster/shell nanocomposites for bio-detection, MRI, and magnetic hyperthermia. *Mater. Sci. Eng. C* **64**, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.090>
- Hayashi, K., Sakamoto, W., Yogo, T., 2016. Smart Ferrofluid with Quick Gel Transformation in Tumors for MRI-Guided Local Magnetic Thermochemotherapy. *Adv. Funct. Mater.* **26**, 1708–1718. <https://doi.org/10.1002/adfm.201504215>
- He, J., Huang, M., Wang, D., Zhang, Z., Li, G., 2014. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101**, 84–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.017>
- Heath, T.D., Fraley, R.T., Papahadjopoulos, D., 1980. Antibody targeting of liposomes: Cell specificity obtained by conjugation of F(ab')<sub>2</sub> to vesicle surface. *Science* **210**, 539–541. <https://doi.org/10.1126/science.7423203>
- Heim, C., 2011. Microbial biomineralization. In 'Encyclopedia of Earth Sciences Series'. Springer Netherlands, pp. 586–592. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1\\_33](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_33)
- Heldin, C.H., Rubin, K., Pietras, K., Östman, A., 2004. High interstitial fluid pressure - An obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 806–813. <https://doi.org/10.1038/nrc1456>
- Hergt, R., Dutz, S., 2007. Magnetic particle hyperthermia—biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *J. Magn. Magn. Mater.* **311**, 187–192. <https://doi.org/10.1016/J.JMMM.2006.10.1156>
- Heslop, D., Roberts, A.P., Chang, L., 2014. Characterizing magnetofossils from first-order reversal curve (FORC) central ridge signatures. *Geochemistry, Geophys. Geosystems* **15**, 2170–2179. <https://doi.org/10.1002/2014GC005291>
- Heunis, T., Bshena, O., Klumperman, B., Dicks, L., 2011. Release of bacteriocins from nanofibers prepared with combinations of poly(D,L-lactide) (PDLLA) and poly(ethylene oxide) (PEO). *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 2158–2173. <https://doi.org/10.3390/ijms12042158>



- Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R., Riess, H., 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **43**, 33–56. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00179-2)
- Hilger, I., Frühauf, K., Andrä, W., Hiergeist, R., Hergt, R., Kaiser, W.A., 2002. Heating potential of iron oxides for therapeutic purposes in interventional radiology. *Acad. Radiol.* **9**, 198–202. [https://doi.org/10.1016/S1076-6332\(03\)80171-X](https://doi.org/10.1016/S1076-6332(03)80171-X)
- Ho, D., Sun, X., Sun, S., 2011. Monodisperse magnetic nanoparticles for theranostic applications. *Acc. Chem. Res.* **44**, 875–882. <https://doi.org/10.1021/ar200090c>
- Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., Jain, R.K., 1998. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4607–4612. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4607>
- Home | Nanotechnology Characterization Lab (NCL) [WWW Document], n.d. URL <https://ncl.cancer.gov/> (accessed 4.29.21).
- Hou, Y., Kondoh, H., Shimojo, M., Kogure, T., Ohta, T., 2005. High-yield preparation of uniform cobalt hydroxide and oxide nanoplatelets and their characterization. *J. Phys. Chem. B* **109**, 19094–19098. <https://doi.org/10.1021/jp0521149>
- Howard, M., Zern, B.J., Anselmo, A.C., Shuvaev, V. V., Mitragotri, S., Muzykantov, V., 2014. Vascular targeting of nanocarriers: Perplexing aspects of the seemingly straightforward paradigm. *ACS Nano* **8**, 4100–4132. <https://doi.org/10.1021/nn500136z>
- Hrkach, J., Von Hoff, D., Ali, M.M., Andrianova, E., Auer, J., Campbell, T., De Witt, D., Figa, M., Figueiredo, M., Horhota, A., Low, S., McDonnell, K., Peeke, E., Retnarajan, B., Sabnis, A., Schnipper, E., Song, J.J., Song, Y.H., Summa, J., Tompsett, D., Troiano, G., Hoven, T.V.G., Wright, J., LoRusso, P., Kantoff, P.W., Bander, N.H., Sweeney, C., Farokhzad, O.C., Langer, R., Zale, S., 2012. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Sci. Transl. Med.* **4**, 128ra39. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003651>
- Hu, C.M.J., Zhang, L., Aryal, S., Cheung, C., Fang, R.H., Zhang, L., 2011. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10980–10985. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106634108>
- Hu, S.-H., Liu, D.-M., Tung, W.-L., Liao, C.-F., Chen, S.-Y., 2008a. Surfactant-Free, Self-Assembled PVA-Iron Oxide/Silica Core-Shell Nanocarriers for Highly Sensitive, Magnetically Controlled Drug Release and Ultrahigh Cancer Cell Uptake Efficiency. *Adv. Funct. Mater.* **18**, 2946–2955. <https://doi.org/10.1002/adfm.200800428>
- Hu, S.H., Chen, S.Y., Gao, X., 2012. Multifunctional nanocapsules for simultaneous encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds and on-demand release. *ACS Nano* **6**, 2558–2565. <https://doi.org/10.1021/nn205023w>
- Hu, S.H., Chen, S.Y., Liu, D.M., Hsiao, C.S., 2008b. Core/single-crystal-shell nanospheres for controlled drug release via a magnetically triggered rupturing mechanism. *Adv. Mater.* **20**, 2690–2695. <https://doi.org/10.1002/adma.200800193>
- Huang, H., Delikanli, S., Zeng, H., Ferkey, D.M., Pralle, A., 2010. Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 602–606. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.125>
- Huang, H.Y., Hu, S.H., Chian, C.S., Chen, S.Y., Lai, H.Y., Chen, Y.Y., 2012. Self-assembling PVA-F127 thermosensitive nanocarriers with highly sensitive magnetically-triggered drug release for epilepsy therapy in vivo. *J. Mater. Chem.* **22**, 8566–8573. <https://doi.org/10.1039/c2jm00032f>
- Huang, J., Liu, C., Xiao, H., Wang, J., Jiang, D., Gu, E., 2007. Zinc tetraaminophthalocyanine-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

- nanoparticle composite for laccase immobilization. *Int. J. Nanomedicine* **2**, 775–784.
- Huang, S.H., Chen, D.H., 2009. Rapid removal of heavy metal cations and anions from aqueous solutions by an amino-functionalized magnetic nano-adsorbent. *J. Hazard. Mater.* **163**, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.075>
- Huber, D.L., 2005. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* **1**, 482–501. <https://doi.org/10.1002/sml.200500006>
- Iafisco, M., Delgado-Lopez, J.M., Varoni, E.M., Tampieri, A., Rimondini, L., Gomez-Morales, J., Prat, M., 2013. Cell Surface Receptor Targeted Biomimetic Apatite Nanocrystals for Cancer Therapy. *Small* **9**, 3834–3844. <https://doi.org/10.1002/sml.201202843>
- Iglesias, G.R., Reyes-Ortega, F., Fernandez, B.L.C., Delgado, Á. V., 2018. Hyperthermia-triggered gemcitabine release from polymer-coated magnetite nanoparticles. *Polymers (Basel)*. **10**, 269. <https://doi.org/10.3390/polym10030269>
- INTERNATIONAL STANDARD, I., 2009. ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
- Iorio, E., Caramujo, M.J., Cecchetti, S., Spadaro, F., Carpinelli, G., Canese, R., Podo, F., 2016. Key Players in Choline Metabolic Reprograming in Triple-Negative Breast Cancer. *Front. Oncol.* **6**, 205. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00205>
- Irvine, D.J., Dane, E.L., 2020. Enhancing cancer immunotherapy with nanomedicine. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 321–334. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0269-6>
- Isambert, A., Menguy, N., Larquet, E., Guyot, F., Valet, J.P., 2007. Transmission electron microscopy study of magnetites in a freshwater population of magnetotactic bacteria. *Am. Mineral.* **92**, 621–630. <https://doi.org/10.2138/am.2007.2278>
- Ishii, M., Shibata, R., Numaguchi, Y., Kito, T., Suzuki, H., Shimizu, K., Ito, A., Honda, H., Murohara, T., 2011. Enhanced angiogenesis by transplantation of mesenchymal stem cell sheet created by a novel magnetic tissue engineering method. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2210–2215. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.231100>
- Ismail, A.A., 2005. Synthesis and characterization of Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> nanoparticles by sol-gel method. *Appl. Catal. B Environ.* **58**, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2004.11.022>
- Ito, A., Akiyama, H., Kawabe, Y., Kamihira, M., 2007. Magnetic force-based cell patterning using Arg-Gly-Asp (RGD) peptide-conjugated magnetite cationic liposomes. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 288–293. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.288>
- Jabalera, Y., Garcia-Pinel, B., Ortiz, R., Iglesias, G., Cabeza, L., Prados, J., Jimenez-Lopez, C., Melguizo, C., 2019. Oxaliplatin-biomimetic magnetic nanoparticle assemblies for colon cancer-targeted chemotherapy: An in vitro study. *Pharmaceutics* **11**, 395. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080395>
- Jain, R.K., Stylianopoulos, T., 2010. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 653–664. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.139>
- James, J.S., Dubs, G., 1997. FDA approves new kind of lymphoma treatment. Food and Drug Administration. *AIDS Treat. News* **284**, 2–3.
- Jeong, U., Teng, X., Wang, Y., Yang, H., Xia, Y., 2007. Superparamagnetic Colloids: Controlled Synthesis and Niche Applications. *Adv. Mater.* **19**, 33–60. <https://doi.org/10.1002/adma.200600674>
- Jeyadevan, B., 2010. Present status and prospects of magnetite nanoparticles-based hyperthermia. *J. Ceram. Soc. Japan* **118**, 391–401. <https://doi.org/10.2109/jcersj2.118.391>

- Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Navarro, A., Perez-Gonzalez, T., Bazylinski, D.A., Lauer, H. V., Romanek, C.S., 2012. Signatures in magnetites formed by (Ca,Mg,Fe)CO<sub>3</sub> thermal decomposition: Terrestrial and extraterrestrial implications. *Geochim. Cosmochim. Acta* **87**, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.03.028>
- Jimenez-Lopez, C., Romanek, C.S., Bazylinski, D.A., 2010. Magnetite as a prokaryotic biomarker: A review. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **115**. <https://doi.org/10.1029/2009jg001152>
- Jiménez-López, J.M., Carrasco, M.P., Segovia, J.L., Marco, C., 2002. Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4649–4655. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03169.x>
- Jolivet, J.P., Chanéac, C., Tronc, E., 2004. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chem. Commun.* **4**, 477–483. <https://doi.org/10.1039/b304532n>
- Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Fak, H., Felix, R., 1999a. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **201**, 413–419. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(99\)00088-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-8853(99)00088-8)
- Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Schirra, H., Thomas Schiestel, Schmidt, H., Felix, R., 1999b. Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro. *J. Magn. Magn. Mater.* **194**, 185–196. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(98\)00558-7](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(98)00558-7)
- Jun, Y.W., Choi, J.S., Cheon, J., 2007. Heterostructured magnetic nanoparticles: Their versatility and high performance capabilities. *Chem. Commun.* 1203–1214. <https://doi.org/10.1039/b614735f>
- Kakkar, A., Traverso, G., Farokhzad, O.C., Weissleder, R., Langer, R., 2017. Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems. *Nat. Rev. Chem.* **1**, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0063>
- Kallumadil, M., Tada, M., Nakagawa, T., Abe, M., Southern, P., Pankhurst, Q.A., 2009. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, 1509–1513. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.02.075>
- Kang, H., Gravier, J., Bao, K., Wada, H., Lee, J.H., Baek, Y., El Fakhri, G., Gioux, S., Rubin, B.P., Coll, J.L., Choi, H.S., 2016. Renal Clearable Organic Nanocarriers for Bioimaging and Drug Delivery. *Adv. Mater.* **28**, 8162–8168. <https://doi.org/10.1002/adma.201601101>
- Kashyap, S., Woehl, T., Valverde-Tercedor, C., Sánchez-Quesada, M., Jiménez López, C., Prozorov, T., 2014a. Visualization of Iron-Binding Micelles in Acidic Recombinant Biomineralization Protein, MamC. *J. Nanomater.* **2014**, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/320124>
- Kashyap, S., Woehl, T.J., Liu, X., Mallapragada, S.K., Prozorov, T., 2014b. Nucleation of iron oxide nanoparticles mediated by mms6 protein in situ. *ACS Nano* **8**, 9097–9106. <https://doi.org/10.1021/nn502551y>
- Katagiri, K., Imai, Y., Koumoto, K., Kaiden, T., Kono, K., Aoshima, S., 2011. Magneto-responsive On-Demand Release of Hybrid Liposomes Formed from Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles and Thermosensitive Block Copolymers. *Small* **7**, 1683–1689. <https://doi.org/10.1002/sml.201002180>
- Kato, K., Chin, K., Yoshikawa, T., Yamaguchi, K., Tsuji, Y., Esaki, T., Sakai, K., Kimura, M., Hamaguchi, T., Shimada, Y., Matsumura, Y., Ikeda, R., 2012. Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer. *Invest. New Drugs* **30**, 1621–1627. <https://doi.org/10.1007/s10637-011-9709-2>
- Keim, C.N., Lins, U., Farina, M., 2009. Manganese in biogenic magnetite crystals from magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **292**, 250–253. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01499.x>

- Khollam, Y.B., Dhage, S.R., Potdar, H.S., Deshpande, S.B., Bakare, P.P., Kulkarni, S.D., Date, S.K., 2002. Microwave hydrothermal preparation of submicron-sized spherical magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) powders. *Mater. Lett.* **56**, 571–577. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(02\)00554-2](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(02)00554-2)
- Kim, E.H., Lee, H.S., Kwak, B.K., Kim, B.K., 2005. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent. *J. Magn. Magn. Mater.* **289**, 328–330. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.11.093>
- Kirschvink, J.L., 1981. Ferromagnetic crystals (magnetite?) in human tissue. *J. Exp. Biol.* **92**, 333–335.
- Kirschvink, J.L., Hagadorn, J.W., 2000. A Grand Unified Theory of Biomineralization.
- Kirschvink, J.L., Lowenstam, H.A., 1979. Mineralization and magnetization of chiton teeth: paleomagnetic, sedimentologic, and biologic implications of organic magnetite. *Earth Planet. Sci. Lett.* **44**, 193–204. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(79\)90168-7](https://doi.org/10.1016/0012-821X(79)90168-7)
- Klausner, R.D., Rouault, T.A., Harford, J.B., 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* **72**, 19–28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90046-S](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90046-S)
- Knobel, M., Nunes, W.C., Socolovsky, L.M., De Biasi, E., Vargas, J.M., Denardin, J.C., 2008. Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: A review on ideal and real systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **8**, 2836–2857. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.15348>
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Kojima, K., 1997. Selective Formation of Spinel Iron Oxide in Thin Films by Complexing Agent-Assisted Sol-Gel Processing. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **8**, 77–81. <https://doi.org/10.1023/A:1026407306265>
- Kolhatkar, A.G., Jamison, A.C., Litvinov, D., Willson, R.C., Lee, T.R., 2013. Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 15977–16009. <https://doi.org/10.3390/ijms140815977>
- Kolinko, I., Lohße, A., Borg, S., Raschdorf, O., Jogler, C., Tu, Q., Pósfai, M., Tompa, E., Pitzko, J.M., Brachmann, A., Wanner, G., Müller, R., Zhang, Y., Schüler, D., 2014. Biosynthesis of magnetic nanostructures in a foreign organism by transfer of bacterial magnetosome gene clusters. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 193–197. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.13>
- Komeili, A., Vali, H., Beveridge, T.J., Newman, D.K., 2004. Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3839–3844. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400391101>
- Kopp, R.E., Kirschvink, J.L., 2008. The identification and biogeochemical interpretation of fossil magnetotactic bacteria. *Earth-Science Rev.* **86**, 42–61. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2007.08.001>
- Kopp, R.E., Raub, T.D., Schumann, D., Vali, H., Smirnov, A. V., Kirschvink, J.L., 2007. Magnetofossil spike during the Paleocene-Eocene thermal maximum: Ferromagnetic resonance, rock magnetic, and electron microscopy evidence from Ancora, New Jersey, United States. *Paleoceanography* **22**. <https://doi.org/10.1029/2007PA001473>
- Kopp, R.E., Schumann, D., Raub, T.D., Powars, D.S., Godfrey, L. V., Swanson-Hysell, N.L., Maloof, A.C., Vali, H., 2009. An Appalachian Amazon? Magnetofossil evidence for the development of a tropical river-like system in the mid-Atlantic United States during the Paleocene-Eocene Thermal Maximum. *Paleoceanography* **24**, 4211. <https://doi.org/10.1029/2009PA001783>
- Koukourakis, M.I., Koukouraki, S., Giatromanolaki, A., Archimandritis, S.C., Skarlatos, J., Beroukas, K., Bizakis, J.G., Retalis, G., Karkavitsas, N., Helidonis, E.S., 1999. Liposomal doxorubicin and conventionally fractionated radiotherapy in the treatment of locally advanced non-small-cell lung cancer and head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* **17**, 3512–3521.

<https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.11.3512>

- Kozissnik, B., Bohorquez, A.C., Dobson, J., Rinaldi, C., 2013. Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity. *Int. J. Hyperth.* **29**, 706–714. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.837200>
- Kubinová, Š., Syková, E., 2010. Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.* **19**, 144–156. <https://doi.org/10.3109/13645706.2010.481398>
- Kuhlman, K.R., Martens, R.L., Kelly, T.F., Evans, N.D., Miller, M.K., 2001. Fabrication of specimens of metamorphic magnetite crystals for field ion microscopy and atom probe microanalysis. *Ultramicroscopy* **89**, 169–176. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(01\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(01)00116-4)
- Kumar, C.S.S.R., Mohammad, F., 2011. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 789–808. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.008>
- Kumari, P., Ghosh, B., Biswas, S., 2016. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J. Drug Target.* **24**, 179–191. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1051049>
- Lagergren, S., 1898. About the Theory of So-called Adsorption of Soluble Substances. *Sven. Vetenskapsakad. Handlingar* **24**, 1–39.
- Lancet, J.E., Cortes, J.E., Hogge, D.E., Tallman, M.S., Kovacovics, T.J., Damon, L.E., Komrokji, R., Solomon, S.R., Kolitz, J.E., Cooper, M., Yeager, A.M., Louie, A.C., Feldman, E.J., 2014. Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/ daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. *Blood* **123**, 3239–3246. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-540971>
- Lancet, J.E., Uy, G.L., Cortes, J.E., Newell, L.F., Lin, T.L., Ritchie, E.K., Stuart, R.K., Strickland, S.A., Hogge, D., Solomon, S.R., Stone, R.M., Bixby, D.L., Kolitz, J.E., Schiller, G.J., Wieduwilt, M.J., Ryan, D.H., Hoering, A., Chiarella, M., Louie, A.C., Medeiros, B.C., 2016. Final results of a phase III randomized trial of CPX-351 versus 7+3 in older patients with newly diagnosed high risk (secondary) AML. *J. Clin. Oncol.* **34**, 7000–7000. [https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.15\\_suppl.7000](https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.15_suppl.7000)
- Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* **40**, 1361–1403. <https://doi.org/10.1021/ja02242a004>
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R.N., 2008. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110. <https://doi.org/10.1021/cr068445e>
- Laurent, S., Mahmoudi, M., 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promises for diagnosis and treatment of cancer. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* **2**, 367–390.
- Lemke, A.J., Senfft von Pilsach, M.I., Lübke, A., Bergemann, C., Riess, H., Felix, R., 2004. MRI after magnetic drug targeting in patients with advanced solid malignant tumors. *Eur. Radiol.* **14**, 1949–1955. <https://doi.org/10.1007/s00330-004-2445-7>
- Lenders, J.J.M., Bawazer, L.A., Green, D.C., Zope, H.R., Bomans, P.H.H., de With, G., Kros, A., Meldrum, F.C., Sommerdijk, N.A.J.M., 2017. Combinatorial Evolution of Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **27**, 1604863. <https://doi.org/10.1002/adfm.201604863>
- Lenders, J.J.M., Zope, H.R., Yamagishi, A., Bomans, P.H.H., Arakaki, A., Kros, A., De With, G., Sommerdijk, N.A.J.M., 2015. Bioinspired magnetite crystallization directed by random copolypeptides. *Adv. Funct. Mater.* **25**, 711–719. <https://doi.org/10.1002/adfm.201403585>
- Leonard, R.C.F., Williams, S., Tulpule, A., Levine, A.M., Oliveros, S., 2009. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: Focus on liposomal doxorubicin (Myocet™). *Breast* **18**, 218–

224. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2009.05.004>
- Leserman, L.D., Barbet, J., Kourilsky, F., Weinstein, J.N., 1980. Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature* **288**, 602–604. <https://doi.org/10.1038/288602a0>
- Li, J., Benzerara, K., Bernard, S., Beyssac, O., 2013a. The link between biomineralization and fossilization of bacteria: Insights from field and experimental studies. *Chem. Geol.* **359**, 49–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.09.013>
- Li, J., Hu, Y., Hou, Y., Shen, X., Xu, G., Dai, L., Zhou, J., Liu, Y., Cai, K., 2015a. Phase-change material filled hollow magnetic nanoparticles for cancer therapy and dual modal bioimaging. *Nanoscale* **7**, 9004–9012. <https://doi.org/10.1039/c5nr01744k>
- Li, J., Menguy, N., Gatel, C., Boureau, V., Snoeck, E., Patriarche, G., Leroy, E., Pan, Y., 2015b. Crystal growth of bullet-shaped magnetite in magnetotactic bacteria of the Nitrospirae phylum. *J. R. Soc. Interface* **12**. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.1288>
- Li, J., Wu, W., Liu, Q., Pan, Y., 2012. Magnetic anisotropy, magnetostatic interactions and identification of magnetofossils. *Geochemistry, Geophys. Geosystems* **13**. <https://doi.org/10.1029/2012GC004384>
- Li, L., Vorobyov, I., Allen, T.W., 2013b. The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes. *J. Phys. Chem. B* **117**, 11906–11920. <https://doi.org/10.1021/jp405418y>
- Li, Q., Kartikowati, C.W., Horie, S., Ogi, T., Iwaki, T., Okuyama, K., 2017. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Sci. Rep.* **7**, 9894. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09897-5>
- Li, S.D., Chono, S., Huang, L., 2008. Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA. *Mol. Ther.* **16**, 942–946. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.51>
- Li, Z., Kawashita, M., Araki, N., Mitsumori, M., Hiraoka, M., Doi, M., 2010. Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of cancer. *Mater. Sci. Eng. C* **30**, 990–996. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.04.016>
- Liu, T.Y., Hu, S.H., Liu, K.H., Liu, D.M., Chen, S.Y., 2008. Study on controlled drug permeation of magnetic-sensitive ferrogels: Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and PVA. *J. Control. Release* **126**, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.12.006>
- Liu, X., Zhang, H., Nayak, S., Parada, G., Anderegg, J., Feng, S., Nilsen-Hamilton, M., Akinc, M., Mallapragada, S.K., 2015. Effect of Surface Hydrophobicity on the Function of the Immobilized Biomineralization Protein Mms6. *Ind. Eng. Chem. Res.* **54**, 10284–10292. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b01413>
- Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, W., Li, G., Ma, X., Zhang, Y., Chen, S., Tiwari, S., Shi, K., Zhang, S., Fan, H.M., Zhao, Y.X., Liang, X.J., 2020. Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. *Theranostics* **10**, 3793–3815. <https://doi.org/10.7150/thno.40805>
- Liu, X.L., Fan, H.M., Yi, J.B., Yang, Y., Choo, E.S.G., Xue, J.M., Fan, D. Di, Ding, J., 2012. Optimization of surface coating on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for high performance magnetic hyperthermia agents. *J. Mater. Chem.* **22**, 8235–8244. <https://doi.org/10.1039/c2jm30472d>
- Liu, X.Q., Tao, S.W., Shen, Y.S., 1997. Preparation and characterization of nanocrystalline  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by a sol-gel process. *Sensors Actuators, B Chem.* **40**, 161–165. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(97\)80256-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(97)80256-0)
- Lohße, A., Borg, S., Raschdorf, O., Kolinko, I., Tompa, É., Pósfai, M., Faivre, D., Baumgartner, J., Schülera, D., 2014. Genetic dissection of the mamAB and mms6 operons reveals a gene set essential for magnetosome biogenesis in magnetospirillum gryphiswaldense. *J. Bacteriol.* **196**, 2658–2669.

<https://doi.org/10.1128/JB.01716-14>

- Lopez-Moreno, R., Fernández-Vivas, A., Valverde-Tercedor, C., Azuaga Fortes, A.I., Casares Atienza, S., Rodríguez-Navarro, A.B., Zarivach, R., Jimenez-Lopez, C., 2017. Magnetite Nanoparticles Biomineralization in the Presence of the Magnetosome Membrane Protein MamC: Effect of Protein Aggregation and Protein Structure on Magnetite Formation. *Cryst. Growth Des.* **17**, 1620–1629. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b01643>
- Lovley, D.R., 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Microbiol. Rev.* **55**, 259–287. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49005-5)
- Low, P.S., Henne, W.A., Doorneweerd, D.D., 2008. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Acc. Chem. Res.* **41**, 120–129. <https://doi.org/10.1021/ar7000815>
- Lowenstam, H.A., 1981. Minerals formed by organisms. *Science* **211**, 1126–1131. <https://doi.org/10.1126/science.7008198>
- Lower, B.H., Bazylinski, D.A., 2013. The bacterial magnetosome: a unique prokaryotic organelle. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 63–80. <https://doi.org/10.1159/000346543>
- Lu, A.-H., Salabas, E.L., Schüth, F., 2007. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 1222–1244. <https://doi.org/10.1002/anie.200602866>
- Lu, R.M., Hwang, Y.C., Liu, I.J., Lee, C.C., Tsai, H.Z., Li, H.J., Wu, H.C., 2020. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* **27**, 1–30. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
- Lübbe, A.S., Bergemann, C., Riess, H., Schriever, F., Reichardt, P., Possinger, K., Matthias, M., Dörken, B., Herrmann, F., Gürtler, R., Hohenberger, P., Haas, N., Sohr, R., Sander, B., Lemke, A.J., Ohlendorf, D., Huhnt, W., Huhn, D., 1996. Clinical experiences with magnetic drug targeting: A phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* **56**, 4686–4693.
- Luo, Q., Andrade, J.D., 1998. Cooperative adsorption of proteins onto hydroxyapatite. *J. Colloid Interface Sci.* **200**, 104–113. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5364>
- Ma, D., Guan, J., Normandin, F., Dénoimée, S., Enright, G., Veres, T., Simard, B., 2006. Multifunctional nano-architecture for biomedical applications. *Chem. Mater.* **18**, 1920–1927. <https://doi.org/10.1021/cm052067x>
- Maeda, H., 2015. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **91**, 3–6. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.002>
- Maeda, H., Nakamura, H., Fang, J., 2013. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002>
- Magforce: Our Therapy [WWW Document], 2021. URL [https://www.magforce.com/en/home/our\\_therapy/](https://www.magforce.com/en/home/our_therapy/) (accessed 5.8.20).
- Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M.R., Monopoli, M.P., Bombelli, F.B., Laurent, S., 2011. Protein-nanoparticle interactions: Opportunities and challenges. *Chem. Rev.* **111**, 5610–5637. <https://doi.org/10.1021/cr100440g>
- Majetich, S.A., Wen, T., Mefford, O.T., 2013. Magnetic nanoparticles. *MRS Bull.* **38**, 899–903. <https://doi.org/10.1557/mrs.2013.230>

## Bibliografía

- Majumdar, S., Zoghbi, S.S., Gore, J.C., 1990. Pharmacokinetics of superparamagnetic iron-oxide MR contrast agents in the rat. *Invest. Radiol.* **25**, 771–777. <https://doi.org/10.1097/00004424-199007000-00004>
- Mandernack, K.W., Bazylinski, D.A., Shanks, W.C., Bullen, T.D., 1999. Oxygen and iron isotope studies of magnetite produced by magnetotactic bacteria. *Science* **285**, 1892–1896. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1892>
- Mann, S., 2001. *Biom mineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press.
- Mann, S., 1993. Molecular tectonics in biom mineralization and biomimetic materials chemistry. *Nature* **365**, 499–505. <https://doi.org/10.1038/365499a0>
- Mann, S., Frankel, R.B., 1989. Magnetite biom mineralization in unicellular organism. In 'Biom mineralization: Chemical and Biochemical Perspectives'. VCH, New York, pp. 389–426.
- Mann, S., Moench, T.T., Williams, R.J.P., 1984. A high resolution electron microscopic investigation of bacterial magnetite. Implications for crystal growth. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* **221**, 385–393. <https://doi.org/10.1098/rspb.1984.0040>
- Mann, S., Sparks, N.H., Walker, M.M., Kirschvink, J.L., 1988. Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *J. Exp. Biol.* **140**, 35–49.
- Mann, S., Sparks, N.H.C., Blakemore, R.P., 1987a. Structure, morphology and crystal growth of anisotropic magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* **231**, 477–487. <https://doi.org/10.1098/rspb.1987.0056>
- Mann, S., Sparks, N.H.C., Blakemore, R.P., 1987b. Ultrastructure and characterization of anisotropic magnetic inclusions in magnetotactic bacteria. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* **231**, 469–476. <https://doi.org/10.1098/rspb.1987.0055>
- Manning, M.C., Chou, D.K., Murphy, B.M., Payne, R.W., Katayama, D.S., 2010. Stability of protein pharmaceuticals: An update. *Pharm. Res.* **27**, 544–575. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6>
- Maqueda, M., Galvez, A., Bueno, M., Sanchez-Barrena, M., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M., Valdivia, E., 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 399–416. <https://doi.org/10.2174/1389203043379567>
- Marti, C.N., Gheorghide, M., Kalogeropoulos, A.P., Georgiopoulou, V. V., Quyyumi, A.A., Butler, J., 2012. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1455–1469. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.11.082>
- Martín-Escolano, R., Cebrián, R., Maqueda, M., Romero, D., Rosales, M.J., Sánchez-Moreno, M., Marín, C., 2020. Assessing the effectiveness of AS-48 in experimental mice models of Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 1537–1545. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA030>
- Martínez-García, M., Bart, J.M., Campos-Salinas, J., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., González-Rey, E., Navarro, M., Maqueda, M., Cebrián, R., Pérez-Victoria, J.M., 2018. Autophagic-related cell death of *Trypanosoma brucei* induced by bacteriocin AS-48. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **8**, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.03.002>
- Massart, R., 1981. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248. <https://doi.org/10.1109/TMAG.1981.1061188>
- Mathuriya, A.S., 2015. Magnetotactic bacteria for cancer therapy. *Biotechnol. Lett.* **37**, 491–498. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1728-6>
- Matsumura, Y., Maeda, H., 1986. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer



- Chemotherapy: Mechanism of Tumorigenic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387–6392.
- Matsunaga, T., Suzuki, T., Tanaka, M., Arakaki, A., 2007. Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano-biotechnology. *Trends Biotechnol.* **25**, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.002>
- Matsunaga, T., Ueki, F., Obata, K., Tajima, H., Tanaka, T., Takeyama, H., Goda, Y., Fujimoto, S., 2003. Fully automated immunoassay system of endocrine disrupting chemicals using monoclonal antibodies chemically conjugated to bacterial magnetic particles. *Anal. Chim. Acta* **475**, 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01036-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01036-X)
- McCartney, M.R., Lins, U., Farina, M., Buseck, P.R., Frankel, R.B., 2001. Magnetic microstructure of bacterial magnetite by electron holography. *Eur. J. Mineral.* **13**, 685–689. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2001/0013-0685>
- McKay, D.S., Gibson, E.K., Thomas-Keprta, K.L., Vali, H., Romanek, C.S., Clemett, S.J., Chillier, X.D.F., Maechling, C.R., Zare, R.N., 1996. Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001. *Science* **273**, 924–930. <https://doi.org/10.1126/science.273.5277.924>
- Meisen, U., Kathrein, H., 2000. The Influence of Particle Size, Shape and Particle Size Distribution on Properties of Magnetites for the Production of Toners. *J. Imaging Sci. Technol.* **44**, 508–5013.
- Miele, E., Spinelli, G.P., Miele, E., Tomao, F., Tomao, S., 2009. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomedicine* **4**, 99–105. <https://doi.org/10.2147/ijn.s3061>
- Miller, M.K., Forbes, R.G., 2009. Atom probe tomography. *Mater. Charact.* **60**, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2009.02.007>
- Milton Harris, J., Chess, R.B., 2003. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 214–221. <https://doi.org/10.1038/nrd1033>
- Min, K.H., Kim, J.H., Bae, S.M., Shin, H., Kim, M.S., Park, S., Lee, H., Park, R.W., Kim, I.S., Kim, K., Kwon, I.C., Jeong, S.Y., Lee, D.S., 2010. Tumoral acidic pH-responsive MPEG-poly( $\beta$ -amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy. *J. Control. Release* **144**, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.02.024>
- Mody, V. V., Cox, A., Shah, S., Singh, A., Bevins, W., Parihar, H., 2014. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Appl. Nanosci.* **4**, 385–392. <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0216-y>
- Momma, K., Izumi, F., 2011. VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data. *J. Appl. Crystallogr.* **44**, 1272–1276. <https://doi.org/10.1107/S0021889811038970>
- Montgomery, P., Hailwood, E.A., Gale, A.S., Burnett, J.A., 1998. The magnetostratigraphy of Coniacian-Late Campanian chalk sequences in southern England. *Earth Planet. Sci. Lett.* **156**, 209–224. [https://doi.org/10.1016/s0012-821x\(98\)00008-9](https://doi.org/10.1016/s0012-821x(98)00008-9)
- Morales, M.A., Finotelli, P. V., Coaquira, J.A.H., Rocha-Leão, M.H.M., Diaz-Aguila, C., Baggio-Saitovitch, E.M., Rossi, A.M., 2008. In situ synthesis and magnetic studies of iron oxide nanoparticles in calcium-alginate matrix for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **28**, 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.12.016>
- Mosbach, K., Schröder, U., 1979. Preparation and application of magnetic polymers for targeting of drugs. *FEBS Lett.* **102**, 112–116. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80940-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80940-0)
- Muñoz de Escalona, M., Sáez-Fernández, E., Prados, J.C., Melguizo, C., Arias, J.L., 2016. Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer. *Int. J. Pharm.* **504**, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.005>

- Mura, S., Nicolas, J., Couvreur, P., 2013. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* **12**, 991–1003. <https://doi.org/10.1038/nmat3776>
- Murat, D., Falahati, V., Bertinetti, L., Csencsits, R., Körnig, A., Downing, K., Faivre, D., Komeili, A., 2012. The magnetosome membrane protein, MmsF, is a major regulator of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Mol. Microbiol.* **85**, 684–699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08132.x>
- Muxworthy, A.R., Williams, W., 2009. Critical superparamagnetic/single-domain grain sizes in interacting magnetite particles: Implications for magnetosome crystals. *J. R. Soc. Interface* **6**, 1207–1212. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0462>
- Mykhaylyk, O., Antequera, Y.S., Vlaskou, D., Plank, C., 2007. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat. Protoc.* **2**, 2391–2411. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.352>
- Na, H. Bin, Song, I.C., Hyeon, T., 2009. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Adv. Mater.* **21**, 2133–2148. <https://doi.org/10.1002/adma.200802366>
- Nappini, S., Fogli, S., Castroflorio, B., Bonini, M., Baldelli Bombelli, F., Baglioni, P., 2016. Magnetic field responsive drug release from magnetoliposomes in biological fluids. *J. Mater. Chem. B* **4**, 716–725. <https://doi.org/10.1039/c5tb02191j>
- Nappini, S., Al Kayal, T., Berti, D., Nord Èn, B., Baglioni, P., 2011. Magnetically triggered release from giant unilamellar vesicles: Visualization by means of confocal microscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 713–718. <https://doi.org/10.1021/jz2000936>
- Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **8**, 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
- Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., Von Rechenberg, B., 2005. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 483–496. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.064>
- Ngaboni Okassa, L., Marchais, H., Douziech-Eyrolles, L., Cohen-Jonathan, S., Soucé, M., Dubois, P., Chourpa, I., 2005. Development and characterization of sub-micron poly(D,L-lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **302**, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.06.024>
- Nudelman, H., Lee, Y.Z., Hung, Y.L., Kolusheva, S., Upcher, A., Chen, Y.C., Chen, J.Y., Sue, S.C., Zarivach, R., 2018a. Understanding the biomineralization role of magnetite-interacting components (MICs) from magnetotactic bacteria. *Front. Microbiol.* **9**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02480>
- Nudelman, H., Perez Gonzalez, T., Kolushiva, S., Widdrat, M., Reichel, V., Peigneux, A., Davidov, G., Bitton, R., Faivre, D., Jimenez-Lopez, C., Zarivach, R., 2018b. The importance of the helical structure of a MamC-derived magnetite-interacting peptide for its function in magnetite formation. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **74**, 10–20. <https://doi.org/10.1107/S2059798317017491>
- Nudelman, H., Valverde-tercedor, C., Kolusheva, S., Perez, T., Widdrat, M., Grimberg, N., Levi, H., Nelkenbaum, O., Davidov, G., Faivre, D., Jimenez-lopez, C., Zarivach, R., 2016. Structure – function studies of the magnetite-biomineralizing magnetosome-associated protein MamC. *J. Struct. Biol.* **194**, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.001>
- Nudelman, H., Zarivach, R., 2014. Structure prediction of magnetosome-associated proteins. *Front. Microbiol.* **5**, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00009>
- Nuzhina, J. V., Shtil, A.A., Prilepskii, A.Y., Vinogradov, V. V., 2019. Preclinical Evaluation and Clinical Translation of Magnetite-Based Nanomedicines. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **54**, 101282. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101282>

- O'Brien, M.E.R., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Catane, R., Kieback, D.G., Tomczak, P., Ackland, S.P., Orlandi, F., Mellars, L., Alland, L., Tendler, C., 2004. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* **15**, 440–449. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh097>
- Obaidat, I., Issa, B., Haik, Y., 2015. Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia. *Nanomaterials* **5**, 63–89. <https://doi.org/10.3390/nano5010063>
- Odenbach, S., 2009. Colloidal magnetic fluids : basics, development and application of ferrofluids 'Lecture notes in physics ; Springer.
- Otolina, F., Colangelo, D., Miletto, I., Clemente, N., Miola, M., Verné, E., Prat, M., Follenzi, A., 2019. Tumor targeting by monoclonal antibody functionalized magnetic nanoparticles. *Nanomaterials* **9**. <https://doi.org/10.3390/nano9111575>
- Otolina, F., Peigneux, A., Colangelo, D., Clemente, N., D'urso, A., Valente, G., Iglesias, G.R., Jiménez-Lopez, C., Prat, M., 2020. Biomimetic magnetite nanoparticles as targeted drug nanocarriers and mediators of hyperthermia in an experimental cancer model. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers12092564>
- Ortega, G., Reguera, E., 2019. Biomedical applications of magnetite nanoparticles 'Materials for Biomedical Engineering: Nanomaterials-based Drug Delivery. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816913-1.00013-1>
- Ota, H., Lim, T.K., Tanaka, T., Yoshino, T., Harada, M., Matsunaga, T., 2006. Automated DNA extraction from genetically modified maize using aminosilane-modified bacterial magnetic particles. *J. Biotechnol.* **125**, 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.007>
- Park, J.H., Von Maltzahn, G., Zhang, L., Schwartz, M.P., Ruoslahti, E., Bhatia, S.N., Sailor, M.J., 2008. Magnetic iron oxide nanoworms for tumor targeting and imaging. *Adv. Mater.* **20**, 1630–1635. <https://doi.org/10.1002/adma.200800004>
- Park, J.Y., Choi, E.S., Baek, M.J., Lee, G.H., 2009. Colloidal stability of amino acid coated magnetite nanoparticles in physiological fluid. *Mater. Lett.* **63**, 379–381. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.10.057>
- Parodi, A., Quattrocchi, N., Van De Ven, A.L., Chiappini, C., Evangelopoulos, M., Martinez, J.O., Brown, B.S., Khaled, S.Z., Yazdi, I.K., Enzo, M.V., Isenhardt, L., Ferrari, M., Tasciotti, E., 2013. Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 61–68. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.212>
- Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D.J., Kreitman, R.J., 2006. Immunotoxin therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 559–565. <https://doi.org/10.1038/nrc1891>
- Patel, Moghimi, 1998. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system - The concept of tissue specificity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **32**, 45–60.
- Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., 2007a. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 751–760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>
- Peer, D., Margalit, R., 2004. Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models. *Neoplasia* **6**, 343–353. <https://doi.org/10.1593/neo.03460>
- Peer, D., Zhu, P., Carman, C. V., Lieberman, J., Shimaoka, M., 2007b. Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNAs to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4095–4100. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608491104>

- Peigneux, A., Oltolina, F., Colangelo, D., Iglesias, G.R., Delgado, A. V., Prat, M., Jimenez-Lopez, C., 2019. Functionalized Biomimetic Magnetic Nanoparticles as effective nanocarriers for targeted chemotherapy. *Part. Part. Syst. Charact.* **36**, 1900057. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201900057>
- Pereira, C., Pereira, A.M., Quaresma, P., Tavares, P.B., Pereira, E., Araújo, J.P., Freire, C., 2010. Superparamagnetic  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles: A novel support for the immobilization of [VO(acac)<sub>2</sub>]. *Dalt. Trans.* **39**, 2842–2854. <https://doi.org/10.1039/b920853d>
- Perez-Gonzalez, T., Jimenez-Lopez, C., Neal, A.L., Rull-Perez, F., Rodriguez-Navarro, A., Fernandez-Vivas, A., Iañez-Pareja, E., 2010. Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **74**, 967–979. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.10.035>
- Perez-Gonzalez, T., Rodriguez-Navarro, A., Jimenez-Lopez, C., 2011. Inorganic magnetite precipitation at 25 °C: A low-cost inorganic coprecipitation method. *J. Supercond. Nov. Magn.* **24**, 549–557. <https://doi.org/10.1007/s10948-010-0999-y>
- Petros, R.A., Desimone, J.M., 2010. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>
- Pikal-Cleland, K.A., Carpenter, J.F., 2001. Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric  $\beta$ -galactosidase. *J. Pharm. Sci.* **90**, 1255–1268. <https://doi.org/10.1002/jps.1078>
- Polyak, B., Fishbein, I., Chorny, M., Alferiev, I., Williams, D., Yellen, B., Friedman, G., Levy, R.J., 2008. High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 698–703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708338105>
- Pradhan, P., Giri, J., Rieken, F., Koch, C., Mykhaylyk, O., Döblinger, M., Banerjee, R., Bahadur, D., Plank, C., 2010. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *J. Control. Release* **142**, 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.002>
- Prat, M., Medico, E., Rossino, P., Garrino, C., Comoglio, P.M., 1989. Biochemical and immunological properties of the human carcinoma-associated CAR-3 epitope defined by the monoclonal antibody AR-3. *Cancer Res.* **49**, 1415–1421.
- Prat, M., Morra, I., Bussolati, G., Comoglio, P.M., 1985. CAR-3, a monoclonal antibody-defined antigen expressed on human carcinomas. *Cancer Res.* **45**, 5799–5807.
- Pridgen, E.M., Alexis, F., Kuo, T.T., Levy-Nissenbaum, E., Karnik, R., Blumberg, R.S., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2013. Transepithelial transport of Fc-targeted nanoparticles by the neonatal Fc receptor for oral delivery. *Sci. Transl. Med.* **5**, 213ra167. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007049>
- Prost, A.C., Ménégau, F., Langlois, P., Vidal, J.M., Koulibaly, M., Jost, J.L., Duron, J.J., Chigot, J.P., Vayre, P., Aurengo, A., Legrand, J.C., Rosselin, G., Gespach, C., 1998. Differential transferrin receptor density in human colorectal cancer: A potential probe for diagnosis and therapy. *Int. J. Oncol.* **13**, 871–875. <https://doi.org/10.3892/ijo.13.4.871>
- Prozorov, T., Bazylinski, D.A., Mallapragada, S.K., Prozorov, R., 2013. Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: Topical review. *Mater. Sci. Eng. R* **74**, 133–172. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2013.04.002>
- Prozorov, T., Mallapragada, S.K., Narasimhan, B., Wang, L., Palo, P., Nilsen-Hamilton, M., Williams, T.J., Bazylinski, D.A., Prozorov, R., Canfield, P.C., 2007a. Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 951–957. <https://doi.org/10.1002/adfm.200600448>
- Prozorov, T., Palo, P., Wang, L., Nilsen-Hamilton, M., Jones, D.A., Orr, D., Mallapragada, S.K., Narasimhan, B., Canfield, P.C., Prozorov, R., 2007b. Cobalt ferrite nanocrystals: Out-performing magnetotactic bacteria. *ACS Nano* **1**, 228–233. <https://doi.org/10.1021/nn700194h>

- Prozorov, T., Perez-Gonzalez, T., Valverde-Tercedor, C., Jimenez-Lopez, C., Yebra-Rodriguez, A., Körnig, A., Faivre, D., Mallapragada, S.K., Howse, P.A., Bazyliniski, D.A., Prozorov, R., 2014. Manganese incorporation into the magnetosome magnetite: magnetic signature of doping. *Eur. J. Mineral.* **26**, 457–471. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2014/0026-2388>
- Qiao, R., Yang, C., Gao, M., 2009. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: From preparations to in vivo MRI applications. *J. Mater. Chem.* **19**, 6274–6293. <https://doi.org/10.1039/b902394a>
- Qin, J., Asempah, I., Laurent, S., Fornara, A., Muller, R.N., Muhammed, M., 2009. Injectable Superparamagnetic Ferrogels for Controlled Release of Hydrophobic Drugs. *Adv. Mater.* **21**, 1354–1357. <https://doi.org/10.1002/adma.200800764>
- Qu, C., Qian, S., Chen, L., Guan, Y., Zheng, L., Liu, S., Chen, W., Cai, P., Huang, Q., 2019. Size-dependent bacterial toxicity of hematite particles. *Environ. Sci. Technol.* **53**, 8147–8156. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00856>
- Quinlan, A., Murat, D., Vali, H., Komeili, A., 2011. The HtrA/DegP family protease MamE is a bifunctional protein with roles in magnetosome protein localization and magnetite biomineralization. *Mol. Microbiol.* **80**, 1075–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07631.x>
- Radaic, A., de Jesus, M.B., Kapila, Y.L., 2020. Bacterial anti-microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins. *J. Control. Release* **321**, 100–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.001>
- Radovic-Moreno, A.F., Lu, T.K., Puscasu, V.A., Yoon, C.J., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2012. Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. *ACS Nano* **6**, 4279–4287. <https://doi.org/10.1021/nn3008383>
- Ramanathan, R.K., Korn, R.L., Sachdev, J.C., Fetterly, G.J., Marceau, K., Marsh, V., Neil, J.M., Newbold, R.G., Raghunand, N., Prey, J., Klinz, S.G., Bayever, E., Fitzgerald, J.B., 2014. Pilot study in patients with advanced solid tumors to evaluate feasibility of ferumoxytol (FMX) as tumor imaging agent prior to MM-398, a nanoliposomal irinotecan (nal-IRI). *Cancer Res.* **74**, CT224–CT224. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2014-ct224>
- Raschdorf, O., Bonn, F., Zeytuni, N., Zarivach, R., Becher, D., Schüler, D., 2018. A quantitative assessment of the membrane-integral sub-proteome of a bacterial magnetic organelle. *J. Proteomics* **172**, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.10.007>
- Raschdorf, O., Müller, F.D., Pósfai, M., Plitzko, J.M., Schüler, D., 2013. The magnetosome proteins MamX, MamZ and MamH are involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Mol. Microbiol.* **89**, 872–886. <https://doi.org/10.1111/mmi.12317>
- Rawlings, A.E., Bramble, J.P., Walker, R., Bain, J., Galloway, J.M., Staniland, S.S., 2014. Self-assembled MmsF proteinosomes control magnetite nanoparticle formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 16094–16099. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409256111>
- Reddy, L.H., Arias, J.L., Nicolas, J., Couvreur, P., 2012. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* **112**, 5818–5878. <https://doi.org/10.1021/cr300068p>
- Ren, Y., Zhang, H., Chen, B., Cheng, J., Cai, X., Liu, R., Xia, G., Wu, W., Wang, S., Ding, J., Gao, C., Wang, J., Bao, W., Wang, L., Tian, L., Song, H., Wang, X., 2012. Multifunctional magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles combined with chemotherapy and hyperthermia to overcome multidrug resistance. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 2261–2269. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29357>
- Roberts, A.P., Hu, P., Harrison, R.J., Heslop, D., Muxworthy, A.R., Oda, H., Sato, T., Tauxe, L., Zhao, X., 2019. Domain State Diagnosis in Rock Magnetism: Evaluation of Potential Alternatives to the Day Diagram. *J. Geophys. Res. Solid Earth* **124**, 5286–5314. <https://doi.org/10.1029/2018JB017049>

- Rodríguez-Ruiz, I., Delgado-López, J.M., Durán-Olivencia, M.A., Iafisco, M., Tampieri, A., Colangelo, D., Prat, M., Gómez-Morales, J., 2013. pH-responsive delivery of doxorubicin from citrate-apatite nanocrystals with tailored carbonate content. *Langmuir* **29**, 8213–8221. <https://doi.org/10.1021/la4008334>
- Rodriguez, P.L., Harada, T., Christian, D.A., Pantano, D.A., Tsai, R.K., Discher, D.E., 2013. Minimal ‘self’ peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles. *Science* **339**, 971–975. <https://doi.org/10.1126/science.1229568>
- Rosenblum, D., Joshi, N., Tao, W., Karp, J.M., Peer, D., 2018. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat. Commun.* **9**, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03705-y>
- Rosenblum, D., Peer, D., 2014. Omics-based nanomedicine: The future of personalized oncology. *Cancer Lett.* **352**, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.029>
- Rosensweig, R.E., 2002. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *J. Magn. Magn. Mater.* **252**, 370–374. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(02\)00706-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-8853(02)00706-0)
- Le Roy, C., Wrana, J.L., 2005. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 112–126. <https://doi.org/10.1038/nrm1571>
- Rudnick, S.I., Lou, J., Shaller, C.C., Tang, Y., Klein-Szanto, A.J.P., Weiner, L.M., Marks, J.D., Adams, G.P., 2011. Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of anti-HER2 Antibodies in Solid Tumors. *Cancer Res.* **71**, 2250–2259. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2277>
- Rust, D.M., Jameson, G., 1998. The novel lipid delivery system of amphotericin B: drug profile and relevance to clinical practice. *Oncol. Nurs. Forum* **25**, 35–48.
- Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A. V., 2010. Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release* **145**, 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>
- Sahoo, Y., Goodarzi, A., Swihart, M.T., Ohulchanskyy, T.Y., Kaur, N., Furlani, E.P., Prasad, P.N., 2005. Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: Fluorescence labeling and magnetophoretic control. *J. Phys. Chem. B* **109**, 3879–3885. <https://doi.org/10.1021/jp045402y>
- Saiyed, Z.M., Sharma, S., Godawat, R., Telang, S.D., Ramchand, C.N., 2007. Activity and stability of alkaline phosphatase (ALP) immobilized onto magnetic nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). *J. Biotechnol.* **131**, 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.06.017>
- Saiyed, Z.M., Telang, S.D., Ramchand, C.N., 2003. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *Biomagn. Res. Technol.* **1**, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-044X-1-1>
- Salem, K., Jabalera, Y., Puentes-Pardo, J.D., Vilchez-Garcia, J., Sayari, A., Hmida-Sayari, A., Jimenez-Lopez, C., Perduca, M., 2021. Enzyme Storage and Recycling: Nanoassemblies of  $\alpha$ -Amylase and Xylanase Immobilized on Biomimetic Magnetic Nanoparticles. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **9**, 4054–4063. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c08300>
- Salvatore, A., Montis, C., Berti, D., Baglioni, P., 2016. Multifunctional Magnetoliposomes for Sequential Controlled Release. *ACS Nano* **10**, 7749–7760. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03194>
- Sánchez-Barrena, M.J., Martínez-Ripoll, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Cruz, V., Albert, A., 2003. Structure of bacteriocin AS-48: From soluble state to membrane bound state. *J. Mol. Biol.* **334**, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.060>
- Sangregorio, C., Wiemann, J.K., O’Connor, C.J., Rosenzweig, Z., 1999. A new method for the synthesis of magnetoliposomes. *J. Appl. Phys.* **85**, 5699–5701. <https://doi.org/10.1063/1.370256>
- Sanhai, W.R., Spiegel, J., Ferrari, M., 2007. A critical path approach to advance nanoengineered medical products. *Drug Discov. Today Technol.* **4**, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2007.10.003>

- Santra, S., Tapeç, R., Theodoropoulou, N., Dobson, J., Hebard, A., Tan, W., 2001. Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: The effect of nonionic surfactants. *Langmuir* **17**, 2900–2906. <https://doi.org/10.1021/la0008636>
- Sanz, B., Calatayud, M.P., Cassinelli, N., Ibarra, M.R., Goya, G.F., 2015. Long-Term Stability and Reproducibility of Magnetic Colloids Are Key Issues for Steady Values of Specific Power Absorption over Time. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 4524–4531. <https://doi.org/10.1002/ejic.201500303>
- Sanz, B., Calatayud, M.P., Torres, T.E., Fanarraga, M.L., Ibarra, M.R., Goya, G.F., 2017. Magnetic hyperthermia enhances cell toxicity with respect to exogenous heating. *Biomaterials* **114**, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.008>
- Sawant, R.R., Torchilin, V.P., 2012. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *AAPS J.* **14**, 303–315. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9330-0>
- Schiaffino-Ortega, S., Baglioni, E., Mariotto, E., Bortolozzi, R., Serrán-Aguilera, L., Ríos-Marco, P., Carrasco-Jimenez, M.P., Gallo, M.A., Hurtado-Guerrero, R., Marco, C., Basso, G., Viola, G., Entrena, A., López-Cara, L.C., 2016. Design, synthesis, crystallization and biological evaluation of new symmetrical biscationic compounds as selective inhibitors of human Choline Kinase  $\alpha 1$  (ChoKa1). *Sci. Rep.* **6**, 23793. <https://doi.org/10.1038/srep23793>
- Schleich, N., Danhier, F., Pr at, V., 2015. Iron oxide-loaded nanotheranostics: Major obstacles to in vivo studies and clinical translation. *J. Control. Release* **198**, 35–54. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.024>
- Schleich, N., Po, C., Jacobs, D., Ucakar, B., Gallez, B., Danhier, F., Pr at, V., 2014. Comparison of active, passive and magnetic targeting to tumors of multifunctional paclitaxel/SPIO-loaded nanoparticles for tumor imaging and therapy. *J. Control. Release* **194**, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.059>
- Sch ubbe, S., Kube, M., Wawer, C., Heyen, U., Meyerdierks, A., Madkour, M.H., Mayer, F., Reinhardt, R., Schu, D., 2003. Characterization of a Spontaneous Nonmagnetic Mutant of Magnetospirillum gryphiswaldense Reveals a Large Deletion Comprising a Putative Magnetosome Island. *Society* **185**, 5779–5790. <https://doi.org/10.1128/JB.185.19.5779>
- Schulze, E., Ferrucci, J.T., Poss, K., Lapointe, L., Bogdanova, A., Weissleder, R., 1995. Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro. *Invest. Radiol.* **30**, 604–610. <https://doi.org/10.1097/00004424-199510000-00006>
- Schwertmann, U., Cornell, R.M., 1991. Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Senyei, A., Widder, K., Czerlinski, G., 1978. Magnetic guidance of drug-carrying microspheres. *J. Appl. Phys.* **49**, 3578–3583. <https://doi.org/10.1063/1.325219>
- Shah, R.R., Davis, T.P., Glover, A.L., Nikles, D.E., Brazel, C.S., 2015. Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia. *J. Magn. Mater.* **387**, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.03.085>
- Shen, J., Kirschner, J., 2002. Tailoring magnetism in artificially structured materials: The new frontier. *Surf. Sci.* **500**, 300–322. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01557-6](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01557-6)
- Shi, J., Kantoff, P.W., Wooster, R., Farokhzad, O.C., 2017. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>
- Shi, J., Xiao, Z., Kamaly, N., Farokhzad, O.C., 2011. Self-assembled targeted nanoparticles: Evolution of technologies and bench to bedside translation. *Acc. Chem. Res.* **44**, 1123–1134. <https://doi.org/10.1021/ar200054n>

- Shi, M., Ho, K., Keating, A., Shoichet, M.S., 2009. Doxorubicin-conjugated immuno-nanoparticles for intracellular anticancer drug delivery. *Adv. Funct. Mater.* **19**, 1689–1696. <https://doi.org/10.1002/adfm.200801271>
- Shubayev, V.I., Pisanic, T.R., Jin, S., 2009. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 467–477. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.007>
- Silverman, J.A., Deitcher, S.R., 2013. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **71**, 555–564. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2042-4>
- Singh, N., Jenkins, G.J.S., Asadi, R., Doak, S.H., 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev.* **1**, 5358. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>
- Siponen, M.I., Adryanczyk, G., Ginet, N., Arnoux, P., Pignol, D., 2012. Magnetochrome: A c-type cytochrome domain specific to magnetotactic bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1319–1323. <https://doi.org/10.1042/BST20120104>
- Smith, B.R., Kempen, P., Bouley, D., Xu, A., Liu, Z., Melosh, N., Dai, H., Sinclair, R., Gambhir, S.S., 2012. Shape matters: Intravital microscopy reveals surprising geometrical dependence for nanoparticles in tumor models of extravasation. *Nano Lett.* **12**, 3369–3377. <https://doi.org/10.1021/nl204175t>
- Sobczak-Kupiec, A., Venkatesan, J., Alhathal AlAnezi, A., Walczyk, D., Farooqi, A., Malina, D., Hosseini, S.H., Tyliczszak, B., 2016. Magnetic nanomaterials and sensors for biological detection. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 2459–2473. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.07.003>
- Sola-Leyva, A., Jabalera, Y., Chico-Lozano, M.A., Carrasco-Jiménez, M.P., Iglesias, G.R., Jimenez-Lopez, C., 2020. Reactive oxygen species (ROS) production in HepG2 cancer cell line through the application of localized alternating magnetic field. *J. Mater. Chem. B* **8**, 7667–7676. <https://doi.org/10.1039/d0tb01306d>
- Sola-Leyva, A., López-Cara, L.C., Ríos-Marco, P., Ríos, A., Marco, C., Carrasco-Jiménez, M.P., 2019. Choline kinase inhibitors EB-3D and EB-3P interferes with lipid homeostasis in HepG2 cells. *Sci. Rep.* **9**, 5109. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40885-z>
- Southam, G., 2014. Bacterial Surface-Mediated Mineral Formation. In 'Environmental Microbe-Metal Interactions'. American Society of Microbiology, pp. 257–276. <https://doi.org/10.1128/9781555818098.ch12>
- Spera, R., Petralito, S., Liberti, M., Merla, C., d'Inzeo, G., Pinto, R., Apollonio, F., 2014. Controlled release from magnetoliposomes aqueous suspensions exposed to a low intensity magnetic field. *Bioelectromagnetics* **35**, 309–312. <https://doi.org/10.1002/bem.21841>
- Staniland, S., Williams, W., Telling, N., Van Der Laan, G., Harrison, A., Ward, B., 2008. Controlled cobalt doping of magnetosomes in vivo. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 158–162. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.35>
- Stanley, S.A., Gagner, J.E., Damanpour, S., Yoshida, M., Dordick, J.S., Friedman, J.M., 2012. Radio-wave heating of iron oxide nanoparticles can regulate plasma glucose in mice. *Science* **336**, 604–608. <https://doi.org/10.1126/science.1216753>
- Strable, E., Bulte, J.W.M., Moskowitz, B., Vivekanandan, K., Allen, M., Douglas, T., 2001. Synthesis and characterization of soluble iron oxide-dendrimer composites. *Chem. Mater.* **13**, 2201–2209. <https://doi.org/10.1021/cm010125i>
- Subagyo, A., Sueoka, K., 2007. Correlation between Surface Structure and Charge Ordering in Magnetite(001) Studied by Scanning Tunneling Microscopy and Spectroscopy. *J. Phys. Conf. Ser.* **61**, 1102–1106. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/61/1/218>



- Sun, J., Li, Y., Liang, X.J., Wang, P.C., 2011. Bacterial magnetosome: A novel biogenetic magnetic targeted drug carrier with potential multifunctions. *J. Nanomater.* **2011**, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/469031>
- Sun, J., Tang, T., Duan, J., Xu, P.X., Wang, Z., Zhang, Y., Wu, L., Li, Y., 2010. Biocompatibility of bacterial magnetosomes: Acute toxicity, immunotoxicity and cytotoxicity. *Nanotoxicology* **4**, 271–283. <https://doi.org/10.3109/17435391003690531>
- Sun, S., Murray, C.B., Weller, D., Folks, L., Moser, A., 2000. Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. *Science* **287**, 1989–1992. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.1989>
- Sun, Z.X., Su, F.W., Forsling, W., Samskog, P.O., 1998. Surface characteristics of magnetite in aqueous suspension. *J. Colloid Interface Sci.* **197**, 151–159. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5239>
- Takahashi, Y., Hirata, T., Shimizu, H., Ozaki, T., Fortin, D., 2007. A rare earth element signature of bacteria in natural waters? *Chem. Geol.* **244**, 569–583. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2007.07.005>
- Tanaka, M., Arakaki, A., Matsunaga, T., 2010. Identification and functional characterization of liposome tubulation protein from magnetotactic bacteria. *Mol. Microbiol.* **76**, 480–488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07117.x>
- Tanaka, M., Brown, R., Hondow, N., Arakaki, A., Matsunaga, T., Staniland, S., 2012. Highest levels of Cu, Mn and Co doped into nanomagnetic magnetosomes through optimized biomineralisation. *J. Mater. Chem.* **22**, 11919–11921. <https://doi.org/10.1039/c2jm31520c>
- Tanaka, M., Knowles, W., Brown, R., Hondow, N., Arakaki, A., Baldwin, S., Staniland, S., Matsunaga, T., 2016. Biomagnetic recovery and bioaccumulation of selenium granules in magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3886–3891. <https://doi.org/10.1128/AEM.00508-16>
- Tanaka, M., Mazuyama, E., Arakaki, A., Matsunaga, T., 2011. MMS6 protein regulates crystal morphology during nano-sized magnetite biomineralization in vivo. *J. Biol. Chem.* **286**, 6386–6392. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.183434>
- Tanaka, T., Takeda, H., Ueki, F., Obata, K., Tajima, H., Takeyama, H., Goda, Y., Fujimoto, S., Matsunaga, T., 2004. Rapid and sensitive detection of 17 $\beta$ -estradiol in environmental water using automated immunoassay system with bacterial magnetic particles. *J. Biotechnol.* **108**, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.11.010>
- Tang, L., Fan, T.M., Borst, L.B., Cheng, J., 2012. Synthesis and biological response of size-specific, monodisperse drug-silica nanoconjugates. *ACS Nano* **6**, 3954–3966. <https://doi.org/10.1021/nn300149c>
- Teja, A.S., Koh, P.Y., 2009. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **55**, 22–45. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003>
- Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S.K., Stauber, R.H., 2013. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 772–781. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.181>
- Thomas-Keprta, K.L., Bazylinski, D.A., Kirschvink, J.L., Clemett, S.J., McKay, D.S., Wentworth, S.J., Vali, H., Gibson, E.K., Romanek, C.S., 2000. Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: Potential Martian magnetofossils. *Geochim. Cosmochim. Acta* **64**, 4049–4081. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00481-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00481-6)
- Thomas-Keprta, K.L., Clemett, S.J., Bazylinski, D.A., Kirschvink, J.L., McKay, D.S., Wentworth, S.J., Vali, H., Gibson, E.K., McKay, M.F., Romanek, C.S., 2001. Truncated hexa-octahedral magnetite crystals in ALH84001: Presumptive biosignatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2164–2169. <https://doi.org/10.1073/pnas.051500898>

- Thomas-Keprta, K.L., Clemett, S.J., Bazylinski, D.A., Kirschvink, J.L., McKay, D.S., Wentworth, S.J., Vali, H., Gibson, E.K., Romanek, C.S., 2002. Magnetofossils from ancient Mars: A robust biosignature in the Martian meteorite ALH84001. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3663–3672. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3663-3672.2002>
- Thomas-Keprta, K.L., Clemett, S.J., McKay, D.S., Gibson, E.K., Wentworth, S.J., 2009. Origins of magnetite nanocrystals in Martian meteorite ALH84001. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 6631–6677. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.05.064>
- Thompson, K., Lawrence, D., Larson, D.J., Olson, J.D., Kelly, T.F., Gorman, B., 2007. In situ site-specific specimen preparation for atom probe tomography. *Ultramicroscopy* **107**, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2006.06.008>
- Torchilin, V.P., 2014. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 813–827. <https://doi.org/10.1038/nrd4333>
- Torres de Araujo, F.F., Pires, M.A., Frankel, R.B., Bicudo, C.E.M., 1986. Magnetite and Magnetotaxis in Algae. *Biophys. J.* **50**, 375–378. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83471-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83471-3)
- Toy, R., Peiris, P.M., Ghaghada, K.B., Karathanasis, E., 2014. Shaping cancer nanomedicine: The effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles. *Nanomedicine* **9**, 121–134. <https://doi.org/10.2217/nmm.13.191>
- Trapani, G., Denora, N., Trapani, A., Laquintana, V., 2012. Recent advances in ligand targeted therapy. *J. Drug Target.* **20**, 1–22. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.611518>
- Tresilwised, N., Pithayanukul, P., Mykhaylyk, O., Holm, P.S., Holzmüller, R., Anton, M., Thalhammer, S., Adigüzel, D., Döblinger, M., Plank, C., 2010. Boosting oncolytic adenovirus potency with magnetic nanoparticles and magnetic force. *Mol. Pharm.* **7**, 1069–1089. <https://doi.org/10.1021/mp100123t>
- Turiel, E., Perez-Conde, C., Martin-Esteban, A., 2003. Assessment of the cross-reactivity and binding sites characterisation of a propazine-imprinted polymer using the Langmuir-Freundlich isotherm. *Analyst* **128**, 137–141. <https://doi.org/10.1039/b210712k>
- Ubago-Rodríguez, A., Casares Atienza, S., Fernández-Vivas, A., Peigneux, A., Jabalera, Y., De La Cuesta-Rivero, M., Jimenez-Lopez, C., Azuaga Fortes, A.I., 2019. Structure-Function of MamC Loop and Its Effect on the in Vitro Precipitation of Biomimetic Magnetite Nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* **19**, 2927–2935. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00150>
- Uchida, M., Flenniken, M.L., Allen, M., Willits, D.A., Crowley, B.E., Brumfield, S., Willis, A.F., Jackiw, L., Jutila, M., Young, M.J., Douglas, T., 2006. Targeting of cancer cells with ferrimagnetic ferritin cage nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 16626–16633. <https://doi.org/10.1021/ja0655690>
- Uebe, R., Junge, K., Henn, V., Poxleitner, G., Katzmann, E., Plitzko, J.M., Zarivach, R., Kasama, T., Wanner, G., Pósfai, M., Böttger, L., Matzanke, B., Schüler, D., 2011. The cation diffusion facilitator proteins MamB and MamM of *Magnetospirillum gryphiswaldense* have distinct and complex functions, and are involved in magnetite biomineralization and magnetosome membrane assembly. *Mol. Microbiol.* **82**, 818–835. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07863.x>
- Uebe, R., Schüler, D., 2016. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 621–637. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.99>
- Ullah, S., Seidel, K., Türkkán, S., Warwas, D.P., Dubich, T., Rohde, M., Hauser, H., Behrens, P., Kirschning, A., Köster, M., Wirth, D., 2019. Macrophage entrapped silica coated superparamagnetic iron oxide particles for controlled drug release in a 3D cancer model. *J. Control. Release* **294**, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.040>
- Vali, H., Weiss, B., Li, Y.L., Sears, S.K., Soon, S.K., Kirschvink, J.L., Zhang, C.L., 2004. Formation of tabular single-domain magnetite induced by *Geobacter metallireducens* GS-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16121–16126. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404040101>

- Valverde-Tercedor, C., Montalbán-López, M., Perez-Gonzalez, T., Sanchez-Quesada, M.S., Prozorov, T., Pineda-Molina, E., Fernandez-Vivas, M.A., Rodriguez-Navarro, A.B., Trubitsyn, D., Bazylinski, D.A., Jimenez-Lopez, C., 2015. Size control of *in vitro* synthesized magnetite crystals by the MamC protein of *Magnetococcus marinus* strain MC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 5109–5121. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6326-y>
- Varallyay, P., Nesbit, G., Muldoon, L.L., Nixon, R.R., Delashaw, J., Cohen, J.I., Petrillo, A., Rink, D., Neuwelt, E.A., 2002. Comparison of two superparamagnetic viral-sized iron oxide particles ferumoxides and ferumoxtran-10 with a gadolinium chelate in imaging intracranial tumors. *Am. J. Neuroradiol.* **23**, 510–519.
- Vazdar, M., Jungwirth, P., Mason, P.E., 2013. Aqueous guanidinium-carbonate interactions by molecular dynamics and neutron scattering: Relevance to ion-protein interactions. *J. Phys. Chem. B* **117**, 1844–1848. <https://doi.org/10.1021/jp310719g>
- Venkatesan, N., 2017. Bioisoterism Review - An Biological Modification. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **6**, 1918–1949. <https://doi.org/10.20959/wjpps20179-10126>
- Ventola, C.L., 2017. Progress in nanomedicine: Approved and investigational nanodrugs. *P T* **42**, 742–755.
- Vihodceva, S., Šutka, A., Sihtmäe, M., Rosenberg, M., Otsus, M., Kurvet, I., Smits, K., Bikse, L., Kahru, A., Kasemets, K., 2021. Antibacterial activity of positively and negatively charged hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio fischeri*. *Nanomaterials* **11**, 1–26. <https://doi.org/10.3390/nano11030652>
- Vikesland, P.J., Rebodos, R.L., Bottero, J.Y., Rose, J., Masion, A., 2016. Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters. *Environ. Sci. Nano* **3**, 567–577. <https://doi.org/10.1039/c5en00155b>
- van Vlerken, L.E., Duan, Z., Little, S.R., Seiden, M. V., Amiji, M.M., 2008. Biodistribution and pharmacokinetic analysis of paclitaxel and ceramide administered in multifunctional polymer-blend nanoparticles in drug resistant breast cancer model. *Mol. Pharm.* **5**, 516–526. <https://doi.org/10.1021/mp800030k>
- Walcott, C., Goulu, J.L., Kirschvink, J.L., 1979. Pigeons have magnets. *Science* **205**, 1027–1029. <https://doi.org/10.1126/science.472725>
- Wang, Y., Kohane, D.S., 2017. External triggering and triggered targeting strategies for drug delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.20>
- Weiner, S., Dove, P., 2003. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Rev. Mineral. Geochemistry* **54**, 1–29. <https://doi.org/10.2113/0540001>
- Weissleder, R., Bogdanov, A., Neuwelt, E.A., Papisov, M., 1995. Long-circulating iron oxides for MR imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 321–334. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00033-4](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00033-4)
- White, B.R., Stackhouse, B.T., Holcombe, J.A., 2009. Magnetic  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles coated with poly-l-cysteine for chelation of As(III), Cu(II), Cd(II), Ni(II), Pb(II) and Zn(II). *J. Hazard. Mater.* **161**, 848–853. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.105>
- Wicki, A., Rochlitz, C., Orleth, A., Ritschard, R., Albrecht, I., Herrmann, R., Christofori, G., Mamot, C., 2012. Targeting tumor-associated endothelial cells: Anti-VEGFR2 immunoliposomes mediate tumor vessel disruption and inhibit tumor growth. *Clin. Cancer Res.* **18**, 454–464. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1102>
- Widder, K.J., Senyei, A.E., Scarpelli, D.G., 1978. Magnetic Microspheres: A Model System for Site Specific Drug Delivery in Vivo. *Exp. Biol. Med.* **158**, 141–146. <https://doi.org/10.3181/00379727-158-40158>
- Wilhelm, C., Gazeau, F., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.C., 2002. Interaction of anionic superparamagnetic

- nanoparticles with cells: Kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir* **18**, 8148–8155. <https://doi.org/10.1021/la0257337>
- Wilhelm, S., Tavares, A.J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H.F., Chan, W.C.W., 2016. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 1–12. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>
- Wilkins, D.K., Grimshaw, S.B., Receveur, V., Dobson, C.M., Jones, J.A., Smith, L.J., 1999. Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry* **38**, 16424–16431. <https://doi.org/10.1021/bi991765q>
- Willerding, L., Limmer, S., Hossann, M., Zengerle, A., Wachholz, K., ten Hagen, T.L.M., Koning, G.A., Sroka, R., Lindner, L.H., Peller, M., 2016. Method of hyperthermia and tumor size influence effectiveness of doxorubicin release from thermosensitive liposomes in experimental tumors. *J. Control. Release* **222**, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.004>
- Winklhofer, M., 2008. Magnetite. In 'Encyclopedia of Neuroscience'. Springer Berlin Heidelberg, pp. 2220–2225. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2\\_3282](https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_3282)
- Witt, A., Fabian, K., Bleil, U., 2005. Three-dimensional micromagnetic calculations for naturally shaped magnetite: Octahedra and magnetosomes. *Earth Planet. Sci. Lett.* **233**, 311–324. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2005.01.043>
- Xiong, Z., Sun, Z. Bin, Zheng, M.L., Cao, Y.Y., Jin, F., Chen, W.Q., Zhao, Z.S., Duan, X.M., 2011. A facile method for the room-temperature synthesis of water-soluble magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Combination of in situ synthesis and decomposition of polymer hydrogel. *Mater. Chem. Phys.* **130**, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.05.083>
- Yamagishi, A., Narumiya, K., Tanaka, M., Matsunaga, T., Arakaki, A., 2016. Core Amino Acid Residues in the Morphology-Regulating Protein, Mms6, for Intracellular Magnetite Biomineralization. *Sci. Rep.* **6**, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep35670>
- Yamamoto, Y., Nagasaki, Y., Kato, Y., Sugiyama, Y., Kataoka, K., 2001. Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *J. Control. Release* **77**, 27–38. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00451-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00451-5)
- Yan, L., Zhang, S., Chen, P., Wang, W., Wang, Y., Li, H., 2013. Magnetic properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 4026–4031. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.046>
- Yan, L., Zhang, S., Liu, H., Wang, W., Chen, P., Li, H., 2016. Optimization of magnetosome production by *Acidithiobacillus ferrooxidans* using desirability function approach. *Mater. Sci. Eng. C* **59**, 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.060>
- Yang, H.W., Hua, M.Y., Liu, H.L., Tsai, R.Y., Pang, S.T., Hsu, P.H., Tang, H.J., Yen, T.C., Chuang, C.K., 2012. An epirubicin-conjugated nanocarrier with MRI function to overcome lethal multidrug-resistant bladder cancer. *Biomaterials* **33**, 3919–3930. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.020>
- Yao, X., Niu, X., Ma, K., Huang, P., Grothe, J., Kaskel, S., Zhu, Y., 2017. Graphene Quantum Dots-Capped Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles as a Multifunctional Platform for Controlled Drug Delivery, Magnetic Hyperthermia, and Photothermal Therapy. *Small* **13**, 1602225. <https://doi.org/10.1002/sml.201602225>
- Yatvin, M.B., Weinstein, J.N., Dennis, W.H., Blumenthal, R., 1978. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* **202**, 1290–1293. <https://doi.org/10.1126/science.364652>
- Yokoi, K., Tanei, T., Godin, B., van de Ven, A.L., Hanibuchi, M., Matsunoki, A., Alexander, J., Ferrari, M., 2014. Serum biomarkers for personalization of nanotherapeutics-based therapy in different tumor and organ microenvironments. *Cancer Lett.* **345**, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.015>

- Yoo, D., Lee, J.H., Shin, T.H., Cheon, J., 2011. Theranostic magnetic nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **44**, 863–874. <https://doi.org/10.1021/ar200085c>
- Yu, M., Zheng, J., 2015. Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles. *ACS Nano* **9**, 6655–6674. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b01320>
- Yuan, Y.Y., Mao, C.Q., Du, X.J., Du, J.Z., Wang, F., Wang, J., 2012. Surface charge switchable nanoparticles based on zwitterionic polymer for enhanced drug delivery to tumor. *Adv. Mater.* **24**, 5476–5480. <https://doi.org/10.1002/adma.201202296>
- Zeytuni, N., Ozyamak, E., Ben-harush, K., Davidov, G., Levin, M., Gat, Y., Moyal, T., 2011. Self-recognition mechanism of MamA, a magnetosome-associated TPR-containing protein, promotes complex assembly. *PNAS* **108**, 480–487. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103367108/-/DCSupplemental>. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103367108](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103367108)
- Zhang, H.L., Lai, G.S., Han, D.Y., Yu, A.M., 2008a. An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of horseradish peroxidase on an electrode modified with magnetic dextran microspheres. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 971–977. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1748-3>
- Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S., Farokhzad, O.C., 2008b. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 761–769. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100400>
- Zhi, J., Wang, Y., Lu, Y., Ma, J., Luo, G., 2006. In situ preparation of magnetic chitosan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composite nanoparticles in tiny pools of water-in-oil microemulsion. *React. Funct. Polym.* **66**, 1552–1558. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2006.05.006>
- Zhou, C., Long, M., Qin, Y., Sun, X., Zheng, J., 2011. Luminescent gold nanoparticles with efficient renal clearance. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 3168–3172. <https://doi.org/10.1002/anie.201007321>
- Zhu, X., Wu, J., Shan, W., Tao, W., Zhao, L., Lim, J.M., D'Ortenzio, M., Karnik, R., Huang, Y., Shi, J., Farokhzad, O.C., 2016. Polymeric Nanoparticles Amenable to Simultaneous Installation of Exterior Targeting and Interior Therapeutic Proteins. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 3309–3312. <https://doi.org/10.1002/anie.201509183>
- von zur Muhlen, C., von Elverfeldt, D., Bassler, N., Neudorfer, I., Steitz, B., Petri-Fink, A., Hofmann, H., Bode, C., Peter, K., 2007. Superparamagnetic iron oxide binding and uptake as imaged by magnetic resonance is mediated by the integrin receptor Mac-1 (CD11b/CD18): Implications on imaging of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **193**, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.048>