

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología

Facultad de Ciencias



**Caracterización de nanosistemas magnéticos y su aplicación en  
quimioterapia dirigida y nanorremediación**

**Programa Oficial de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas**

**Ana Peigneux Navarro**

**TESIS DOCTORAL**

**Granada, 2019**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Ana Peigneux Navarro  
ISBN: 978-84-1117-161-8  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71862>



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Granada durante los años 2015-2019 dentro del grupo de investigación Mixobacterias.

Para realizar esta Tesis Doctoral la doctoranda ha disfrutado de:

- Una ayuda para la Formación de Personal Investigador (F.P.I.) (BES-2014-071206) a cargo del proyecto CGL2013-46612-P del Ministerio de Economía y Competitividad, cuya investigadora principal es la Dra. Concepción Jiménez López, Profesora Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada.
  
- Cuatro ayudas para la realización de Estancias Breves (E.E.B.B.) en centros extranjeros, con referencias: EEBB-I-16-11093 (92 días), EEBB-I-17-12558 (92 días), EEBB-I-18-12984 (102 días), EST2019-013134-I (60 días), también financiadas por el Ministerio de Economía y Competitividad.





Durante el transcurso de esta Tesis Doctoral se han mantenido colaboraciones internacionales, consolidadas durante las estancias realizadas, con grupos de investigación de la Università del Piemonte Orientale A. Avogadro (Novara, Italia) y de la Freie Universität Berlin (Alemania). También se ha iniciado un proyecto con el Dr. Hincke de la University of Ottawa y se ha continuado la colaboración previamente establecida con la Ben-Gurion University of the Negev (Beer Sheva, Israel).

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido incluidos en la patente internacional, actualmente en evaluación, “Biomimetic magnetic nanoparticles comprising MamC” (referencia: P201831064), se han publicado o enviado a revistas de impacto JCR y se han presentado en congresos nacionales e internacionales:

### **1.- Artículos publicados o enviados con los resultados derivados de esta Tesis Doctoral:**

- **Ana Peigneux**, Ylenia Jabalera, Ma Antonia Fernández Vivas, Salvador Casares, Ana I. Azuaga, Concepción Jimenez-Lopez. (2019). Tuning properties of biomimetic magnetic nanoparticles by combining magnetosome associated proteins. *Sci Rep.* 9(1), 8804.  
<https://www.nature.com/articles/s41598-019-45219-7>
- Germán García Rubia, **Ana Peigneux**, Ylenia Jabalera, Javier Puerma, Francesca Oltolina, Kerstin Elert, Donato Colangelo, Jaime Gómez Morales, Maria Prat, Concepción Jiménez-López (2018). pH-dependent adsorption-release of doxorubicin on MamC-biomimetic magnetite nanoparticles. *Langmuir.* 34(45), 13713-13724.  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.8b03109>
- **Ana Peigneux**, Francesca Oltolina, Donato Colangelo, Guillermo R. Iglesias, Angel V. Delgado, Maria Prat, Concepcion Jimenez-Lopez (2019). Functionalized biomimetic magnetic nanoparticles as effective nanocarriers for targeted chemotherapy. *Part. Part. Syst. Charact.*, 36(6), 1900057.  
<https://doi.org/10.1002/ppsc.201900057>
- **Ana Peigneux**, Emanuel Glitscher, Rawan Charbaji, Christoph Weise, Stefanie Wedepohl, Marcelo Calderón, Concepción Jimenez-Lopez, Sarah Hedtrich. Protein corona formation and its influence on biomimetic magnetite nanoparticles.  
This manuscript will be submitted to *Biomacromolecules*.
- Francesca Oltolina, **Ana Peigneux**, Guillermo R. Iglesias, Annarita D'urso, Nausicaa Clemente, Gloria Fornaro, Paco Farina, Donato Colangelo, Concepción Jimenez-Lopez, Maria Prat. *In vivo* magnetic drug targeting and hyperthermia treatment by using biomimetic magnetite nanoparticles.  
This manuscript will be submitted to *Nanomedicine: NBM*.

- **Ana Peigneux**, Jose D. Puentes-Pardo, Alejandro B. Rodríguez-Navarro, Maxwell T. Hincke, Concepción Jimenez-Lopez. Green synthesis and use of magnetic eggshell membranes for removal of lead from contaminated waters. This manuscript will be submitted to *Journal of environmental management*.

## 2.- Artículos publicados en temas afines aunque **no objeto** de la presente Tesis Doctoral:

- Ylenia Jabalera, Alberto Sola-Leyva, **Ana Peigneux**, Federica Vurro, Guillermo R. Iglesias, Jesus Vilchez-Garcia, Inmaculada Pérez-Prieto, Francisco J. Aguilar-Troyano, Luisa C. López-Cara, María P. Carrasco-Jiménez, Concepcion Jimenez-Lopez (2019). Biomimetic magnetic nanocarriers drive choline kinase alpha inhibitor inside cancer cells for combined chemo-hyperthermia therapy. *Pharmaceutics*, 11(8), 408.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080408>
- Guillermo R. Iglesias, Ylenia Jabalera, **Ana Peigneux**, Blanca Luna Checa Fernández, Ángel V. Delgado, Concepcion Jimenez-Lopez (2019). Enhancement of magnetic hyperthermia by mixing synthetic inorganic and biomimetic magnetic nanoparticles. *Pharmaceutics*, 11(6), 273.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060273>
- Ana Ubago-Rodríguez, Salvador Casares Atienza, Antonia Fernández-Vivas, **Ana Peigneux**, Ylenia Jabalera, Mario de la Cuesta-Rivero, Concepción Jimenez-Lopez, Ana I. Azuaga Fortes (2019). Structure–function of MamC loop and its effect on the in vitro precipitation of biomimetic magnetite nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* 19(5), 2927-2935.  
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.cgd.9b00150>
- Ylenia Jabalera, Salvador Casares-Atienza, Antonia Fernandez-Vivas, **Ana Peigneux**, Ana Isabel Azuaga-Fortes, Concepcion Jimenez-Lopez (2019). Scaling-up biomimetic nanoparticles production. *Cryst. Growth Des.* 19(2), 1064–1071.  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.cgd.8b01590>
- Hila Nudelman, Teresa Perez Gonzalez, Sofiya Kolushiva, Marc Widdrat, Victoria Reichel, **Ana Peigneux**, Geula Davidov, Ronit Bitton, Damien Faivre, Concepcion Jimenez-Lopez and Raz Zarivach (2018). The importance of the helical structure of a MamC-derived magnetite-interacting peptide for its function in magnetite formation. *Acta Cryst. D.* 74, 10-20.  
<https://doi.org/10.1107/S2059798317017491>

- **Ana Peigneux**, Carmen Valverde-Tercedor, Rafael Lopez-Moreno, Teresa Perez-Gonzalez, M. A. Fernandez-Vivas, Concepcion Jimenez-Lopez (2016). Learning from magnetotactic bacteria: A review on the synthesis of biomimetic nanoparticles mediated by magnetosome-associated proteins. *J Struct Biol.* 196(2), 75-85.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.06.026>

### 3.- Resultados presentados en congresos nacionales e internacionales:

- Póster: Jose D. Puentes-Pardo, **Ana Peigneux**, Concepción Jiménez-Lopez. Lead removal from contaminated environments using a magnetic nanosystem. VI International Conference of Graduates in Health Sciences. 11-12 July 2019. Almería, Spain.
- Comunicación oral: Jose D. Puentes-Pardo, **Ana Peigneux**, Alejandro, Rodríguez-Navarro, Maxwell Hincke, Concepción Jiménez-López. Development of a magnetic nanosystem for the removal of lead in wastewater. I Conference on Environment and Sustainability. 13-14 June 2019. Granada, Spain.
- Comunicación oral: Francesca Oltolina, **Ana Peigneux**, Concepcion Jimenez-Lopez, Maria Prat. Functionalized biomimetic magnetic nanoparticles as effective nanocarriers for tumor targeted chemotherapy. 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Future of Regenerative Medicine Ostuni. 3-5 Octubre 2018. Puglia, Italia.
- Comunicación oral: **Ana Peigneux**, Francesca Oltolina, Irene Masante, Donato Colangelo, Guillermo R. Iglesias, Angel V. Delgado-Mora, Maria Prat, Concepcion Jimenez-Lopez. Functionalized biomimetic magnetite nanoparticles as smart nanocarriers. Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology (ICONAN). 25-28 Septiembre 2018. Roma, Italia.
- Póster: Y Jabalera, **A Peigneux**, G Iglesias, M Montalbán-López, A Sola, LC López-Cara, MA Fernandez-Vivas, A Delgado, MP Carrasco-Jimenez, M Maqueda, C Jimenez-Lopez. Biomimetic magnetic nanoparticles: an useful tool in nanotechnology. Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology (ICONAN). 25-28 Septiembre 2018. Roma, Italia.
- Comunicación oral: **Ana Peigneux**, Francesca Oltolina, Irene Masante, Donato Colangelo, Guillermo R. Iglesias, Angel V. Delgado-Mora, Maria Prat, Concepcion Jimenez-Lopez. Anti-tumor activity of functionalized biomimetic magnetite nanoparticles produced in the presence of MamC protein of *Magnetococcus marinus* MC-1. 3<sup>rd</sup> World Biotechnology Congress. 16-17 Julio 2018. Berlin, Alemania.

- Póster: Francesca Oltolina, **Ana Peigneux Navarro**, Irene Masante, Donato Colangelo, Guillermo R. Iglesias, Angel V. Delgado, Concepcion Jimenez-Lopez, Maria Prat. Functionalized biomimetic magnetic nanoparticles as drug delivery systems. Advanced magnetic materials and devices for biomedical applications, Italian School of Magnetism. 21-25 Mayo 2018. Turín, Italia.
- 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. 5<sup>th</sup> Granada-Münster Discussion Meeting. 30 Noviembre - 01 Diciembre 2017. Granada, España.
- Póster: **Ana Peigneux**, Ylenia Jabalera, Raz Zarivach, María Antonia Fernandez-Vivas, Concepción Jimenez-Lopez. Toward the in vitro production of magnetosome-like magnetites through the combined effect of the magnetosome-associated proteins MamC and Mms6 from *Magnetococcus marinus* MC-1. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS). 9-13 Julio 2017. Valencia, España.
- Comunicación oral: Maria Prat, Francesca Oltolina, **Ana Peigneux**, Guillermo R. Iglesias, Angel V. Delgado-Mora, Concepcion Jimenez-Lopez. Biomimetic magnetite nanoparticles as smart nanocarriers for cancer therapy. VIth Interdisciplinary Congress on Head and Neck Diseases. 17-19 Mayo 2017. Moscú, Rusia.
- Comunicación oral: Jabalera Y., **Peigneux A.**, Fernandez-Vivas M.A., Jimenez-Lopez C. In vitro production of magnetite nanocrystals in presence of Mms6 and MamC proteins. IV Workshop of Young Biotechnologists. 3-4 Abril 2017. Granada, España.
- Comunicación oral: Ylenia Jabalera, **Ana Peigneux**, Rafael Lopez-Moreno, Germán García Rubia, Antonia Fernandez-Vivas, Concepción Jiménez. Formation of magnetite biomimetic particles by magnetosome proteins of *Magnetococcus marinus* MC-1. I Congress of Young Therapeutic Chemists and Biochemists (QUIMBIOQUIM). 3-4 Octubre 2016. Granada, España.
- Comunicación oral: Teresa Pérez-González, Carmen Valverde-Tercedor, **Ana Peigneux-Navarro**, Concepción Jiménez-López. Biomimetics, looking for inspiration in nature for the magnetic nanoparticles synthesis. I Congress of Young Therapeutic Chemists and Biochemists (QUIMBIOQUIM). 3-4 Octubre 2016. Granada, España.
- Póster: **A. Peigneux**, Y. Jabalera, R. Zarivach, M.A. Fernandez-Vivas, C. Jimenez-Lopez. The combined effect of MamC and Mms6 from *Magnetococcus*

marinus MC-1 in magnetite biomineralization in vitro. 5th International meeting on magnetotactic bacteria. 11-15 Septiembre 2016. Marsella, Francia.

- Comunicación oral: Concepcion Jimenez-Lopez, Rafael López Moreno, Hila Nudelman, **Ana Peigneux Navarro**, Carmen Valverde-Tercedor, M. Antonia Fernandez-Vivas, Raz Zarivach. Biomimetic magnetite nanoparticles mediated by magnetosome proteins. Workshop: The Spanish Model of Diffraction Services. V Meeting of the Italian and Spanish Crystallographic Associations (MISCA). 21-15 Junio 2016. Tenerife, España.
- Comunicación oral: **Ana Peigneux**, Carmen Valverde-Tercedor, Concepción Jiménez-Lopez. Study of MamC, Mms6 and Mms7 proteins and its effect on magnetite mineralization in vitro. I Meeting of Young Researchers. 18-25 Mayo 2016. Granada, España.
- Comunicación oral: Ylenia Jabalera, **Ana Peigneux**, Rafael López-Moreno, Germán García Rubia, Concepción Jiménez, María A Fernández. Purification of recombinant proteins from *Magnetococcus marinus* MC-1: Mms6 and Mms7. III Workshop of Young Biotechnologists. 9-10 Mayo 2016. Granada, España.
- Comunicación oral: Rafael Lopez-Moreno, Germán García Rubia, Antonia Fernandez-Vivas, Carmen Valverde-Tercedor, Teresa Perez-Gonzalez, **Ana Peigneux**, Ylenia Jabalera, Concepción Jiménez. Obtaining biomimetic magnetite particles for application as a drug transporter. III Workshop of Young Biotechnologists. 9-10 Mayo 2016. Granada, España. \*Awarded
- Comunicación oral: **Ana Peigneux**, Javier Puerma, Miguel Sebastián Sanchez-Quesada, Teresa Perez-Gonzalez, Rafael Lopez-Moreno, Antonia Fernández-Vivas, Concepción Jimenez-Lopez. Purification of Mms6 and Mms7 proteins involved on magnetite mineralization. Structure and Function of Proteins Network Meeting. 11-13 Noviembre, 2015. Sevilla, España.
- Comunicación oral: **Ana Peigneux**, Javier Puerma, Miguel Sebastián Sanchez-Quesada, Teresa Perez-Gonzalez, Rafael Lopez-Moreno, Antonia Fernández-Vivas, Concepción Jimenez-Lopez. The effect of Mms6 and Mms7 of *Magnetococcus marinus* MC-1 on magnetite mineralization. 13<sup>th</sup> International Symposium on Biomineralization. 16-19 Septiembre 2015. Granada, España.
- Comunicación oral: Teresa Pérez-Gonzalez, María Gutiérrez-Pozo, Nicolás Baeza-Lara, Rafael López-Moreno, **Ana Peigneux**, Antonia Fernández-Vivas, Concepción Jiménez-López. First steps in the functionalization of single domain biomimetic magnetite nanoparticles. 13th International Symposium on Biomineralization. 16-19 Septiembre 2015. Granada, España.



You never fail until you stop trying

No fracasas hasta que dejas de intentarlo

Non fallire fino a quando non smetti di provare

Man scheitert nicht, bis man aufhört es zu versuchen

*Albert Einstein*





*A mis padres y mi hermana*

*A Ema*



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Concepción Jiménez López que me haya dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo han sido un aporte invaluable no solo en el desarrollo de esta Tesis, sino también en mi formación como investigadora. Gracias por tus consejos tanto a nivel profesional como personal.

En Sundo lugar, quiero agradecer a todas las personas que han participado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Gracias al Dr. Maxwell Hincke por su colaboración en la producción de las membranas magnéticas, siempre en un ambiente agradable y aportando interesantes ideas, y al Dr. Alejandro Rodríguez Navarro por su dedicación en los análisis de XRD y FT-IR. Al Dr. Guillermo Iglesias y al Dr. Ángel Delgado del Departamento de Física Aplicada por su asistencia en los análisis de hipertermia magnética. Al Dr. Rubén Cebrián y al Dr. Manuel Montalbán por toda su ayuda con el HPLC. A la Dra. Antonia Fernández Vivas por enseñarme a purificar MamC. A la Dra. Teresa Pérez-González por introducirme en el mundo de la síntesis de magnetita en condiciones anaeróbicas. Y al personal del Centro de Instrumentación Científica por su ayuda técnica y dedicación.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Maria Prat y a la Dra. Sarah Hedtrich por haberme acogido en sus laboratorios durante mis estancias en el extranjero, que han sido indispensables para realizar esta Tesis. En todas ellas he podido crecer tanto profesional como personalmente gracias a los grandes profesionales y amigos que he conocido. En Novara quiero agradecer especialmente a la Dra. Francesa Oltolina que me introdujera en el mundo de los cultivos celulares y a todo el “Isto team” por hacerme sentir como en casa. Muchas gracias también a mis compis de piso y los buenos amigos que he hecho durante las tres estancias en Novara. Todo empezó con planes en casa, la mensa, el 049, el Ryns, las salidas a Milán, el viaje a Bucarest... y todavía continua, me alegra que no perdamos el contacto. En Berlín quiero agradecer mi buena acogida en todos los grupos de investigación que tuve la oportunidad de trabajar. Muchas gracias al Dr. Christoph Weisse por toda su ayuda en la identificación de proteínas, siempre trabajando en un ambiente ameno y distendido. Al Departamento de Farmacia por incluirme en todos sus planes, barbacoas, apuestas del mundial... Al grupo del Dr. Marcelo Calderón, sin los que mi estancia en Berlín no habría la misma. Gracias por todos los buenos ratos en la mensa, de cervezas los Viernes y en el biolab.

Especialmente quiero agradecer a Anna (AP), con la que pude contar en todo momento. Somos el mejor equipo de autoclave, de limpieza del biolab e invadiendo la campana de los chinos. Por último quiero agradecer a mi familia de españoles en Berlín por todos los buenos momentos, risas y tonterías. Los fines de semana con vosotros en Berlín no pudieron ser mejores.

Me gustaría también agradecer enormemente los consejos y ayuda brindados por los profesores y compañeros del Departamento de Microbiología, así como los buenos momentos (los Viernes de churros, comidas de Departamento, journal clubs...) vividos juntos durante estos cuatro años. Muchas gracias a las Viejas Glorias por la buena acogida en el Departamento. Con vosotros me inicié en las cenas de becarios y los Viernes de tapas, que continué con otros muchos compañeros y amigos hasta mi último día en Granada. A todos vosotros quiero agradecer enormemente el tiempo compartido en el Departamento (que claramente alegró las largas horas de trabajo) y también fuera de él. Gracias por los Miércoles de pizzas, los buenos ratos en la sala común, las risas en las clases de inglés, las Cruces, el Corpus, y festividades varias que hemos disfrutado juntos. Estoy muy agradecida de haber podido compartir con vosotros los altibajos de la realización de la Tesis Doctoral.

Asimismo, quisiera agradecer el tiempo invertido por todas las personas implicadas en la evaluación de esta Tesis Doctoral: a los dos evaluadores internacionales (Dr. Maxwell Hincke y Dr. Dennis Bazylnski), a los miembros del tribunal (Dra. Antonia Fernández Vivas, Dra. M<sup>a</sup> Paz Carrasco Jiménez, Dr. Pedro García González, Dra. Carmen Valverde Tercedor y Dr. Massimiliano Perduca), así como a los suplentes (Dr. Manuel Martínez Bueno y Dr. Rubén Cebrián).

Para terminar me gustaría dar las gracias a mis amigas de siempre que por más que pasan los años y por mucha distancia que haya de por medio siguen ahí. Gracias de corazón. Especialmente a López que ha sido, es y siempre será mi gran apoyo. A Ema, con el que termino una etapa y empiezo una nueva. Gracias por tu ayuda y comprensión, sobretodo en los últimos meses de escritura. Finalmente a mis padres y mi hermana, que siempre me han escuchado y apoyado en los momentos más difíciles. Sin vosotros nada habría sido posible, tengo mucha suerte de tenerlos. GRACIAS.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	6
INTRODUCCIÓN .....	11
I. Aspectos fundamentales de la magnetita .....	12
1. Propiedades .....	12
1.1. Composición química, estructura y morfología cristalina .....	12
1.2. Comportamiento magnético .....	13
2. Procesos de formación .....	16
2.1. Mineralización inorgánica .....	16
2.2. Biomineralización .....	17
2.2.1. Inducida biológicamente .....	17
2.2.2. Controlada biológicamente .....	18
2.2.2.1. Bacterias magnetotáticas .....	19
2.2.2.1.1. Formación del magnetosoma y proteínas implicadas...	20
2.2.2.1.2. Características del cristal del magnetosoma .....	25
2.2.3. Nanopartículas de magnetita biomiméticas .....	28
II. Interacciones biológicas de las nanopartículas magnéticas y su potencial en biomedicina .....	33
1. Interacción con biomoléculas y formación de proteínas corona .....	34
1.1. Parámetros fisicoquímicos que influyen en la adsorción de proteínas.....	35
2. Influencia en las respuestas fisiológicas .....	37
2.1. Adsorción e internalización celular .....	38
2.2. Citotoxicidad .....	40
2.3. Biodistribución, toxicidad y eliminación <i>in vivo</i> .....	41
3. Aplicaciones biomédicas antitumorales .....	45
3.1. Transporte activo: marcadores tumorales .....	47
3.1.1. Met/RHGF .....	48
3.2. Orientación magnética .....	51
3.3. Hipertermia mediada por campo magnético alterno .....	53
3.4. Liberación de fármacos mediante estímulos .....	55
3.5. Nanopartículas magnéticas en ensayos clínicos y comercializadas .....	57
III. Potencial de las nanopartículas magnéticas en nanorremediación de agua contaminada por metales pesados .....	59
1. Métodos para la eliminación de contaminantes del agua .....	60
1.1. Nanorremediación .....	61
1.1.1. Nanoadsorbentes .....	62

1.1.1.1. Nanoadsorbentes magnéticos .....	62
1.1.1.2. Nanoadsorbentes magnéticos híbridos .....	63
2. Nanoadsorbentes magnéticos en plantas piloto .....	64
OBJETIVOS .....	65
MATERIALES Y MÉTODOS .....	69
I. Análisis <i>in silico</i> .....	70
II. Crecimiento de <i>Magnetococcus marinus</i> MC-1 .....	70
III. Técnicas de manipulación de ADN .....	71
1. Aislamiento y purificación del ADN de <i>Magnetococcus marinus</i> MC-1 .....	71
2. Amplificación y clonación .....	71
IV. Técnicas para el estudio de proteínas .....	72
1. Sobreexpresión y purificación .....	72
1.1. MamC .....	72
1.2. Mms6 .....	73
1.3. Anticuerpo monoclonal (mAb) DO-24 .....	74
2. Identificación de proteínas .....	74
2.1. Mms6 .....	74
2.2. Proteínas corona .....	74
3. Análisis químico-físicos .....	75
3.1. Dicroísmo circular (CD) .....	75
3.2. Interacción de proteínas .....	76
V. Extracción de membranas de huevo (ESM) .....	76
VI. Biomineralización .....	77
1. Formación de magnetita biomimética en presencia de MamC y/o Mms6 .....	77
2. Formación de magnetita inorgánica sobre ESM (MESM) .....	78
VII. Adsorción de moléculas a nanopartículas de magnetita biomiméticas (BMNPs)... ..	79
1. Funcionalización con doxorubicina (DOXO) .....	79
1.1. Cinética e isoterma de adsorción .....	79
1.2. Liberación .....	81
2. Funcionalización con mAb DO-24 .....	81
2.1. Cinética de adsorción .....	81
2.2. Inmunocompetencia .....	82
2.3. Estabilidad .....	82
3. Adsorción de proteínas plasmáticas o proteínas corona (PC) .....	83
VIII. Adsorción de cationes por ESM y/o MESM .....	84



1. Hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) .....	84
2. Plomo ( $\text{Pb}^{2+}$ ) .....	84
IX. Análisis de las magnetitas precipitadas y funcionalizadas .....	84
1. Difracción de rayos X (XRD) .....	84
2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	85
3. Distribución de tamaños .....	85
3.1. TEM + ImageJ .....	85
3.2. Dispersión dinámica de luz (DLS) .....	85
3.3. Análisis de suimiento de nanopartículas (NTA) .....	86
3.4. Método de Brunauer–Emmett–Teller (BET) .....	86
4. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) + difracción de electrones del área seleccionada (SAED) .....	86
5. Análisis termogravimétrico (TGA) .....	87
6. Medida de las propiedades magnéticas .....	87
6.1. Ciclo de histéresis .....	87
6.2. Enfriamiento de campo cero (ZFC-W) y enfriamiento de campo (FC-C) .....	87
7. Hipertermia magnética .....	88
7.1. Hipertermia producida por aplicación de campos magnéticos alternos....	88
7.2. Liberación de DOXO causada por hipertermia magnética .....	88
8. Carga superficial de las nanopartículas (Potencial $\zeta$ ) .....	89
9. Determinación elemental de hierro y/o plomo unido a ESM y MESM .....	89
9.1. Determinación directa .....	89
9.1.1. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) .....	89
9.1.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de presión variable - Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (VP-FESEM–EDX) .....	90
9.1.3. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) .....	90
9.2. Determinación indirecta .....	90
9.2.1. Espectroscopía de absorción atómica (AAS) .....	90
9.2.2. Espectrometría de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) .....	91
X. Estudio <i>in vitro</i> .....	91
1. Preparación de cultivos celulares .....	91
<b>1.1.</b> GTL-16 y Huh7 .....	91
<b>1.2.</b> HUVEC, HeLa y KB-V1 multirresistentes .....	91
<b>1.3.</b> Macrófagos primaries .....	92
<b>1.4.</b> 4T1 .....	92

2. Interacciones celulares de las BMNPs .....	93
2.1. Microscopía óptica (azul de Prusia) .....	93
2.2. Cuantificación del hierro por tiocianuro de potasio .....	93
2.3. Microscopía de fluorescencia .....	94
2.4. TEM .....	94
2.5. Citofluorimetría .....	95
3. Citotoxicidad .....	95
3.1. Ensayo colorimétrico mediante bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) .....	95
3.2. Ensayo a tiempo real (ExCelligence) .....	96
3.3. Test de hemocompatibilidad .....	97
3.4. Detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ....	97
3.5. Test de Anexina-V y yoduro de propidio (PI) .....	98
XI. Estudio in vivo .....	99
1. Biocompatibilidad y biodistribución .....	99
2. Orientación magnética y actividad antitumoral .....	99
3. Hipertermia mediante campo magnético alterno y actividad antitumoral .....	100
XII. Análisis estadísticos .....	100
RESULTADOS .....	101
I. Tuning properties of biomimetic magnetic nanoparticles by combining magnetosome associated proteins .....	102
II. pH-dependent adsorption-release of doxorubicin on MamC-biomimetic magnetite nanoparticles .....	133
III. Functionalized biomimetic magnetic nanoparticles as effective nanocarriers for targeted chemotherapy .....	161
IV. Protein corona formation and its influence on biomimetic magnetite nanoparticles..	190
V. <i>In vivo</i> magnetic drug targeting and hyperthermia treatment by using biomimetic magnetite nanoparticles .....	219
VI. Green synthesis and use of magnetic eggshell membranes for removal of lead from contaminated waters .....	247
DISCUSIÓN .....	278
CONCLUSIONES .....	301
CONCLUSIONS .....	304
BIBLIOGRAFÍA .....	308



## **RESUMEN**

Las nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) han despertado un gran interés en el campo de la biotecnología debido a su alta relación superficie/volumen, que puede utilizarse para anclar cantidades relativamente altas de moléculas específicas, y porque pueden manipularse fácilmente utilizando un campo magnético externo, debido a su alto momento magnético en comparación con otros óxidos de hierro. Se pueden sintetizar de manera inorgánica utilizando diferentes procesos pero, generalmente, a altas temperaturas y presiones, lo que implica altos costes de producción. Además, estas magnetitas producidas químicamente no suelen presentar todas las características deseables (alta magnetización, tamaños y morfologías adecuadas, biocompatibilidad o alta estabilidad química) para ciertas aplicaciones biomédicas. Las bacterias magnetotácticas (MTB) sintetizan magnetosomas, compuestos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  monocristalino envuelto por una membrana, mediante un estricto control genético en el que intervienen proteínas únicas llamadas proteínas asociadas a magnetosomas (MAPs). Este proceso de biomineralización controlada (BCM) da como resultado nanopartículas de magnetita con estructuras cristalinas perfectas, alta pureza química, morfologías alargadas y una estrecha distribución de tamaños entre 30 y 120 nm, que hace que estos cristales sean de dominio magnético único y, en consecuencia, la nanopartícula magnética ideal. Sin embargo, no es posible escalar a nivel industrial el cultivo de MTB debido a sus exigentes condiciones nutricionales y su lento crecimiento, por lo que los magnetosomas no pueden obtenerse en grandes cantidades. De hecho, este es el cuello de botella para la aplicación de los magnetosomas en nanotecnología. En este contexto, una de las alternativas propuestas es la biomimética, es decir, la producción *in vitro* de nanopartículas magnéticas similares a los magnetosomas mediante la utilización de MAPs, dado que la interacción preferencial de MAPs con el cristal de magnetita se ha sugerido para explicar las propiedades únicas de las magnetitas producidas por las MTB. Sin embargo, todavía hay muchas incógnitas relacionadas con las estructuras y funciones de la mayoría de las MAPs. Por lo tanto, desde un punto de vista biológico, así como para la aplicación práctica de estas nanopartículas de magnetita biomiméticas (BMNPs), comprender este proceso de BCM, el único conocido hasta ahora en el dominio Bacteria, representa un desafío de extraordinaria importancia. En este sentido, en el **Capítulo I** de esta Tesis Doctoral, se estudian por primera vez las funciones combinadas de dos MAPs diferentes, MamC y Mms6 de *Magnetococcus marinus* MC-1, para sintetizar magnetitas biomiméticas. Nuestros resultados muestran que MamC y Mms6 tienen funciones diferentes, pero complementarias, en la nucleación y el

crecimiento de magnetita *in vitro*. MamC parece controlar la cinética de la nucleación de los cristales, combinando efectos ionotrópicos y molde, mientras que Mms6 parece controlar preferiblemente la cinética del crecimiento de los cristales al actuar como reservorio de Fe. El efecto combinado de estas MAPs produce cristales bien facetados, de gran tamaño ( $30 \pm 10$  nm) y con mejores propiedades magnéticas que las nanopartículas inorgánicas o producidas en presencia de sólo una de estas dos proteínas, indicado por una mayor temperatura de bloqueo y, por tanto, un mayor momento magnético por partícula. Por tanto, estas nuevas BMNPs con propiedades magnéticas mejoradas podrían ser potencialmente útiles en aplicaciones nanotecnológicas.

Los capítulos II a V se centran en la evaluación *in vitro* (II, III, IV) e *in vivo* (V) de las BMNPs, producidas en presencia de MamC, como potenciales nanotransportadores para terapias antitumorales, ya que esta MAP había sido previamente purificada y ampliamente estudiada por nuestro grupo. **El capítulo II** incluye la caracterización fisicoquímica de estas BMNPs y su funcionalización con el fármaco quimioterapéutico doxorubicina (DOXO). Estas BMNPs se caracterizaron como nanopartículas superparamagnéticas (a 300 K) de 30-40 nm, compuestas por ~95% en peso de magnetita y ~5% en peso de MamC, con un área superficial específica de 90 m<sup>2</sup>/g. Además, los grupos funcionales de MamC expuestos en la superficie de la partícula confieren a las partículas un punto isoeléctrico de 4.4 y, por tanto, una fuerte carga negativa a pH fisiológico (pH 7.4). Esto permite su unión estable a moléculas cargadas positivamente a pH 7.4, como DOXO (DOXO-BMNPs), en base a interacciones electrostáticas, siguiendo el modelo de Langmuir-Freundlich, que muestra que la superficie de la magnetita es energéticamente heterogénea y exhibe una cooperatividad positiva. Por el contrario, cuando el pH disminuye (pH 5), estas interacciones electrostáticas se debilitan y DOXO se libera hasta ~35% de la cantidad inicialmente adsorbida en solo 4 horas. Además, estas BMNPs son cito y hemocompatibles, mientras que DOXO-BMNPs muestran citotoxicidad en la línea celular de carcinoma gástrico humano GTL-16 de una manera dependiente de la dosis. En el **Capítulo III**, el estudio *in vitro* de DOXO-BMNPs, iniciado en el Capítulo II, se completó con la adsorción estable del anticuerpo monoclonal (mAb) DO-24 en estos nanoensamblajes (DOXO-mAb-BMNPs). Este mAb reconoce el receptor Met/HGF humano, sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, por lo que su unión a DOXO-BMNPs proporciona un sistema de quimioterapia dirigida. La adsorción de DOXO y/o el mAb no interfirió en las propiedades magnéticas de las partículas, ya que los

diferentes nanoensamblajes mostraron la misma temperatura de bloqueo que las BMNPs. Por otro lado, DOXO-mAb-BMNPs reconocen selectivamente el receptor Met, se unen eficientemente a las células tumorales Met<sup>+</sup> y descargan DOXO en sus núcleos de manera más eficiente que DOXO-BMNPs, ejerciendo citotoxicidad que, además, aumentó con la exposición celular a un gradiente de campo magnético (GMF). Además, la liberación de DOXO a pH 5 (microambiente tumoral), ya analizada en el Capítulo II, se combinó con un campo magnético alterno (AMF), lo cual produjo un aumento en la liberación de DOXO por la hipertermia generada. Por lo tanto, estos datos representan un enfoque potencial de doble transporte y liberación controlados (mediados por el mAb y magnético) y una terapia combinada (quimioterapia e hipertermia).

Sin embargo, la evaluación de las interacciones de estos nanotransportadores con entornos biológicos es imprescindible para su sura y eficiente aplicación *in vivo*. En este contexto, en el **Capítulo IV** se realizó una investigación fundamental sobre la formación de proteínas corona (PC) alrededor de estos nanotransportadores después de su incubación en plasma humano. Las BMNPs o DOXO-BMNPs se sumergieron en plasma humano y se observó una cubierta de PC unida de manera estable (PC-BMNPs y PC-DOXO-BMNPs). En particular, el fibrinógeno se detectó como la proteína plasmática más abundante en las PC de las DOXO-BMNPs. Esto representa potenciales ventajas, en primer lugar, eliminar el exceso de fibrinógeno plasmático que está involucrado en la resistencia a la quimioterapia y, en segundo lugar, proteger a las partículas de la fagocitosis, prolongando así su tiempo de circulación. Además, la adsorción de PC a las BMNPs no alteró las propiedades magnéticas de las partículas, redujo su polidispersidad y mejoró su estabilidad coloidal, lo que redujo la toxicidad de las BMNPs en macrófagos humanos y mejoró su internalización en diferentes líneas celulares. Estos datos representan un estudio preliminar sobre las interacciones suras y ventajosas que se producen entre las BMNPs/DOXO-BMNPs y el plasma humano, que permitieron el diseño de los experimentos *in vivo* realizados en el **Capítulo V**. En este Capítulo se evaluaron *in vivo* la orientación y concentración magnética de fármacos en sitios diana y la hipertermia magnética producidas por las BMNPs o DOXO-BMNPs. Las BMNPs mostraron una alta biocompatibilidad sin evidencia de alteraciones en los órganos. Bajo la influencia de un GMF, aumentó la internalización celular de las BMNPs en cortos períodos de tiempo, permitiendo una acumulación más rápida de DOXO en los núcleos de las células. Después de la inyección intravenosa de DOXO-

BMNPs en ratones BALB/c con carcinomas mamarios inducidos por células 4T1 y la aplicación de un GMF se acumuló una alta concentración de nanopartículas en el tumor y el crecimiento tumoral se inhibió significativamente. Por otro lado, la inyección de DOXO-BMNPs *in situ* en carcinomas mamarios 4T1 inducidos en ratones, junto con la aplicación de un AMF, también provocó una disminución significativa del volumen tumoral mediada por la hipertermia producida por las nanopartículas y el consecuente aumento de la liberación de DOXO, que fue más eficiente que en los ratones solo tratados con DOXO soluble o con el AMF. En consecuencia, estos nanotransportadores basados en BMNPs son potencialmente efectivos para el tratamiento local del cáncer, consistente en la orientación magnética de fármacos combinada con hipertermia magnética para aumentar su eficiencia.

Finalmente, en el **Capítulo VI**, se utilizaron nanopartículas magnéticas en el contexto de la nanorremediación de aguas, diseñando un nuevo nanosistema magnético que combinara las ventajas del material magnético y el utilizado como soporte. En particular, se produjo un nuevo material magnético híbrido compuesto por nanopartículas magnéticas inorgánicas (MNPs) precipitadas en membranas de cáscara de huevo (ESM), abundantes desechos biológicos de la industria de procesamiento de alimentos, como adsorbente verde para la preservación de los recursos naturales. Específicamente, se investigó la eliminación de metales pesados de ambientes acuosos utilizando estas ESM magnéticas (MESM). Las fibras de la ESM, que actuaron como una superficie activa para la nucleación de partículas, fueron decoradas con MNPs para facilitar su recolección utilizando un campo magnético externo sin la necesidad de un tratamiento adicional. En este contexto, se produjeron largas hebras de MNPs a lo largo de las fibras de la ESM en presencia de un campo magnético, mientras que en su ausencia se formaron aglomerados de partículas más pequeñas con una disposición aleatoria. Las MESMs presentaron gran capacidad para mejorar la eliminación de Pb de agua contaminada, mostrando un efecto sinérgico entre las MNPs y la ESM en la adsorción Pb. Sin embargo, la interacción con Pb fue mucho mayor para las MNPs de MESM, lo que aumentó la eficiencia de eliminación más de 10 veces en comparación con la del componente ESM solo. Estos resultados sugieren que las MESMs podrían utilizarse como agentes de nanorremediación eficientes en la separación/eliminación de iones de metales pesados u otros contaminantes en aguas contaminadas, siendo fácilmente recuperables magnéticamente y reutilizables.



## **SUMMARY**

Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles are of great interest in biotechnology field since they have a large area surface, which can be used for anchoring relatively large amounts of specific molecules, and can be easily manipulated by using an external magnetic field because of their high magnetic moment per particle compared to other iron oxides. They can be synthesized inorganically using different processes but, generally, performed at high temperatures and pressures, which involves high costs of production. Moreover, these chemically-produced magnetites usually do not have all desirable features (i.e. high magnetization, consistent sizes and morphologies, biocompatibility or high chemical stability) for certain biomedical applications. Magnetotactic bacteria (MTB) synthesize magnetosomes comprised of membrane-enveloped single crystalline  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  by a strict genetic control in which are involved unique proteins called magnetosome-associated proteins (MAPs). This controlled biomineralization process (BCM) results in nanomagnetites with perfect crystal structures, high chemical purity, elongated morphologies and narrow size distribution (between 30 and 120 nm), making these crystals a single magnetic domain and, in consequence, the ideal magnetic nanoparticles. However, the scale up of such a production is not possible at present because of the exigent nutrition conditions of MTB and their slow growth, so magnetosomes cannot be obtained in large quantities. In fact, this is the bottleneck for the application of magnetosomes in nanotechnology. In this context, one of the proposed alternatives is biomimetic, i.e the *in vitro* production of magnetosome-like magnetic nanoparticle mediated by MAPs, since preferential interaction of MAPs with magnetite crystal has been suggested to explain the unique properties of the magnetites produced by MTB. However, there are still many unknowns related to the structure and function of most of the MAPs. So from a biological standpoint, as well as for the potential application of this biomimetic magnetite nanoparticles (BMNPs), understanding this BCM, the only one known so far in the domain Bacteria, represents a challenge of extraordinary importance. In this regard, in **Chapter I** of this Doctoral Thesis, the combined functions of two different MAPs, MamC and Mms6 of *Magnetococcus marinus* MC-1, have been studied for the first time to synthesize biomimetic magnetites. Our results show that MamC and Mms6 have different, but complementary, functions on *in vitro* magnetite nucleation and growth. MamC seems to control the kinetics of crystal nucleation, combining both ionotropic and template effects, while Mms6 seems to preferably control the kinetics of crystal growth by acting as a Fe reservoir. The combined effect of these MAPs produces *in vitro* well faceted

crystals both large in size ( $30 \pm 10$  nm) and with higher blocking temperature, indicating larger magnetic moment per particle, compared to the particles synthesized in the absence of the MAPs or in the presence of only one of them. Therefore these new BMNPs with improved magnetic properties could be potentially useful in nanotechnological applications.

Chapters II to V focus on the *in vitro* (II, III, IV) and *in vivo* (V) evaluation of the MamC mediated BMNPs as potential nanocarriers for antitumor therapies, since this MAP had been previously purified and extensively studied by our group. **Chapter II** includes the physicochemical characterization of these BMNPs and their functionalization with the chemotherapeutic drug doxorubicin (DOXO). These BMNPs were characterized as superparamagnetic (at 300K) nanoparticles of 30-40 nm, composed of  $\square 95$  wt% of magnetite and  $\square 5$  wt% of MamC, with a specific surface area of  $90 \text{ m}^2/\text{g}$ . Moreover, the functional groups of MamC exposed in the particle surface confer to the particles an isoelectric point of 4.4 and, thus, a strongly negatively charged at physiological pH (7.4). This allows their stable complexation to positively charged molecules at pH 7.4, such as DOXO (DOXO-BMNPs), based on electrostatic interactions, following the Langmuir-Freundlich model, which shows that the surface of the magnetite is energetically heterogeneous and displays positive cooperativity. On the contrary, when pH decreases (pH 5), these electrostatic interactions weaken and DOXO is released up to  $\sim 35\%$  of the amount initially adsorbed in only 4 hours. Moreover, these BMNPs are cyto- and hemocompatible, while DOXO-BMNPs display cytotoxicity on the GTL-16 human gastric carcinoma cell line in a dose-dependent manner. In **Chapter III** the *in vitro* study of DOXO-BMNPs initiated in Chapter II was completed with the stable adsorption of the DO-24 monoclonal antibody (mAb) onto these nanoassemblies (DOXO-mAb-BMNPs). This mAb recognizes the human Met/HGF receptor, overexpressed in many types of cancer, so its complexation to DOXO-BMNPs provides a targeted chemotherapy system. The adsorption of DOXO and/or the mAb did not interfere in the magnetic properties of the particles, showing the different nanoassemblies the same blocking temperature as the BMNPs. The DOXO-mAb-BMNPs selectively recognize Met, bind efficiently to Met<sup>+</sup> tumor cells, and discharge DOXO within their nuclei more efficiently than DOXO-BMNPs, exerting cytotoxicity that, in addition, was enhanced upon cell exposure to a gradient magnetic field (GMF). In addition, DOXO release at pH 5 (tumor microenvironment), already analyzed on Chapter II, was combined with an alternating magnetic field (AMF), which

produce an increased in DOXO release by the hyperthermia generated. Therefore, these data represent a potential controlled dual targeting (mAb-mediated and magnetic) approach and combined (chemotherapy and hyperthermia) therapy.

However, the evaluation of the interactions of these nanocarriers with biological environments is mandatory for their safe and efficient *in vivo* application. In this context, a fundamental investigation regarding the protein corona (PC) formation around these nanocarriers after incubation with human plasma was performed in **Chapter IV**. BMNPs or DOXO-BMNPs were immersed in human plasma and PC cover was observed (PC-BMNPs and PC-DOXO-BMNPs). In particular, fibrinogen was detected as the most abundant plasma protein in PC of DOXO-BMNPs. This potentially provides advantages by on one hand removing the excess plasma fibrinogen that is involved in chemotherapy resistance, and secondly protecting the particles from phagocytosis, thus, prolonging circulation time. Moreover, the adsorption of PC to the BMNPs did not alter the magnetic properties of the particles, reduced their polydispersity, and improved their colloidal stability. This reduced BMNPs toxicity in human macrophages and enhanced their internalization in different cell lines. Therefore, these data represent a preliminary study of the safe and advantageous interactions that occur between BMNPs/DOXO-BMNPs and human plasma, which allowed the settings of the *in vivo* experiments performed in **Chapter V**. In this Chapter, the *in vivo* magnetic drug targeting and magnetic hyperthermia produced by BMNPs or DOXO-BMNPs were evaluated. The BMNPs showed high biocompatibility without evidence of organ alterations. Under the influence of the GMF, BMNPs increased their cellular uptake in short periods of time, which promotes a faster DOXO accumulation in cell nuclei. After intravenous injection of DOXO-BMNPs in BALB/c mice bearing 4T1 induced mammary carcinomas and the application of the GMF, a high concentration of BMNPs accumulated at the tumor site and tumor growth was significantly inhibited. On the other hand, the tumor *in situ* injection of DOXO-BMNPs in 4T1 tumor bearing mice together with the application of an AMF, also resulted in a significant tumor volume decrease mediated by the hyperthermia produced by the nanoparticles and the consequent increase in DOXO release, which was more efficient than in mice only treated with soluble DOXO or with the AMF. Therefore, these BMNPs nanocarriers are potentially effective for local cancer treatment consisting of magnetic drug targeting combined with magnetic hyperthermia to increase efficiency.

Finally, in **Chapter VI**, a new hybrid magnetic material composed of inorganic magnetic nanoparticles (MNPs) precipitated on eggshell membranes (ESM), an abundant biowaste from the food processing industry, was applied as green adsorbent for natural resources preservation. Specifically, heavy metal removal from aqueous environments was investigated by using these magnetic ESM (MESM). The ESM fibers, which acted as an active surface for particle nucleation, were decorated with the MNPs in order to facilitate their collection using an external magnetic field without the need for further treatment. In this context, long strands of MNPs along the fibers of the ESM were produced in the presence of the magnetic field, while agglomerates of smaller particles with a random disposition were formed in its absence. The MESMs present high capacity to improve the removal of  $Pb^{2+}$  from contaminated water, showing a synergistic effect between the MNPs and the ESM adsorbing  $Pb^{2+}$ . However, the interaction with  $Pb^{2+}$  was much greater for the MNPs of MESM, which increased the efficiency of the removal more than 10 times compared to that of the ESM component alone. These results suggest the MESMs could be utilized as an efficient nanoremediation agent for separation/removal of heavy metal ions or other charged pollutants from contaminated waters, being easily magnetically recoverable and recyclable.

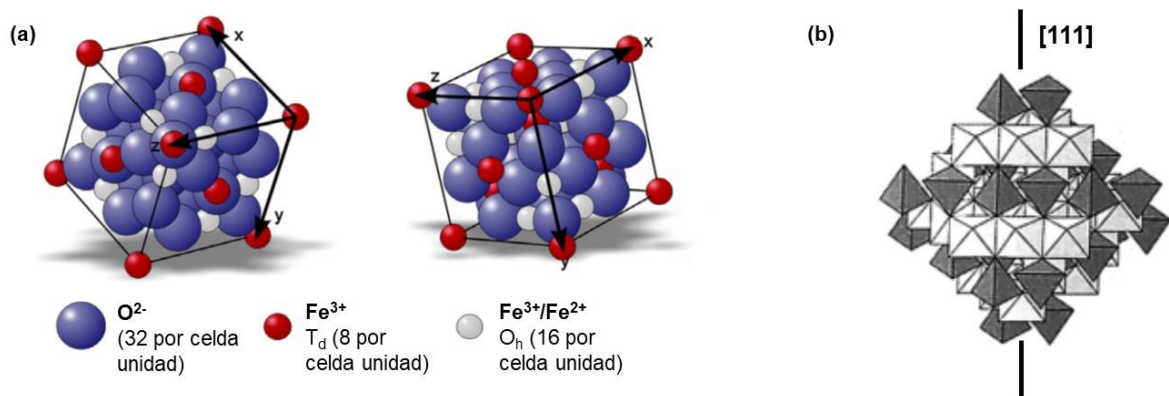
## **INTRODUCCIÓN**

## I. Aspectos fundamentales de la magnetita

### 3. Propiedades

#### 3.1. Composición química, estructura y morfología cristalina

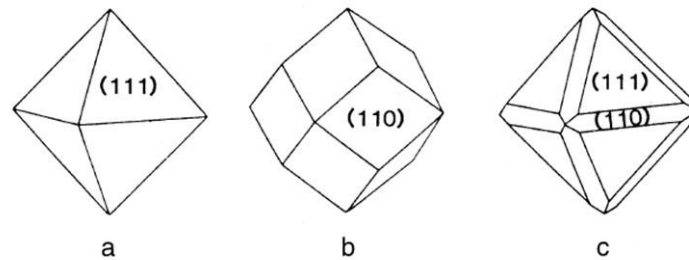
La magnetita es un óxido ferroso-diférrico, referido generalmente como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , pero expresado de forma más apropiada por su fórmula estructural  $\text{Fe}^{3+}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})\text{O}_4$ . La estructura detallada de la magnetita se estableció en 1915 mediante difracción de rayos X (Bragg, 1915). Su estructura de espinela inversa (Figura 1a) tiene una celda unidad compuesta por 32 iones de oxígeno, que forman una red cúbica muy compacta con iones de hierro ubicados en los intersticios entre los iones de oxígeno (Schmitz-Antoniak, 2015). Los iones de hierro pueden ocupar dos posiciones distintas en esta estructura: octaédrica ( $\text{O}_h$ ) y/o tetraédrica ( $\text{T}_d$ ). Cada celda unidad contiene 8 sitios  $\text{T}_d$  y 16 sitios  $\text{O}_h$ . 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  $\text{Fe}^{2+}$ . La estructura completa de la magnetita está formada por capas octaédricas y mezcla de octaédricas/tetraédricas apiladas a lo largo de la dirección  $[111]$  (Figura 1b). El  $\text{Fe}^{2+}$  puede ser parcial o totalmente reemplazado por otros cationes divalentes, por ejemplo  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , gracias a la flexibilidad en la red formada por los iones de oxígeno, que puede expandirse y contraerse para acomodar a cationes con tamaños diferentes al  $\text{Fe}^{2+}$  (Cornell y Schwertmann, 2003).



**Figura 1.** (a) Celda unidad de la magnetita (modificada de Schmitz-Antoniak, 2015) y (b) Modelo poliédrico que alterna capas octaédricas con capas octaédricas/tetraédricas. Los octaedros están representados en blanco y los tetraedros en gris (modificada de Cornell y Schwertmann, 2003).

La magnetita se presenta más comúnmente como cristales octaédricos limitados por los planos  $[111]$  y como rombo-dodecaedros (Figura 2), en los que se producen

terrazas cúbicas en la cara [100]. No obstante, se pueden obtener otras morfologías (esferas, pseudocubos, platos, husos o formas de bala) variando las condiciones de síntesis (Cornell y Schwertmann, 2003).



**Figura 2.** Formas del cristal de magnetita. (a, c) octahédrica y (b) rombo-dodecahédrica (modificada de Kostov, 1968).

### 3.2. Comportamiento magnético

La magnetita es el mineral más magnético presente en la naturaleza. En base a su respuesta a un campo magnético, se incluye dentro de los materiales ferrimagnéticos. Sus propiedades magnéticas persisten incluso después de la eliminación del campo magnético. Esto es debido a que los momentos magnéticos en los sitios tetraédricos (ocupados por especies férricas) se alinean ferromagnéticamente, mientras que los de los sitios octaédricos (ocupados por especies ferrosas y férricas) son antiferromagnéticos y se anulan entre sí, de forma que en cada celda unidad resulta un momento magnético no compensado, ya que la magnetita puede presentar varios dominios (multidominos) magnéticos (Figura 3a). La suma de estos momentos magnéticos no compensados, fuertemente acoplados entre sí, es responsable de este comportamiento ferrimagnético (Cornell y Schwertmann, 2003).

Sin embargo, las propiedades magnéticas dependen del tamaño, de manera que a medida que disminuye el tamaño de la partícula de magnetita hasta llegar a escala nanométrica, el número de dominios magnéticos se reduce hasta obtener un único dominio magnético en el que la cantidad de espines acoplados que resisten la reorientación magnética espontánea disminuye. De esa manera, el cristal puede pasar de ser ferrimagnético a superparamagnético (Blaney, 2007; Mehrmohammadi *et al.*, 2011) (Figura 3a). Los materiales paramagnéticos o superparamagnéticos sufren el mismo tipo de atracción y repulsión que los ferrimagnéticos pero sólo cuando están expuestos a un campo magnético, es decir, no son materiales permanentemente magnetizados como los ferrimagnéticos. Esto es debido a que, como presentan un único domino magnético, al

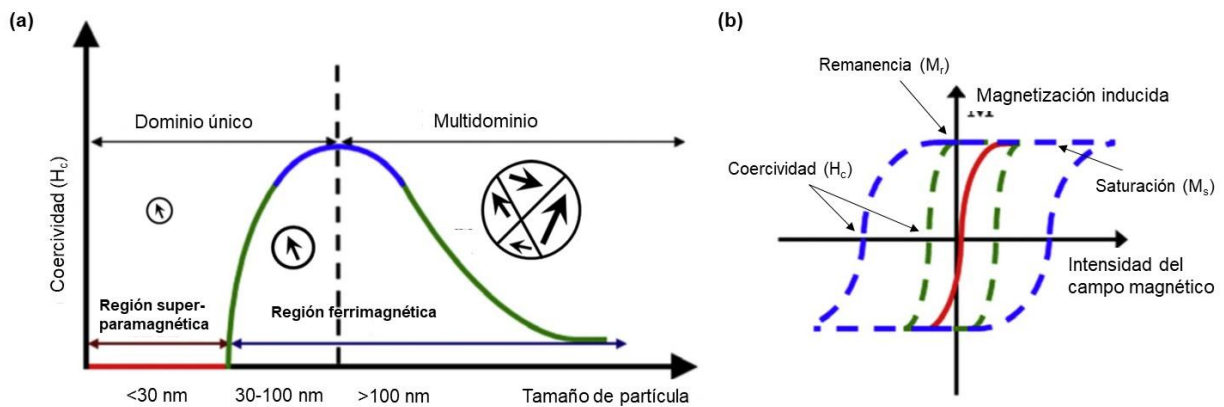


retirar el campo magnético, la entropía destruye el alineamiento magnético que ya no está favorecido energéticamente (Cornell y Schwertmann, 2003).

Las propiedades magnéticas también dependen de la temperatura. Así, la magnetita ferrimagnética permanece magnética cuando la temperatura es menor a una cierta temperatura denominada temperatura de Curie (850 K), resultado de la alineación de sus momentos magnéticos, es decir, de un momento magnético no compensado (Cornell y Schwertmann, 2003). Por tanto, a temperatura ambiente, la magnetita es ferrimagnética. Por el contrario, cuando la temperatura es mayor que la de Curie, las fluctuaciones térmicas destruyen la alineación ferromagnética de los momentos magnéticos en los sitios tetraédricos y la fuerza ferrimagnética disminuye. Cuando se alcanza la temperatura de Curie, la magnetización neta se vuelve cero y se observa un comportamiento paramagnético. Para los materiales superparamagnéticos, existe una temperatura crítica similar denominada temperatura de bloqueo, en la que el sistema comienza a responder a un campo magnético aplicado al calentar la muestra desde la temperatura más baja alcanzable. Como resultado, la magnetización de las partículas superparamagnéticas se maximiza a la temperatura de bloqueo (Bruvera *et al.*, 2015).

Las partículas/materiales magnéticos también responden de manera diferente a los campos magnéticos externos. En la Figura 3b se ilustra una comparación de la magnetización inducida con respecto a la intensidad del campo magnético externo, así como los efectos del tamaño/dominio para materiales superparamagnéticos frente a materiales ferrimagnéticos. El comportamiento ferrimagnético típico ejerce coercitividad (medida del campo inverso necesario para llevar la magnetización a cero después de estar saturada) y remanencia (medida de la magnetización restante cuando el campo se pone a cero) como muestran las curvas de línea discontinua de la Figura 3b. De manera similar, las temperaturas crecientes aumentan la energía térmica de las partículas y, por tanto, facilitan la reorientación magnética, o magnetización superparamagnética (Blaney, 2007). De acuerdo con un comportamiento superparamagnético, las nanopartículas de magnetita exhiben cero coercitividad y remanencia en los bucles de histéresis como ilustra la curva de línea continua de la Figura 3b. La coercitividad se acumula lentamente según la magnetita aumenta el diámetro de partícula, hasta cierto tamaño (Figura 3b). De esta manera, las partículas <30 nm son superparamagnéticas, es decir, no presentan magnetismo permanente a temperatura ambiente en ausencia de campo magnético. Las partículas >30 nm pero <100 nm son de dominio único estable, es decir, presentan un único dominio magnético

y la mayor coercitividad, que se mantiene estable, debido a una mayor barrera energética, donde la partícula se magnetiza uniformemente. Y, por último, las partículas >100 nm son multidominio, es decir, presentan más de un dominio magnético y coercitividad reducida en comparación con las de dominio único estable porque, al dividirse en varios dominios magnéticos no orientados en una misma partícula, los campos magnéticos de unos y otros se superponen disminuyendo la coercitividad (Thomas-Keprta *et al.*, 2000; Bennet *et al.*, 2015).



**Figura 3.** (a) Esquema de las propiedades magnéticas de nanopartículas de magnetita individuales. (b) Ciclo de histéresis ferrimagnético (líneas discontinuas) y superparamagnético (línea continua) genéricos (modificada de Mehrmohammadi *et al.*, 2011).

Cuando el tamaño de las partículas y la distribución de tamaños de los cristales de magnetita son similares, la morfología también afecta a la coercitividad de esta manera: esferas < cubos < octahédros, en línea con el aumento en el número de ejes magnéticos a lo largo de esta serie de formas. Controlando las condiciones de precipitación y, por tanto, el tamaño y morfología de las partículas, se pueden producir magnetitas con coercitividades que van de los 2,4 a los 20  $\text{kAm}^{-1}$  (Meisen y Kathrein, 2000).

#### **4. Procesos de formación**

La magnetita se forma típicamente en ambientes terrestres naturales, que van desde rocas ígneas y metamórficas a todas las variedades de ambientes sedimentarios (Grant, 1985). También está presente intracelularmente en múltiples linajes de la vida: Bacterias (Frankel *et al.*, 1979), Protozoos (Montei *et al.*, 2018) y Animales (Kirschvink, 1989). Además, se ha encontrado magnetita en materiales que se cree que son de origen extraterrestre, por ejemplo, el meteorito marciano ALH84001 (Thomas-Keprta *et al.*, 2000). Por tanto, la magnetita puede tener origen abiótico, a través de su síntesis o mineralización inorgánica, o biótico, si se forma por microorganismos, es decir, mediante su biomineralización.

##### **4.1. Mineralización inorgánica**

Existen numerosos métodos químicos (Laurent *et al.*, 2008) para producir nanopartículas de magnetita, ya sea como fase primaria o secundaria. La fase primaria se produce por precipitación de magnetita a partir de una solución y, en general, es altamente efectiva ya que produce grandes cantidades del mineral. Los diferentes métodos tienen en común que utilizan condiciones reductoras, valores altos de pH, baja presión parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>), y una cierta ratio de Fe<sup>3+</sup> y Fe<sup>2+</sup>, para así alcanzar el campo de estabilidad termodinámica de la magnetita (Garrels y Christ, 1990). El método más utilizado es la co-precipitación, homogénea o heterogénea, de sales de Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> en solución, microemulsión, vesículas o geles (Vayssières *et al.*, 1998; Prozorov *et al.*, 2007a, b; Perez-Gonzalez *et al.*, 2010). Alternativamente, solo uno de esos cationes puede añadirse y luego transformarse en el otro para sobresaturar el sistema con respecto a la magnetita, es decir, métodos de oxidación o reducción parcial (Schwertmann y Cornell, 2000). Entre ellos, uno de los métodos más comunes es el electroquímico, en el que se establece un cierto valor de potencial de óxido-reducción gracias a la aplicación de un campo eléctrico (Franger *et al.*, 2004). La producción de magnetita como fase secundaria se obtiene mediante la transformación de fases minerales primarias, que contengan hierro, a altas o bajas temperaturas. A bajas temperaturas (20-30 °C) la magnetita se forma por transformación de ferrihidrita y/o “green rust” (herrumbre verde), ya que estas fases son inestables respecto a la magnetita en condiciones anóxicas y a determinados valores de pH, Eh, pCO<sub>2</sub>, y Fe<sup>2+</sup> (Zachara *et al.*, 2002). A altas temperaturas (~200 –360°C), la magnetita se puede producir por descomposición térmica de siderita u otras fases de carbonato rico en hierro (Jimenez-

Lopez *et al.*, 2010). Las magnetitas sintetizadas inorgánicamente suelen ser de tamaño no homogéneo y muy pequeñas (<30 nm) o demasiado grandes (>120 nm), lo que las hace ser superparamagnéticas o de múltiple dominio, respectivamente.

## **4.2. Biomineralización**

La magnetita también puede formarse como resultado de procesos de biomineralización, que es el proceso por el que los seres vivos, tanto procariotas como eucariotas, producen minerales. Existen dos tipos de biomineralización, diferenciadas por el grado de control que el (micro)organismo ejerce sobre el proceso: mineralización inducida biológicamente (MIB) (Lowenstam, 1981) y mineralización controlada biológicamente (MCB) (Frankel y Bazylinski, 2003).

### **4.2.1. Inducida biológicamente**

En la biomineralización inducida no existe una maquinaria celular especializada ni un espacio delimitado para la mineralización, sino que los minerales se van formando extracelularmente. Se produce debido a cambios en la sobresaturación del sistema ocasionados por (1) mecanismos activos, consecuencia de la actividad metabólica, que producen la excrección de diferentes metabolitos al ambiente, o mediante (2) mecanismos pasivos, gracias al aporte de núcleos de cristalización tales como superficies celulares (pared celular, membrana, o restos celulares) que favorecen la precipitación del mineral porque disminuyen la barrera de energía potencial necesaria para el proceso (Lowenstam, 1981). Este tipo de biomineralización es dominante entre los procariotas (tanto bacterias como arqueas) y en algunos eucariotas unicelulares (Lowenstam y Weiner, 1989).

Los nanocristales de magnetita producidos por MIB son sintetizados principalmente por microorganismos desasimiladores reductores de hierro. En condiciones anaerobias, estos microorganismos utilizan  $\text{Fe}^{3+}$  (previa disolución de minerales, suelos o sedimentos que contienen  $\text{Fe}^{3+}$ ) como aceptor final en el transporte de electrones, reduciéndolo a  $\text{Fe}^{2+}$  y excretándolo al medio, ya que no lo pueden utilizar para la obtención de energía (Lovley, 1991; Slobodkin y Wiegel, 1997). Este  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Fe}^{3+}$  se concentran en las superficies celulares mediante interacciones electrostáticas inespecíficas, ya que la mayoría de superficies celulares están cargadas negativamente. Esto incrementa localmente la sobresaturación del sistema con respecto a la magnetita, provocando así la precipitación extracelular de esta fase mineral. Por tanto, las características mineralógicas de los cristales resultantes dependen en gran medida de las

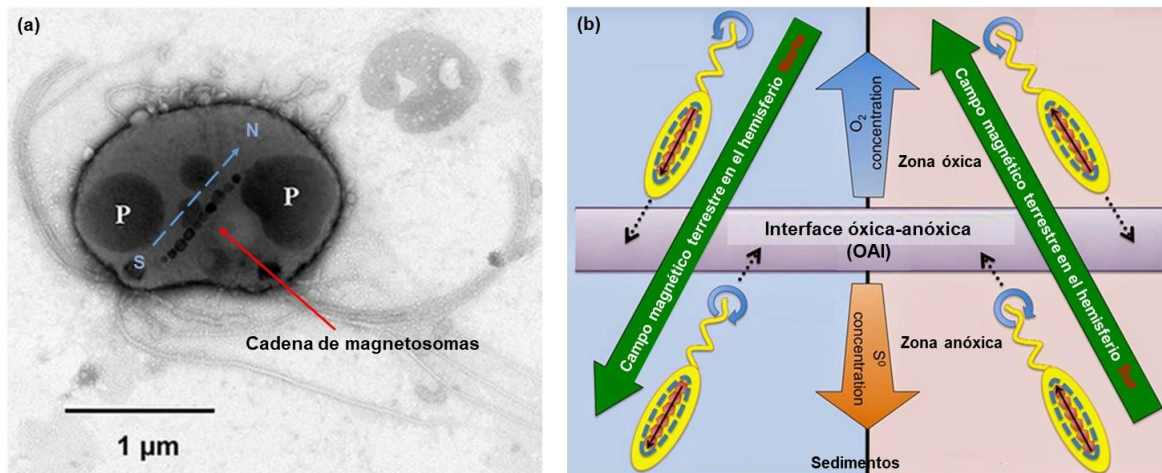
condiciones ambientales (Ph, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, Eh, y temperatura) en las que se produce la precipitación (Kukkadapu *et al.*, 2006; Roh *et al.*, 2006). De manera que un mismo microorganismo bajo diferentes factores ambientales puede dar lugar a distintas fases minerales (Lowenstam y Weiner, 1989). Por todo ello, mediante MIB se producen cristales físicoquímicamente indistinguibles de las partículas de magnetita formadas inorgánicamente en idénticas condiciones y, en general, se caracterizan por una baja cristalinidad, amplia distribución de tamaños, ausencia de morfologías cristalinas específicas, poca especificidad mineral (minerales mezclados) y/o presencia de impurezas en la red mineral (Frankel y Bazylinski, 2003; Bazylinski *et al.*, 2007).

### 4.2.2. Controlada biológicamente

En la biomineralización controlada los minerales se forman en matrices o vesículas orgánicas intracelulares, por lo que también se le ha denominado "mineralización mediada por matriz orgánica" (Lowenstam, 1981) y "biomineralización organizada por límites" (Mann, 1986). Este tipo de biomineralización, a diferencia de lo que sucede en la MIB, está controlada genéticamente y el (micro)organismo ejerce un grado de control significativo sobre el proceso de nucleación y crecimiento del mineral y, por tanto, sobre la composición, tamaño, morfología, y localización intracelular de las partículas (Bazylinski y Frankel, 2003). El mineral que se forma se aísla primero del ambiente exterior por una barrera a través de la cual los iones no pueden difundir libremente (Wilbur y Bernhardt, 1984). Estas barreras suelen consistir en bicapas lipídicas (membranas celulares o vesículas intracelulares), aunque también pueden estar formadas por macromoléculas insolubles, como proteínas y/o polisacáridos, que forman láminas semipermeables. Los minerales producidos por MCB suelen desempeñar funciones importantes para el (micro) organismo, como protección, equilibrio u orientación. Este tipo de biomineralización es más común en organismos superiores, por ejemplo, las conchas de los moluscos, los esqueletos, las cáscaras de huevo o los otolitos. En los microorganismos, el grupo más estudiado es el de las bacterias magnetotácticas, que forman magnetosomas (Frankel *et al.*, 1979).

#### 4.2.2.1. Bacterias magnetotácticas

Las bacterias magnetotácticas son un grupo heterogéneo de procariotas, sin significado taxonómico, con diversas características morfológicas (cocos, bacilos, vibrios, espirilos e, incluso, formas multicelulares), metabólicas (quimiolitoautotrofos, quimiorganotrofos y mixotrofos), y filogenéticas (clases  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -Proteobacteria del phylum Proteobacteria, y del phylum Nitrospira) (Bazylinski y Frankel, 2004; Lefèvre y Bazylinski, 2013), pero que tiene en común la capacidad de aeromagnetotaxis, es decir, alinearse de forma pasiva y nadar activamente, utilizando sus flagelos, a lo largo de las líneas del campo geomagnético, para situarse en la zona de la columna de agua con la concentración de oxígeno óptima para su crecimiento (Blakemore *et al.*, 1982; Bazylinski, 1995). Esta capacidad se consigue gracias a la presencia de magnetosomas, vesículas con bicapas fosfolipídicas, producidas por MCB a partir de la invaginación de la membrana celular, que envuelven un cristal magnético intracelular de dominio único, compuesto por magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y/o greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (Gorby *et al.*, 1988; Bazylinski, 1995; Komeili *et al.*, 2006). Estos orgánulos magnéticos están alineados en cadenas dentro de la bacteria maximizando de esta manera el dipolo magnético de cada célula (Figura 4a) que, en consecuencia, es la suma de los momentos magnéticos individuales de los magnetosomas (Bazylinski y Frankel, 2004). Por tanto, funcionan como brújulas biológicas que permiten a la bacteria migrar a lo largo de gradientes de oxígeno en ambientes acuáticos bajo la influencia del campo magnético de la Tierra (Frankel y Blakemore, 1984) hasta la zona microaeróbica denominada “interfase óxica-anóxica” (OAI) (Figura 4b), que es la óptima para su crecimiento. Esta zona se encuentra en la columna de agua o en sedimentos que tengan un gradiente vertical de estratificación química, y se sitúa en la confluencia de los gradientes que delimitan concentraciones óptimas de  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$ , que difunde desde el sedimento (donde es producido por las bacterias sulfato reductoras) y las bacterias magnetotácticas lo reducen para la obtención de energía (Bazylinski, 1995; Bazylinski y Schübbe, 2007) (Figura 4b). Por tanto, el alineamiento de las bacterias magnetotácticas con el campo geomagnético, gracias al fenómeno de la aeromagnetotaxis, reduce la búsqueda de la zona OAI en una columna de agua a una sola dimensión espacial, mientras que las bacterias no magnetotácticas tienen que buscar en las tres direcciones del espacio (Bazylinski y Schübbe, 2007) (Figura 4b).



**Figura 4.** (a) Microscopía electronia de transmission de *Magnetococcus marinus* MC-1 (P, cuerpos intracelulares ricos en fosfato) (modificada de Bazylinski *et al.*, 2013). (b) Esquema de la interfase óxica- anóxica en la columna de agua. Las flechas verdes indican las líneas del campo magnético de la Tierra en hemisferio Norte (izquierda) y Sur (derecha) (modificada de Chen *et al.*, 2010).

#### 4.2.2.1.1. Formación del magnetosoma y proteínas implicadas

La biomineralización del magnetosoma es un proceso complejo que implica entre 20-40 proteínas distintas y únicas (Nudelman y Zarivach, 2014; Barber-Zucker *et al.*, 2015), denominadas proteínas asociadas al magnetosoma (MAPs) (no presentes en bacterias no magnetotácticas, Schüler, 2004), localizadas en la membrana del magnetosoma y en el citoplasma (Grünberg *et al.*, 2001, 2004). Este proceso se desarrolla en una serie de etapas (Figura 5a) reguladas bajo un estricto control genético, y los genes implicados se encuentran en una region genómica denominada isla genómica del magnetosoma (MAI) (Ullrich *et al.*, 2005) agrupados en varios operones que se encuentran bastante conservados en las diferentes especies de bacterias magnetotácticas (Grünberg *et al.*, 2001). A continuación se explican cada una de estas etapas, y las MAPs implicadas, en la biomineralización de los magnetosomas (Figura 5a):

I. Biogénesis de la vesícula: la invaginación de la membrana plasmática es el primer paso en la formación de magnetosomas. En base a estudios genéticos, se ha visto que las proteínas MamQ, MamB, y MamL (Murat *et al.*, 2010; Uebe *et al.*, 2011) están implicadas en la invaginación mientras que MamY regula la forma de la vesícula (Tanaka *et al.*, 2010). MamB, además, interactúa con proteínas de la membrana del magnetosoma (MMPs) que participan en etapas posteriores, lo que sugiere que MamB

podría reclutar otras MAPs para inducir la invaginación (Murat *et al.*, 2010; Uebe *et al.*, 2011).

II. Localización de proteínas en la membrana del magnetosoma (MM): gran parte de las MAPs se encuentran únicamente o están enriquecidas en la MM (Gorby *et al.*, 1988; Grünberg *et al.*, 2001, 2004). Sin embargo, la abundancia de algunas proteínas, como MamA, MamP o MamY, parece fluctuar, mostrando una localización dinámica, incluso entre magnetosomas, localizados en una misma cadena, que están en diferentes etapas de maduración (Uebe y Schüler, 2016). Por tanto, es necesario un mecanismo que garantice que estas proteínas se encuentren en la MM en la etapa adecuada. Este mecanismo aún no está determinado, pero parece que hay pocas proteínas involucradas. MamA forma un complejo multiproteico, con varios sitios de unión, que rodea la membrana del magnetosoma, facilitando de esta manera las interacciones proteína-proteína, ya demostradas con Mms6 (Nguyen *et al.*, 2016), y “activando” los magnetosomas para la biomineralización (Komeili *et al.*, 2004; Zeytuni *et al.*, 2011). MamE es una proteína bifuncional con un papel proteasa-independiente en la localización de proteínas del magnetosoma y una función proteasa-dependiente primordial en la maduración de pequeños cristales de magnetita (Quinlan *et al.*, 2011), como se explica en la etapa IV.

III. Internalización de hierro y nucleación del cristal: la bacteria toma del ambiente tanto  $\text{Fe}^{2+}$  como  $\text{Fe}^{3+}$  (solubilizado mediante sideróforos, Calugay *et al.*, 2003). El transporte de hierro al magnetosoma es un mecanismo poco conocido y sobre el que aún quedan algunos interrogantes. No se conoce qué forma de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  ó  $\text{Fe}^{3+}$ ) se transporta al interior del magnetosoma. MamM y MamB actúan como transportadores de hierro a las vesículas, ya que son homólogas a la familia de proteínas facilitadoras de la difusión de cationes (CDF) (Uebe *et al.*, 2011) que explotan la fuerza motriz protónica. Este transporte es esencial no solo para la acumulación de hierro en el lumen del magnetosoma, sino también para mantener el pH necesario para la biomineralización de magnetita. En MSR-1, se ha demostrado que MamM y MamB interactúan entre sí formando heterodímeros, pero no pueden compensarse funcionalmente entre sí, apoyando la hipótesis de que estas dos proteínas juegan diferentes papeles en el proceso de biomineralización (Uebe *et al.*, 2011). MamH y MamZ comparten una alta homología con el dominio de la superfamilia de facilitadores principales (MFS) (Lohße *et al.*, 2011; Raschdorf *et al.*, 2013), lo que sugiere que estas dos proteínas también están involucradas en el transporte de hierro al magnetosoma.



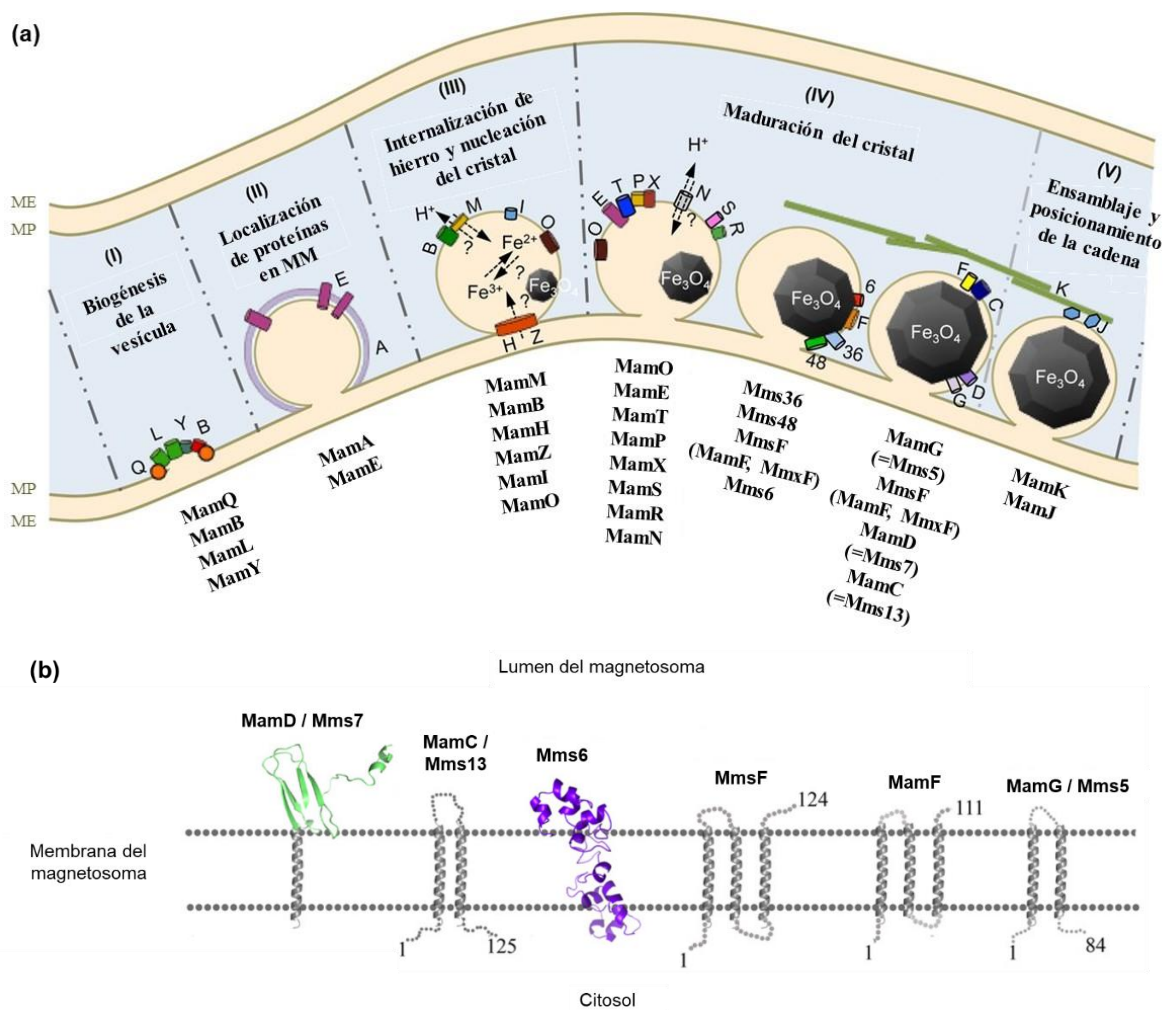
Además, el modelo estructural de MamH, consistente en una cavidad negativa que puede unir iones positivos y transferirlos a través de la membrana del magnetosoma (Raschdorf *et al.*, 2013; Nudelman y Zarivach, 2014) apoya esta hipótesis. La precipitación del hierro incorporado a la vesícula probablemente esté mediada por MamO, ya que expone un motivo de di-histidina que contribuye a la unión y precipitación del metal necesaria para iniciar la biomineralización (Hershey *et al.*, 2016). Finalmente, MamI podría estar involucrada en una etapa temprana de la nucleación de magnetita mediante la regulación de las condiciones adecuadas dentro de las vesículas (Bell *et al.*, 1987; Murat *et al.*, 2010), ya que mutantes knock-out deficientes en MamI producen partículas de óxido de hierro, no magnéticas, pequeñas, irregulares y poco cristalinas (Uebe y Schüler, 2016).

IV. Maduración del cristal: el crecimiento del cristal se ve afectado por varias proteínas. Entre ellas se incluye MamE, una proteína bifuncional, importante en la localización de proteínas en la MM, que además presenta una función proteasa-dependiente primordial en la maduración de pequeños cristales. Una vez que el cristal de magnetita alcanza el punto de transición de 20 nm, se produce la activación proteolítica de MamE que degrada inhibidores de la biomineralización, y por tanto es esencial para un mayor crecimiento de los cristales (Quinlan *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha especulado que las MAPs MamE, MamT, MamP y MamX, al tener en común la presencia de un dominio tipo citocromo C con un motivo CXXCH de unión a hemo (denominado magnetocromo) (Yang *et al.*, 2010; Quinlan *et al.*, 2011; Siponen *et al.*, 2012, 2013; Barber-Zucker *et al.*, 2015) forman un complejo para regular el flujo/transporte de electrones y así conservar el estado redox del magnetosoma (Siponen *et al.*, 2012). Se cree que MamS y MamR controlan el número y tamaño/morfología de los magnetosomas, ya que en mutantes knock-out deficientes en estas proteínas se producen cristales más pequeños, principalmente amorfos, y con respuesta magnética débil, creando pequeños grupos dentro de la cadena (que además es más corta) con espaciado irregular (Murat *et al.*, 2010; Komeili, 2012), pero el mecanismo no se conoce. MamN exhibe similitud con proteínas de translocación de H<sup>+</sup> y podría estar involucrada en la regulación del pH intramagnetosomal, exportando protones liberados por la precipitación de magnetita ( $2\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4 + 8\text{H}^+$ ) (Faivre *et al.*, 2007; Schüler, 2008), y creando así el ambiente óptimo para la precipitación de ésta (Bell *et al.*, 1987; Komeili, 2012; Nudelman y Zarivach, 2014). Se ha especulado que Mms48 y Mms36 podrían actuar como inhibidores del crecimiento de los cristales o

reclutando proteínas inhibidoras del crecimiento, dado que presentan dominios que median las interacciones proteína-proteína mediante un mecanismo desconocido (Uebe y Schüler, 2016), para controlar que el tamaño se encuentre en el rango de dominio magnético único.

Por último, hay otro conjunto de proteínas, localizadas en la membrana del magnetosoma, que controlan de forma acumulativa el tamaño y la morfología de los cristales de magnetita: Mms6, MamD (=Mms7), MamC (=Mms13), MamG (=Mms5), MmsF (y su homóloga MamF) (Scheffel *et al.*, 2008; Lohße *et al.*, 2014) (Figura 5b). La predicción de la estructura secundaria de Mms6 y MamD (=Mms7) mostró que ambas proteínas contienen una región C-terminal hidrófila, rica en aminoácidos ácidos y con grupos hidroxilo ubicada en el lumen del magnetosoma (Nudelman y Zarivach, 2014; Barber-Zucker *et al.*, 2015). Esta región podría interactuar con la superficie de la magnetita, promoviendo así la nucleación de los cristales y controlando su tamaño y morfología, como han determinado diversos estudios *in vitro* o mediante la producción de mutantes knock-out deficientes en el gen que codifica alguna de estas proteínas (Arakaki *et al.*, 2003, 2010, 2014; Prozorov *et al.*, 2007a; Tanaka *et al.*, 2011; Murat *et al.*, 2012; Kashyap *et al.*, 2014a; Rawlings *et al.*, 2016; Yamagishi *et al.*, 2016). Por otra parte, MmsF (y su homóloga MamF), MamG (=Mms5) y MamC (=Mms13) tienen dos regiones transmembrana hidrofóbicas que forman un bucle, también situado en el lumen del magnetosoma, que contiene residuos cargados que igualmente podrían interactuar con el cristal de magnetita determinando la morfología y tamaño de los cristales resultantes (Rawlings *et al.*, 2014; Arakaki *et al.*, 2014; Kashyap *et al.*, 2014b; Valverde-Tercedor *et al.*, 2015; Nudelman *et al.*, 2016, 2018a). Entre todas estas proteínas, solamente se ha resuelto la estructura de péptidos sintéticos del bucle de MamC, y el C-terminal de Mms6 y Mms7, demostrando su capacidad para unir Fe e intervenir en los procesos de nucleación y crecimiento de los cristales *in vitro* (Nudelman *et al.*, 2018b). Pero se desconoce si estos aminoácidos están realmente expuestos/accesibles en el magnetosoma permitiendo la interacción de las proteínas con el cristal en crecimiento, ya que la estructura completa de éstas y de las demás proteínas del magnetosoma sólo se ha predicho mediante herramientas bioinformáticas (Nudelman y Zarivach, 2014).

V. Ensamblaje y posicionamiento de la cadena: los magnetosomas se ensamblan en cadenas mediante la interacción de MamJ y MamK que, a su vez, participan en el posicionamiento de la cadena. MamK es una proteína similar a la actina, que forma una estructura filamentosa para el ensamblaje de los magnetosomas e interactúa con la proteína MamJ, que participa en la unión de los magnetosomas al filamento (Scheffel *et al.*, 2006; Katzmann *et al.*, 2010, 2011). En mutantes deficientes en MamJ o MamK, los cristales de los magnetosomas maduros tienden a aglomerarse, pero no tienen efecto en la biomineralización (Scheffel *et al.*, 2006; Katzmann *et al.*, 2010).



**Figura 5.** (a) Modelo hipotético de la biosíntesis de magnetosomas, que depende de varias etapas que incluyen diferentes proteínas asociadas al magnetosoma (MAPs). ME, membrana externa; MP, membrana plasmática (modificada de Lohße *et al.*, 2014). (b) Predicciones de la estructura de proteínas que intervienen en el control del tamaño y la morfología de las partículas de magnetita (modificada de Nudelman y Zarivach, 2014).

#### 4.2.2.1.2. Características del cristal del magnetosoma

Este proceso de biomineralización tan controlado produce cristales de magnetita con características muy definidas que se detallan a continuación:

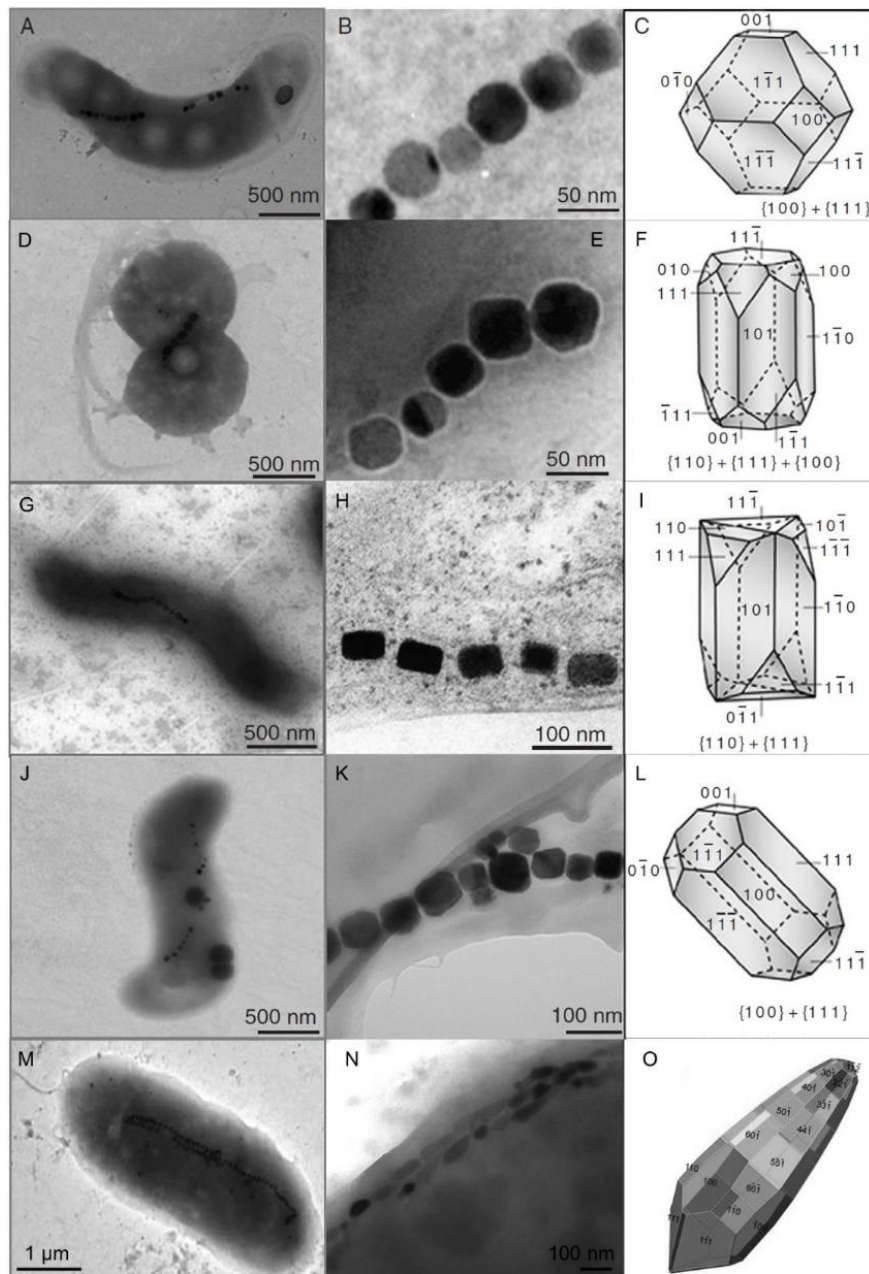
Morfología: la magnetita de los magnetosomas puede tener diferentes morfologías cristalinas pero, normalmente, es específica de la cepa bacteriana (Bazylinski *et al.*, 1994). Se han observado tres tipos de morfología principales: (1) cuboidales (cuboctaédricas) (Mann *et al.*, 1984a); (2) pseudoprismáticas elongadas (Mann *et al.*, 1984b; Meldrum *et al.*, 1993), y (3) con forma de bala (Mann *et al.*, 1987a; Lefèvre *et al.*, 2011). En la Figura 6 se resumen las diferentes morfologías cristalinas en función de la cepa. La mayoría de los cristales producidos son anisotrópicos, al contrario que los formados inorgánicamente (Figura 2) o por MIB, y frecuentemente aparecen elongados en la dirección cristalográfica [111] (Thomas-Keprta *et al.*, 2000). Este crecimiento alejado del equilibrio (Mann *et al.*, 1987b; Thornhill *et al.*, 1994) se produce por el desarrollo desigual de algunas caras de simetría relacionadas y es, probablemente, consecuencia de la interacción del cristal con proteínas del magnetosoma (Amemiya *et al.*, 2007; Prozorov *et al.*, 2007a, b; Valverde-Tercedor *et al.*, 2015). De esta manera, la elongación de los cristales permite a las bacterias magnetotácticas aumentar el tamaño del cristal y, por tanto, el momento magnético dipolar, manteniéndose como un dominio único magnético, sin pasar al rango de multidominio (Thomas-Keprta *et al.*, 2000).

Tamaño: la mayoría de los cristales maduros de los magnetosomas se encuentran dentro de un pequeño rango de tamaños entre 35 y 120 nm (Bazylinski *et al.*, 1994; Bazylinski y Moskowitz, 1997) y, por tanto, son de dominio magnético único y ferrimagnéticas, es decir, magnéticas de forma permanente a temperatura ambiente (Cornell y Schwertmann, 2003). Además, como hemos comentado, al presentar un único dominio magnético con tamaños >30 nm, la coercitividad es máxima y estable, debido a una mayor barrera energética en comparación con nanopartículas más pequeñas (Thomas-Keprta *et al.*, 2000; Bennet *et al.*, 2015). La distribución de tamaños de los cristales de los magnetosomas es log-normal (Arató *et al.*, 2005), lo que hace que estén uniformemente magnetizados y se diferencien de los producidos por MIB e inorgánicamente que muestran una curva de distribución asimétrica.

Pureza química: la magnetita producida por bacterias magnetotáticas es generalmente  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estequiométrica y químicamente pura (Bazylinski y Frankel, 2004), que carece de elementos traza menores o insignificantes, como Ti, Cr, Mn, y Al (Thomas-Keprta *et al.*, 2000) con pocas excepciones (Towe y Moench, 1981). Las bacterias magnetotáticas excluyen estos elementos de los cristales en crecimiento, incluso aunque estén disponibles en el medio (Gorby, 1989; Thomas-Keprta *et al.*, 2000). Esta alta especificidad química es típica de rutas bacterianas para la adquisición y el transporte de Fe, que involucran múltiples etapas redox asociadas con el transporte acoplado a ATP a través de la bicapa lipídica (Braun *et al.*, 1998). Dado que Ti, Al, y la mayoría de impurezas químicas reducen la saturación de magnetización, es posible que esta selectividad sea producto de la selección natural (Thomas-Keprta *et al.*, 2000).

Estructura cristalina: los cristales de magnetita de los magnetosomas tienen gran perfección estructural, sin defectos internos, sólo se ha observado por diferentes técnicas (Mann *et al.*, 1984a, b). La ausencia de defectos en la estructura cristalina aumenta el momento magnético neto de la partícula, imprescindible para una aeromagnetotaxia eficiente, por lo que puede ser consecuencia de la selección natural (Thomas-Keprta *et al.*, 2000). Esta alta pureza química y perfección estructural de los cristales de los magnetosomas, combinadas con sus propiedades magnéticas únicas, los diferencia enormemente de los cristales de magnetita producidos por MIB, que incorporan materia orgánica en su interior alterando la estructura cristalina (Perez-Gonzalez *et al.*, 2010).

Alineación de la cadena: la alineación de los magnetosomas en una o más cadenas dentro de las células (Bazylinski., 1995) produce la orientación espontánea de los cristales a lo largo del eje de cada cadena y, por tanto, que el momento magnético total de la célula sea la suma vectorial de los momentos de cada uno de los cristales individuales dispuestos linealmente. De esta manera la célula maximiza su momento magnético dipolar (Thomas-Keprta *et al.*, 2000).



**Figura 6** Micrografías electrónicas de transmisión de células de diferentes especies de bacterias magnetotácticas (primera columna), sus magnetosomas (sunda columna) y modelos de cristales idealizados en base a análisis de HR-TEM (tercera columna). (A-C) Especies de *Magnetospirillum*, (D-F) *Magnetococcus marinus* MC-1, (G-I) *Magnetovibrio blakemorei* MV-1 and MV-2, (J-L) *Magnetospira thiophila* MMS-1 (modificadas de Bazylinski y Schübbe, 2007), y (M-O) *Desulfamplus magnetomortis* BW-1 (modificadas de Lefèvre *et al.*, 2011; Pósfai *et al.*, 2013).

### 4.2.3. Nanopartículas de magnetita biomiméticas

Entre las características del magnetosoma, explicadas en la sección anterior, el tamaño y la morfología han recibido mucha atención, ya que son parámetros cruciales para determinar su comportamiento como dominio magnético único, que permite que sean fácilmente guiados mediante el uso de un campo magnético externo (Prozorov *et al.*, 2013; Arakaki *et al.*, 2014). Por ello, los magnetosomas son de gran interés para aplicaciones nanotecnológicas y especialmente en biomedicina, ya que también son biocompatibles (Sun *et al.*, 2010). Algunos ejemplos de estas aplicaciones son la separación celular (Matsunaga *et al.*, 2007), resonancia magnética (Lisy *et al.*, 2007), extracción de ADN (Ota *et al.*, 2006), detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Maruyama *et al.*, 2004, 2007; Matsunaga *et al.*, 2007), en tratamientos de hipertermia (Alphandéry *et al.*, 2011, 2014), y como transportadores de fármacos (Sun *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de ser la nanopartícula magnética ideal, aumentar la producción de magnetosomas a niveles industriales es un desafío, dado que las bacterias magnetotácticas son difíciles de cultivar, debido a sus exigentes requerimientos fisiológicos, y tienen un crecimiento lento (Bazylinski y Schübbe, 2007). Esto no es trivial, dado que el proceso de biomineralización del magnetosoma no se comprende completamente y los genes que son esenciales para el proceso aún se están dilucidando (Lohße *et al.*, 2011, 2014; Kolinko *et al.*, 2014). Por ello, actualmente, distintos grupos de investigación están tratando de resolver este problema siguiendo, básicamente, tres aproximaciones diferentes:

La primera trata de transformar microorganismos "no magnetotácticos", con condiciones nutricionales más sencillas y mayores tasas de crecimiento que las bacterias magnetotácticas, en microorganismos magnetotácticos. En este contexto, el trabajo de Kolinko *et al.* (2014) es particularmente relevante. Estos autores demostraron, por primera vez, cómo la inserción de genes específicos de *Magnetospirillum gryphiswaldense* en *Rhodospirillum rubrum* (más fácil de cultivar) dio lugar a la formación de magnetosomas "heterólogos". Además, comprobaron en mutantes knockout que la alteración de los magnetosomas "heterólogos" de *Rhodospirillum* era comparable a la producida cuando se eliminaban los mismos genes en *M. gryphiswaldense*. Sin embargo, aunque los resultados eran muy prometedores, la estabilidad del hospedador y el escalado real de estos magnetosomas "heterólogos" son cuestionables.

La sonda alternativa es la utilización de magnetosomas producidos por bacterias no magnetotácticas. En este contexto, se ha demostrado que las bacterias que oxidan el Fe, tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferriphilum*, también sintetizan magnetosomas. Estas bacterias tienen la gran ventaja de que son mucho más fáciles de cultivar y, por tanto, la producción de magnetosomas sería más fácil de escalar (Gao *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2013a, 2016). Sin embargo, las propiedades magnéticas de sus magnetosomas no son óptimas, como las de las bacterias magnetotácticas. *Leptospirillum ferriphilum* produce 3-5 partículas, no dispuestas en cadena, que son una mezcla de óxidos de hierro (magnetita) y sulfuros de hierro (greigita, pirita no magnética y, posiblemente, pirrotina ferromagnética). Aunque son de dominio único (25-120 nm), estos sólidos mezclados producen una menor respuesta magnética de la célula cuando se exponen a un campo magnético externo (Gao *et al.*, 2006). Por tanto, la purificación de las partículas incluiría, no solo la separación partícula-célula, sino también la extracción de la magnetita de la mezcla de sólidos para obtener una partícula con propiedades magnéticas mejoradas. En el caso de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Yan *et al.* (2013a) demostraron que son capaces de formar entre 1 y 3 magnetosomas, dispuestos irregularmente, y compuestos por una mezcla de nanopartículas de magnetita de dominio magnético único y superparamagnéticas. Aunque las propiedades magnéticas de estos magnetosomas aún no están bien caracterizadas, la temperatura de transición de Verwey (la temperatura a la cual la magnetita sufre cambios en sus propiedades magnéticas) de estas partículas es claramente más baja que la de la magnetita estequiométrica, lo que puede resultar en un comportamiento magnético diferente. En cualquier caso, no hay suficientes datos disponibles.

La tercera alternativa es la biomimética, es decir, aprender de la naturaleza para diseñar nuevas estrategias de producción de materiales avanzados funcionales bioinspirados (Mann, 2001). Con el fin de sintetizar químicamente cristales parecidos al magnetosoma, cuya producción sería potencialmente escalable hasta niveles industriales, varias MAPs, tanto completas (expresadas como proteínas recombinantes) como péptidos sintéticos, se han probado en diferentes experimentos de precipitación de magnetita *in vitro* (Arakaki *et al.*, 2003, 2010; Amemiya *et al.*, 2007; Prozorov *et al.*, 2007a, b; Galloway *et al.*, 2011; Rawlings *et al.*, 2014; Kashyap *et al.*, 2014a, b; Liu *et al.*, 2015; Valverde-Tercedor *et al.*, 2015; Bird *et al.*, 2016a; Nudelman *et al.*, 2016, 2018a, b; Ubago-Rodríguez *et al.*, 2019). Esta aproximación se basa en el hecho de que



las proteínas y otras macromoléculas biológicas interactúan con los minerales en los sistemas biológicos y desempeñan un papel importante en los procesos de biomineralización (Mann, 2001). Los experimentos *in vitro* están lejos de representar las condiciones físicoquímicas del magnetosoma real y, por lo tanto, sus resultados no pueden extrapolarse fácilmente a lo que realmente ocurre *in vivo*. Sin embargo, dan información esencial sobre el papel de las MAPs que parecen estar directamente involucradas en la formación de magnetita, ya que las funciones de otras proteínas, como las que controlan las condiciones redox y de pH, pueden suplirse mediante la adición de distintos compuestos químicos a la reacción. Actualmente, solo algunas de las MAPs, con una posible función en el proceso de precipitación de magnetita, se han producido como proteínas recombinantes en diferentes cepas de *Escherichia coli* y, solo algunas de ellas, se han probado en experimentos de precipitación de magnetita *in vitro*. Las características de estas proteínas y de las partículas de magnetita biomimética resultantes se explican a continuación:

Mms6: es la proteína más abundante del magnetosoma (Raschdorf *et al.*, 2018), y se encuentra fuertemente unida al cristal (Arakaki *et al.*, 2003). Es una proteína ácida de pequeño tamaño (entre 77 y 194 aminoácidos, según la especie) que podría activarse mediante escisión proteolítica de su proproteína (Grünberg *et al.*, 2004). La predicción de su estructura secundaria muestra un dominio N-terminal, no estructurado, seguido de una hélice transmembrana, que contiene aminoácidos básicos, y un C-terminal, en estructura de hélice  $\alpha$ , rico en aminoácidos ácidos (Nudelman y Zarivach, 2014) (Figura 5b). Arakaki *et al.* (2003) demostraron que Mms6 une Fe, lo que sugiere que la región C-terminal podría iniciar la nucleación de los cristales durante la formación de magnetita, y controlar la morfología de los cristales de magnetita *in vitro*. Además, Kashyap *et al.*, (2014a), en experimentos *in vitro*, observaron que Mms6 se autoensambla en una estructura micelar que une Fe en su superficie y puede facilitar la nucleación de magnetita a través de la formación de una fase amorfa. El efecto de Mms6 de AMB-1 ha sido ampliamente analizado en experimentos de precipitación de magnetita *in vitro* por varios grupos. Arakaki *et al.* (2003) utilizaron un método de coprecipitación (añadiendo iones férricos y ferrosos en solución acuosa), que dio lugar a partículas de 20-30 nm con morfología cuboidal. Prozorov *et al.* (2007a) siguieron este mismo método pero en un entorno viscoso, utilizando diferentes geles, y produjeron partículas uniformes de ~30 nm. Amemiya *et al.* (2007) siguieron un protocolo de oxidación parcial de hidróxido ferroso, que produjo cristales de tamaño uniforme con

una distribución de tamaño estrecha (~20 nm) y una morfología cubo-octaédrica con las caras [111] y [100] parecidas a las de los magnetosomas. Mms6 también se utilizó como molde para la nucleación de magnetita *in vitro* unida a superficies. Esta aproximación proporcionó resultados muy prometedores no solo para comprender mejor su papel *in vivo* (Liu *et al.*, 2015; Bird *et al.*, 2016a), sino también desde un punto de vista práctico para la fabricación de nanodispositivos magnéticos (Galloway *et al.*, 2012a, b; Bird *et al.*, 2016b). Por otro lado, Arakaki *et al.* (2010) sintetizaron varios péptidos inspirados en los extremos N- y C-terminal de Mms6, y observaron que la región C-terminal tenía un control significativo sobre la morfología de los cristales *in vitro*, obteniendo partículas con las mismas distribuciones de tamaño que las producidas con toda la proteína. Nudelman *et al.* (2018b) también trabajaron con péptidos del C-terminal de Mms6 y observaron que tenían una alta afinidad de unión a Fe, de lo que se deduce que, probablemente, el C-terminal juega un papel esencial aumentando la concentración local de Fe para iniciar la nucleación.

MamC: también denominada Mms13, es la sunda proteína más abundante del magnetosoma (Raschdorf *et al.*, 2018). Como Mms6, MamC es una proteína ácida de pequeño tamaño (113-145 aminoácidos, dependiendo de la especie). La predicción de su estructura secundaria muestra dos dominios transmembrana helicoidales conectados por un bucle en estructura de hélice  $\alpha$ , que contiene varios residuos ácidos (Slabinski *et al.*, 2007; Nudelman y Zarivach, 2014) (Figura 5b). Valverde-Tercedor *et al.*, (2015) demostraron que MamC une hierro y propusieron que las regiones ácidas presentes en el bucle y en el C-terminal crean una alta concentración local de hierro que favorece la nucleación de magnetita. La idea de que MamC puede promover la nucleación también está reforzada por el trabajo de Kashyap *et al.* (2014b), que demostraron que MamC forma micelas cargadas negativamente que parecen unir cationes de hierro. Nudelman *et al.* (2016, 2018a) observaron que la estructura helicoidal del bucle es necesaria para que MamC interactúe con la magnetita y controle el tamaño y la morfología de los cristales en crecimiento. Además, demostraron que dos aminoácidos específicos, Asp66 y Glu70, desempeñan un papel importante en las interacciones proteína-cristal. Sin embargo, el mecanismo específico de la interacción entre MamC y el cristal todavía se desconoce. En relación a la síntesis de magnetita *in vitro*, mediante el método de coprecipitación, Valverde-Tercedor *et al.* (2015) produjeron magnetitas de un tamaño medio de 30-40 nm, mientras que en los experimentos control (sin proteína) fue de 20–30 nm. Además, los cristales formados en presencia de MamC muestran caras bien

desarrolladas con morfologías rómbicas, rectangulares, y cuadradas bidimensionales. La temperatura de Verwey de estas nanopartículas es 100 K, consistente con la descrita para los magnetosomas (que no es habitual en partículas sintéticas), y presentan un mayor momento magnético por partícula en comparación con las del experimento control (sin proteínas) (Valverde Tercedor *et al.*, 2015). Por todo ello y, especialmente debido a sus óptimas propiedades magnéticas, en esta Tesis Doctoral se evaluará el potencial uso de las nanopartículas de magnetita sintetizadas en presencia de MamC como nanotransportadores de fármacos y agentes productores de hipertermia para terapia antitumoral.

MmsF (y su proteína homóloga MamF): MmsF y MamF comparten un 61% de homología (Lohße *et al.*, 2011). La predicción de sus estructuras secundarias muestra tres hélices transmembrana conectados por dos bucles (Figura 5b). El primer bucle y el C-terminal, ubicados en el lumen del magnetosoma, presentan aminoácidos ácidos, que podrían interaccionar con las partículas de magnetita (Murat *et al.*, 2012; Nudelman y Zarivach, 2014). Estas proteínas se autoensamblaron en estructuras similares a vesículas solubles en agua, denominadas "proteinosomas" (Rawlings *et al.*, 2014). Estos autores realizaron experimentos de coprecipitación de magnetita en presencia de MmsF y MamF, utilizando soluciones de sales de hierro. En el caso de MmsF, obtuvieron nanopartículas más grandes (similares a las de los magnetosomas) y mejor cristalizadas que las de los experimentos de control (sin proteínas). Estos resultados son consistentes con los de los experimentos *in vivo* (Murat *et al.*, 2012). Sin embargo, en presencia de MamF se formaron diversos óxidos de hierro, lo que supone una notable diferencia para proteínas tan similares en secuencia y estructura.

Por tanto, aunque todas estas partículas sintetizadas en presencia de diferentes MAPs están lejos de ser idénticas a las de los magnetosomas, representan un paso adelante en la síntesis de nanopartículas de magnetita biomimética, que podrían ser adecuadas para aplicaciones nanotecnológicas.

## II. Interacciones biológicas de las nanopartículas magnéticas y su potencial en biomedicina

A medida que aumenta la consideración de las nanopartículas magnéticas (MNPs) para aplicaciones biomédicas, es crucial un entendimiento más profundo sobre las interacciones de las partículas dentro de los organismos biológicos. Tras su administración oral, parenteral o tópica, la identidad de las nanopartículas cambia al interactuar potencialmente con miles de biomoléculas. Después de la exposición, las partículas exhiben una identidad biológica dinámica que determina su respuesta fisiológica y, por lo tanto, define el destino de las nanopartículas dentro del organismo (Figura 7). La identidad sintética de la partícula, que se define por parámetros como el tamaño, la morfología, la superficie, y la composición química, dicta su identidad biológica y ésta, a su vez, determina la respuesta fisiológica, que incluye procesos de señalización, cinética, transporte, acumulación, y toxicidad. Por tanto, la utilización de las MNPs en aplicaciones *in vivo* requiere el estudio previo sobre sus interacciones biológicas para poder predecir las posibles respuestas fisiológicas y evaluar la toxicidad, biodistribución, biodegradación y eliminación/excreción de las nanopartículas (Walkey y Chan, 2012).

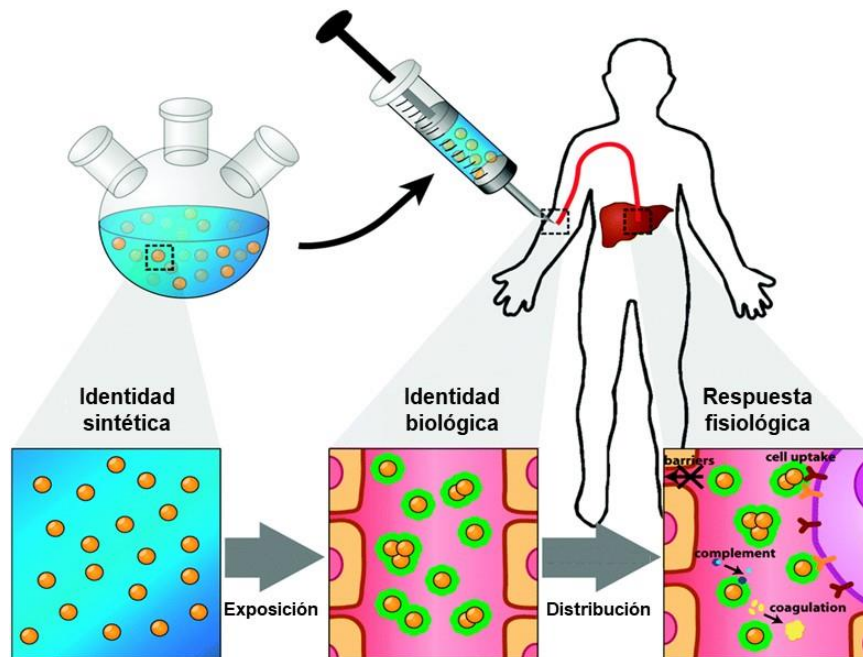
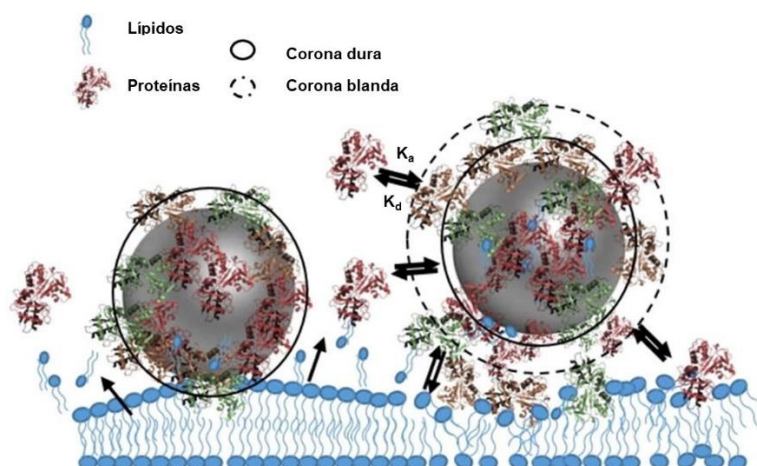


Figura 7. Alteración de la respuesta fisiológica como consecuencia de la identidad sintética y biológica de las nanopartículas (modificada de Walkey y Chan, 2012).

#### **4. Interacción con biomoléculas y formación de proteínas corona**

Los nanomateriales se suelen administrar con mayor frecuencia por vía intravenosa, ya que de esta manera se distribuyen instantáneamente por todo el organismo. Cuando las nanopartículas entran en el torrente sanguíneo están expuestas a una gran variedad de biomoléculas del plasma sanguíneo, como proteínas, lípidos, carbohidratos, iones, y metabolitos. Entre ellas, las proteínas son las más abundante en el sistema circulatorio (Lundqvist *et al.*, 2008). Varios miles de proteínas plasmáticas diferentes, con concentraciones variables entre  $10^{-8}$  y  $10^2$  g/L, compiten por adsorberse a la superficie de las partículas. La interacción de diferentes proteínas con las nanopartículas es un proceso dinámico y depende de sus tasas o constantes de adsorción/desorción ( $K_a/K_d$ ) que, a su vez, dependen de la afinidad de cada proteína individual con la superficie (Monopoli *et al.*, 2011) (Figura 8). Este intercambio cinético de proteínas en las superficies de las partículas se denomina efecto Vroman y depende de varios parámetros físico-químicos (tamaño, carga superficial, morfología, composición química, solubilidad), del entorno fisiológico (sangre, líquido intersticial, citoplasma celular) y de la duración de la exposición (Vroman *et al.*, 1980). Las proteínas corona cambian la identidad de las partículas administradas e influyen en las interacciones biológicas, como la adsorción celular, el tiempo de circulación, la tasa de aglomeración, la acumulación, la señalización, y la toxicidad. Al ser la composición de las proteínas diferente en cada nanopartícula, su análisis es fundamental para determinar el destino de las partículas *in vivo* (Rahman *et al.*, 2013). La composición final de las proteínas se basa principalmente en sus diferentes afinidades de unión, que dependen de la identidad sintética del nanomaterial. Alrededor de las partículas se forma una corona "dura" de proteínas estrechamente unidas con alta afinidad y, en torno a ella, se forma una sunda capa de corona "blanda", que consiste en proteínas con menor afinidad al nanomaterial, unidas a la corona "dura" mediante interacciones débiles de Coulomb o Van-der-Waals (Figura 8) (Yang *et al.*, 2013b). Las proteínas más abundantes en el plasma sanguíneo humano, como albúmina sérica humana (HSA), fibrinógeno, inmunoglobulina G (IgG) y apolipoproteínas (Apo), suelen ser las primeras en adsorberse a las partículas, pero son potencialmente reemplazadas en etapas posteriores por proteínas con mayor afinidad y menor movilidad, como apolipoproteínas y factores de coagulación (Mahmoudi *et al.*, 2011).



**Figura 8.** Formación de corona de proteínas "duras" y "blandas" alrededor de las nanopartículas en base a sus tasas o constantes de adsorción/desorción ( $K_a/K_d$ ) (modificada de Di Silvio *et al.*, 2017).

### 2.1. Parámetros físicoquímicos que influyen en la adsorción de proteínas

Aunque las características del nanomaterial (composición, morfología, y tamaño) influyen claramente en la unión a proteínas, las propiedades de la superficie (carga e hidrofobicidad) probablemente sean más importantes, ya que los mismos tipos de proteínas se adsorben independientemente de su composición (sólo cambian las cantidades de proteínas unidas) (Aggarwal *et al.*, 2009). A continuación se detallan los parámetros físico-químicos que influyen en la adsorción de las proteínas plasmáticas a la superficie de las nanopartículas:

Carga superficial (o potencial  $\zeta$ ): es un factor crucial para determinar la composición de las proteínas corona y, en consecuencia, su destino final en el sistema biológico. Varios autores observaron que al aumentar la densidad de carga superficial de las partículas se producía un aumento en la adsorción de proteínas plasmáticas, pero prácticamente sin diferencias en el perfil de proteínas detectadas (Tenzer *et al.*, 2013; Gessner *et al.*, 2002). Además, Cedervall *et al.* (2007) demostraron que las nanopartículas con carga superficial positiva (con grupos funcionales básicos) adsorben preferentemente proteínas con puntos isoeléctricos ( $pI$ )  $<5.5$  (como la albúmina), mientras que en aquellas con carga superficial negativa (y con superficies con grupos funcionales ácidos) aumenta la adsorción de proteínas con  $pI >5.5$  (como las IgG).

Hidrofilicidad/ hidrofobicidad: afecta tanto a la cantidad como a la composición de proteínas adsorbidas (Gessner *et al.*, 2000; Cedervall *et al.*, 2007). Generalmente, se adsorben más proteínas a la superficie de nanopartículas hidrófobas que a la de sus

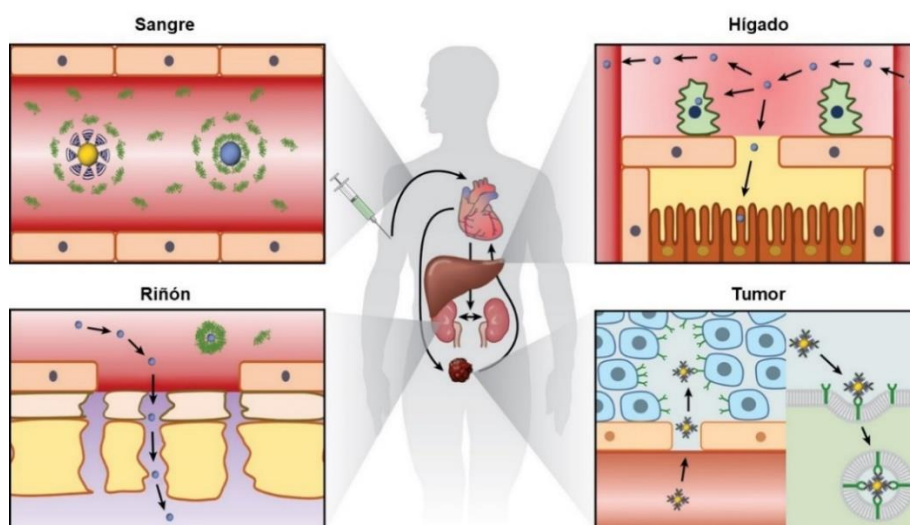
homólogas hidrófilas (Aggarwal *et al.*, 2009). La unión de apolipoproteínas es una parte importante de la formación de las proteínas corona en las nanopartículas hidrófobas, mientras que las hidrófilas típicamente adsorben IgG, fibrinógeno, y albúmina (Gessner *et al.*, 2000; Cedervall *et al.*, 2007). No obstante, las nanopartículas hidrófobas adsorben más moléculas de albúmina que las hidrófilas, aunque la afinidad de la proteína a ambos tipos de nanopartículas es aproximadamente la misma (Lindman *et al.*, 2007).

Tamaño, curvatura, y morfología: la afinidad de unión y la composición de las proteínas plasmáticas son distintas sún el tamaño de la nanopartícula (Monopoli *et al.*, 2011), y esto es especialmente significativo cuando el tamaño de las nanopartículas se acerca al tamaño de las proteínas (Lynch y Dawson, 2008). Generalmente, cuanto mayor es el tamaño de las nanopartículas, mayor es el grado de cobertura proteica (Lindman *et al.*, 2007; Hühn *et al.*, 2013) y cuanto más pequeño, mayor es el grosor de la corona (Lundqvist *et al.*, 2004; Walkey *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016). La curvatura de los nanomateriales también conduce a una composición diferente de proteínas corona. En general, las superficies altamente curvadas disminuyen las interacciones proteína-proteína (Lundqvist *et al.*, 2008; Lynch *et al.*, 2008). En relación a la morfología, las nanopartículas con formas elongadas, como varillas, muestran una mayor adsorción de proteínas en comparación con las esféricas (Gagner *et al.*, 2011), debido a una mayor densidad potencial de sitios de unión en los lados longitudinales de la varilla (Chakraborty *et al.*, 2011). Además, las proteínas corona también pueden variar el tamaño de las nanopartículas induciendo cambios en la agregación. Algunos autores han observado agregación de nanopartículas debido a la formación de enlaces entre proteínas (Kendall *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012). Por el contrario, en otros estudios, la adsorción de proteínas a las nanopartículas mejoraba su estabilidad coloidal y evitaba la formación de agregados (Monopoli *et al.*, 2011; Wells *et al.*, 2012; Tedja *et al.*, 2012; Dominguez-Medina *et al.*, 2013; Zaloga *et al.*, 2014).

No obstante, la mayoría de las investigaciones sugiere que se requieren más estudios para comprender el efecto del tamaño, la morfología, la carga superficial, y la hidrofiliidad/hidrofobicidad en las interacciones entre las nanopartículas y las proteínas. Esto es particularmente necesario en el caso de las MNPs, ya que el número de estudios realizados sobre ellas es muy reducido.

## 5. Influencia en las respuestas fisiológicas

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas tienen gran influencia en su adsorción e internalización celular, citotoxicidad, tiempo de circulación, biodistribución/acumulación en los diferentes órganos/tumor y, por tanto, en su bioeliminación. Sin embargo, cuando las nanopartículas se inyectan en el torrente sanguíneo, la adsorción de proteínas plasmáticas a su superficie también altera estos procesos fisiológicos. Después de la rápida adsorción de proteínas plasmáticas, las partículas administradas se ven atacadas por el sistema reticuloendotelial (RES), a través de macrófagos, y eliminadas a través del hígado y el bazo. La eliminación también puede ocurrir mediante filtración de la sangre a través de los riñones, si las nanopartículas muestran tamaños suficientemente pequeños. La retirada rápida del sistema circulatorio reduce su toxicidad a corto y largo plazo, pero conlleva una penetración limitada de los nanomateriales en áreas específicas, como tumores sólidos (Lane *et al.*, 2015, Figura 9).



**Figura 9.** Complejo comportamiento *in vivo* de las nanopartículas administradas. Tras la inyección, las nanopartículas se encuentran con numerosas respuestas fisiológicas, como la adsorción de proteínas séricas, la captación por el RES, el aclaramiento renal y la acumulación en el tejido tumoral mediante el transporte activo o pasivo (modificada de Lane *et al.*, 2015).



### 5.1. Adsorción e internalización celular

Las diferencias en la composición de las proteínas adsorbidas a las nanopartículas afectan en gran medida a la captación celular (Lee *et al.*, 2015). Se ha observado una internalización celular mejorada de las partículas por decoración con proteínas plasmáticas, como ApoH (Ritz *et al.*, 2015), alpha2GP, IgG y HAS (Thiele *et al.*, 2003), ApoA-I, ApoA-II, ApoB-100 o vitronectina (Palchetti *et al.*, 2016) y también de nanopartículas magnéticas incubadas en suero humano (Yallapu *et al.*, 2015). Por el contrario, la adsorción de HSA, clusterina, ApoA-IV y ApoC-III se relacionó con la inhibición de la captación celular (Ritz *et al.*, 2015; Kokkinopoulou *et al.*, 2017). La unión de ApoE o ApoB a las nanopartículas consigue el paso a través de la barrera hematoencefálica y puede utilizarse para la focalización cerebral (Kreuter *et al.*, 2002). Además, la unión de proteínas también puede producir cambios en el tamaño y la carga superficial de las nanopartículas (Chithrani *et al.*, 2006; Nagayama *et al.*, 2007; Dutta *et al.*, 2007), que afectan al proceso de internalización celular.

Por otra parte, la ruta de entrada de las nanopartículas a las células también puede verse modificada como consecuencia de la adsorción de proteínas. Caracciolo *et al.* (2010) observaron que la internalización de C-ChoI-DOPE/DNA lipoplex cambió de endocitosis dependiente de clatrina a mediada por caveolina después de su incubación en suero, aumentando así su eficiencia de transfección. Se han propuesto diferentes mecanismos para la captación MNPs: difusión pasiva, endocitosis mediada por receptor, endocitosis mediada por clatrina, internalización mediada por caveolina y otros tipos de endocitosis independientes de clatrina y caveolina. No obstante, con frecuencia, varios mecanismos endocíticos tienen lugar simultáneamente (Hillaireau y Couvreur, 2009). En los estudios relacionados con la internalización de MNPs, se han analizado diferentes inhibidores endocíticos para determinar qué ruta de internalización siguen las partículas. Por ejemplo, la clorpromazina, como inhibidor de la endocitosis dependiente de clatrina, reduce significativamente la captación de MNPs (Gu *et al.*, 2011).

Entre los diferentes parámetros físicoquímicos que tienen influencia en la internalización de las nanopartículas, el tamaño es relevante con respecto a la vía endocítica, aunque su impacto puede variar aún el tipo de células (Hillaireau *et al.*, 2009). Por ejemplo, distintos tamaños de las mismas microesferas de poliestireno, que variaban entre 20 y 1000 nm, tuvieron una captación diferente en distintas líneas celulares (Zauner *et al.*, 2001). Varios autores han observado internalización dependiente del tamaño para la misma línea celular, tanto en términos de número como

de masa total (Desai *et al.*, 1996, 1997; Qaddoumi *et al.*, 2004). El tamaño también puede afectar directamente el tipo de endocitosis. Generalmente, la internalización de nanopartículas con un diámetro <200 nm implica endocitosis mediada por clatrina, mientras que, a medida que aumenta el tamaño de la partícula, la endocitosis cambia a mediada por caveolina, como se observa en partículas de 500 nm (Rejman *et al.*, 2004).

En algunos casos, sin embargo, el tamaño tiene poca influencia en la adsorción en comparación con las propiedades de la superficie, como la carga y la presencia de ligandos. Las partículas cargadas presentan una mayor internalización celular (Chellat *et al.*, 2005). Además, por el carácter negativo de la membrana plasmática, las células incorporan nanopartículas cargadas positivamente en mayor número y a mayor velocidad que las cargadas negativamente (Hühn *et al.*, 2013). Esto es debido a que su superficie positiva puede cambiar el potencial de la membrana celular, despolarizando y rompiendo la bicapa lipídica (Kim *et al.*, 2013), y permeabilizándola de manera similar a como actúan los detergentes (Smith *et al.*, 2012). Varios autores han observado una captación eficiente, en diferentes líneas celulares, de nanopartículas potencial  $\zeta$  de entre +15 a +35 mV, posiblemente a través de endocitosis mediada por clatrina (Huang *et al.*, 2002; Mao *et al.*, 2005; Harush-Frenkel *et al.*, 2007).

Todavía hay controversia en relación a la influencia de la morfología de las partículas en la endocitosis. En algunos casos se encontró que las nanopartículas esféricas tenían una tasa más alta y más rápida de endocitosis en comparación con las barras o discos (Chithrani *et al.*, 2006; Muro *et al.*, 2008). Por el contrario, otros estudios sugirieron la captación preferencial de partículas en forma de varilla (Gratton *et al.*, 2008a) o cilíndricas (Gratton *et al.*, 2008b). Estas discrepancias pueden explicarse por el predominio de otros factores como la naturaleza, el tamaño y la carga superficial de las nanopartículas, así como por las múltiples vías endocíticas que pueden producirse simultáneamente (mediadas por clatrina, caveolina, receptor, o macropinocitosis; Hillaireau *et al.*, 2009).

## 2.2. Citotoxicidad

La unión de las proteínas a las nanopartículas protege contra el daño celular inducido por las nanopartículas desnudas, reduciendo su citotoxicidad. Este efecto de enmascaramiento de las nanopartículas, también denominado efecto de "caballo de Troya", se ha demostrado en varias proteínas plasmáticas, como fibrinógeno bovino, BSA, transferrina, y globulina  $\gamma$  (Petri-Fink *et al.*, 2008; Clift *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2011; Tedja *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Zaloga *et al.*, 2014; Obst *et al.*, 2017). Eso es especialmente relevante para nanopartículas cargadas positivamente, ya que es más probable que induzcan hemólisis y agregación plaquetaria en comparación con partículas neutras o aniónicas (Goodman *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013). Por tanto, la cubierta de proteínas corona prevendría el contacto directo entre las nanopartículas desnudas y las membranas celulares, inhibiendo así la muerte celular causada por la carga positiva (Wang *et al.*, 2013).

La adsorción de proteínas plasmáticas o del suero a las nanopartículas también explica por qué con frecuencia los investigadores encuentran poca correlación entre los resultados de toxicidad *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, estudios de toxicidad pulmonar demostraron que partículas de hierro instiladas *in vivo* producían baja toxicidad, causando solo respuestas inflamatorias leves, mientras que *in vitro* mostraban una considerable toxicidad, especialmente a dosis altas, en diferentes líneas celulares (Mahmoudi *et al.*, 2010). Probablemente durante los ensayos *in vivo*, la capacidad del organismo para mantener la homeostasis (por ejemplo, al almacenar el exceso de hierro en el caso de MNPs) generalmente reduce los efectos negativos observados en los experimentos *in vitro*. Pero también puede deberse a la capacidad de las nanopartículas de cambiar la composición de los medios de cultivo celulares como resultado de la unión de proteínas del suero, que pueden distorsionar los resultados de citotoxicidad (Mahmoudi *et al.*, 2009). En un intento por lograr resultados más fiables y exactos *in vitro*, Weissleder *et al.*, (1990) introdujeron nanopartículas de óxido de hierro en el medio de cultivo durante 24 h para crear una capa estable de proteínas del suero en la superficie. Posteriormente, el medio se reemplazó por uno nuevo, y se evaluó la toxicidad de las nanopartículas recubiertas por las proteínas del suero, observándose que disminuía significativamente en comparación con las nanopartículas desnudas. Por ello, la evaluación de las interacciones entre nanopartículas y proteínas plasmáticas o del suero es imprescindible para determinar su biocompatibilidad y encontrar relación con lo que sucede en un escenario *in vivo*.

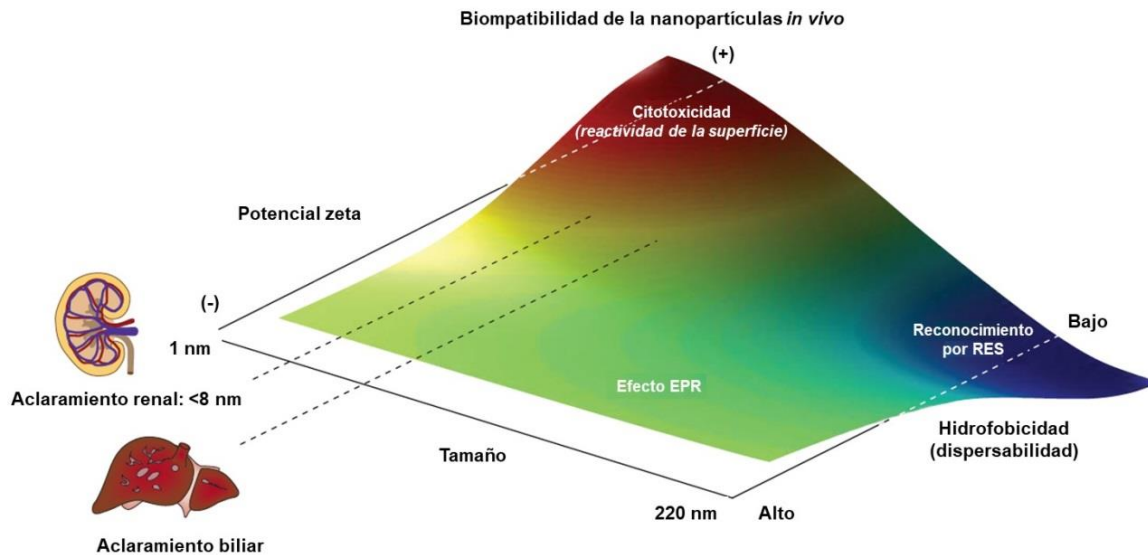
### 2.3. Biodistribución, toxicidad y eliminación *in vivo*

Las características físicoquímicas de las nanopartículas, así como la adsorción de proteínas corona (Gessner *et al.*, 2002; Dutta *et al.*, 2007), determinan parámetros biológicos, como la biodistribución, acumulación, toxicidad, y eliminación de las nanopartículas *in vivo*. El Laboratorio de Caracterización de Nanotecnología (NCL) del National Cancer Institute en Maryland, después de evaluar alrededor de 130 tipos diferentes de nanopartículas, observó que la hidrofobicidad, la carga superficial, y el tamaño son los principales parámetros que influyen en las respuestas fisiológicas y, por tanto, en la biocompatibilidad de las nanopartículas *in vivo* (McNeil, 2009; Nel *et al.*, 2009) (Figura 10). Las nanopartículas hidrófobas generalmente tienen vidas medias muy cortas (de segundos a minutos), ya que se opsonizan más rápidamente que las partículas hidrófilas (Carstensen *et al.*, 1992; Norman *et al.*, 1992). En relación a la carga, las partículas con carga neutra tienen una velocidad de opsonización claramente más lenta que las partículas cargadas (Roser *et al.*, 1998; Aggarwal *et al.*, 2009) y, específicamente, las partículas catiónicas son más fácilmente opsonizadas (Mahmoudi *et al.*, 2011). Por tanto, con el fin de prevenir la opsonización, la superficie de las nanopartículas puede recubrirse con grupos cargados negativamente, lo que lleva a un potencial  $\zeta$  en el rango de -30 a -50 mV en condiciones fisiológicas. Esto ocurre de manera natural cuando las nanopartículas se inyectan en el torrente sanguíneo, ya que la adsorción de proteínas plasmáticas (la mayoría cargadas negativamente, Rügheimer *et al.*, 2008) a la superficie de las nanopartículas suele causar una disminución de su potencial  $\zeta$  (Ehrenberg *et al.*, 2009).

La opsonización de las nanopartículas es consecuencia de las altas afinidades de unión de inmunoglobulinas, proteínas/factores del sistema de complemento, y fibrinógeno, denominadas opsoninas, que inducen su reconocimiento por macrófagos del RES, provocando su rápida eliminación de la circulación sistémica (Leroux *et al.*, 1995; Camner *et al.*, 2002; Owens y Peppas, 2006) y su acumulación en los órganos del RES, especialmente en el hígado y el bazo (Owens y Peppas, 2006; Jain *et al.*, 2008; Edge *et al.*, 2016). En contraste, el tiempo de circulación se prolonga cuando las proteínas mayoritarias adsorbidas a las partículas son HSA o apolipoproteínas (Apos), denominadas disopsoninas (Thiele *et al.*, 2003; Ogawara *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2013). No obstante, el tiempo de circulación puede variar enormemente dependiendo no sólo de la diferencia en la composición de proteínas adsorbidas, sino también por su abundancia total y relativa. Por ejemplo, el fibrinógeno forma una monocapa cuando se

adhiera en baja concentración a la superficie de las nanopartículas, lo que lleva a una alta adhesión a plaquetas y leucocitos y, por tanto, a una rápida eliminación del sistema circulatorio. Por el contrario, cuando se une en mayor cantidad, las moléculas de fibrinógeno forman una matriz multicapa extensible por autoensamblaje a través de la interacción entre sus dominios  $\alpha C$  (Yermolenko *et al.*, 2012; Safiullin *et al.*, 2015), que disminuye dramáticamente la asociación celular de las nanopartículas en condiciones tanto estáticas como de flujo (Lishko *et al.*, 2007; Yermolenko *et al.*, 2010). Por tanto, mientras una baja concentración de fibrinógeno en la superficie de las nanopartículas puede llevar a su rápida eliminación por el RES, en mayores cantidades ofrece oportunidades para proteger a las partículas de la fagocitosis y prolongar su tiempo de circulación.

Otro parámetro físicoquímico que tiene un efecto importante en las tasas y rutas de eliminación de las nanopartículas del organismo es el tamaño (McNeil, 2009), como muestra la Figura 10. Los riñones pueden excretar partículas menores de 8 nm que, normalmente, muestran tiempos de vida media cortos ya que se filtran rápidamente de la circulación por los riñones (Choi *et al.*, 2007). Por otro lado, el hígado y el bazo pueden atrapar partículas mayores de 200 nm, que son retenidas por su estrecha malla reticular (Cataldi *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2018). Además el tamaño de las nanopartículas también influye en su capacidad de penetración en tumores sólidos, siendo más probable que las que tienen un tamaño entre 30-300 nm puedan sufrir una acumulación pasiva en el sitio del tumor a través del efecto mejorado de permeabilización y retención (EPR) (Maeda *et al.*, 2001; Iyer *et al.*, 2006), también denominado transporte pasivo. Este fenómeno se refiere a la mayor permeabilidad de la vasculatura del tumor, consecuencia de unos poros vasculares aumentados (100-780 nm) en contraste con tamaños de poro mucho más pequeños en los vasos sanguíneos del tejido sano (aproximadamente 6 nm) (Jang *et al.*, 2003). Además, normalmente, el efecto EPR se combina con un sistema de drenaje linfático disminuido o disfuncional, que reduce el aclaramiento de las partículas y permite que se acumulen en el intersticio del tumor (Boucher y Jain, 1992).

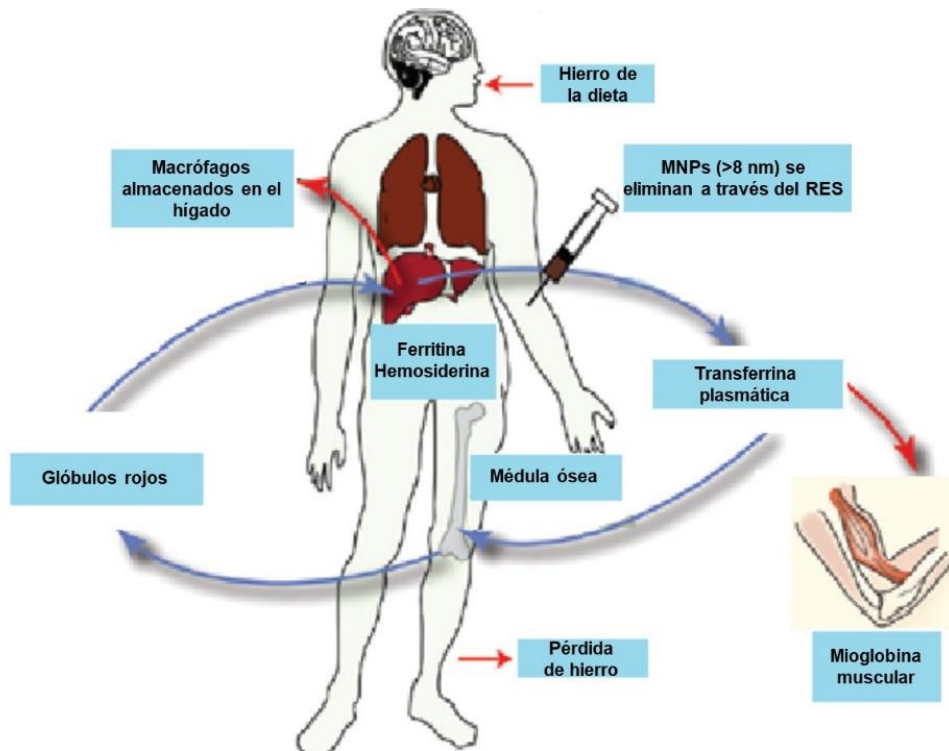


**Figura 10.** Parámetros físicoquímicos de las nanopartículas que determinan la biocompatibilidad *in vivo*. El diagrama de fase tridimensional muestra las tendencias de biocompatibilidad reveladas después del análisis *in vivo* de alrededor de 130 nanopartículas destinadas a uso terapéutico (McNeil, 2009). Las principales parámetros físicoquímicos que determinan la biocompatibilidad *in vivo* (espectro de color) son el tamaño, el potencial  $\zeta$  (carga superficial) y la dispersabilidad (particularmente el efecto de la hidrofobicidad). El rojo representa toxicidad probable, el azul seguridad probable, y el degradado azul-verde-amarillo niveles de seguridad intermedios (en el mismo orden) (modificada de Nel *et al.*, 2009).

En relación a la toxicidad de las MNPs *in vivo*, la mayoría de estudios se centran en la toxicidad a corto plazo, es decir, la que se produce en los días o semanas posteriores a la administración de las MNPs, ya que la mayoría de efectos secundarios graves se producen en el período agudo. Los efectos a largo plazo, potencialmente insignificantes en comparación, sólo han sido estudiados *in vivo* por unos pocos grupos de investigación. Tate *et al.* (2011) estudiaron la biodistribución de MNPs hasta 580 días y aunque detectaron depósitos de MNPs en hígado y bazo 14 días después de la administración, con una modesta vacuolización en el hígado, a los 580 días observaron una eliminación total de las MNPs de ambos órganos, sin diferencias histopatológicas en comparación con el grupo control. Mejías *et al.* (2011) realizaron estudios de biodistribución hasta un tiempo máximo de 3 meses, y detectaron acumulación de MNPs en hígado, pulmones, y bazo en diferentes periodos posteriores a la administración, pero transformadas en especies de Fe no tóxicas, que pueden eliminarse

por vías metabólicas fisiológicas, y no observaron modificaciones histopatológicas. Además, estos autores encontraron mayor contenido de hierro en las heces desde el día 7 hasta el día 30, lo que indica que las partículas se eliminan del organismo. Otros autores también observaron acumulación de MNPs hasta 3 meses en los pulmones debido a su naturaleza vascularizada y rica en monocitos, pero no encontraron toxicidad asociada (Chaves *et al.*, 2005; Edge *et al.*, 2016). Por otro lado, Kim *et al.*, (2006) demostraron que dosis de hasta 100 mg/kg de MNPs, dentro del rango de 50 nm, no son tóxicas tras su circulación durante un mes. Y Chen *et al.* (2012) sólo observaron toxicidad relacionada con MNPs a partir de concentraciones de 1.77 g/kg, que produjeron diarrea, reducción en el movimiento, pérdida de peso, y muerte aproximadamente 15 días después de la administración. En base a estos resultados, estos autores calcularon un valor de dosis letal para el 50% (DL<sub>50</sub>) de 5.748 g/kg.

Finalmente, en relación a la eliminación de las MNPs (>8 nm) administradas por vía intravenosa, después de su acumulación en los órganos del RES, se degrada y el hierro resultante se incorpora a diferentes procesos biosintéticos, como la producción de hemoglobina, mioglobina y diversas hormonas. Se cree que la degradación de las MNPs se produce de manera similar a la de las ferritinas a nivel molecular (Ali *et al.*, 2016; Edge *et al.*, 2016). Nissim y Robson, (1949) y Richter, (1959) demostraron la biodegradación *in vivo* de MNPs y el papel de la ferritina y la transferrina en la biodistribución de los productos de degradación. En la Figura 11 se puede observar la ruta principal en la que la degradación de las MNPs conduce a un aumento en el nivel de hierro en los órganos. Este nivel está regulado por la ferritina (también la hemosiderina, formada por agregados micelares de ferritina) y la transferrina, que forman complejos con los iones de hierro y participan en su almacenamiento y transporte a diferentes órganos (Ruiz *et al.*, 2013).



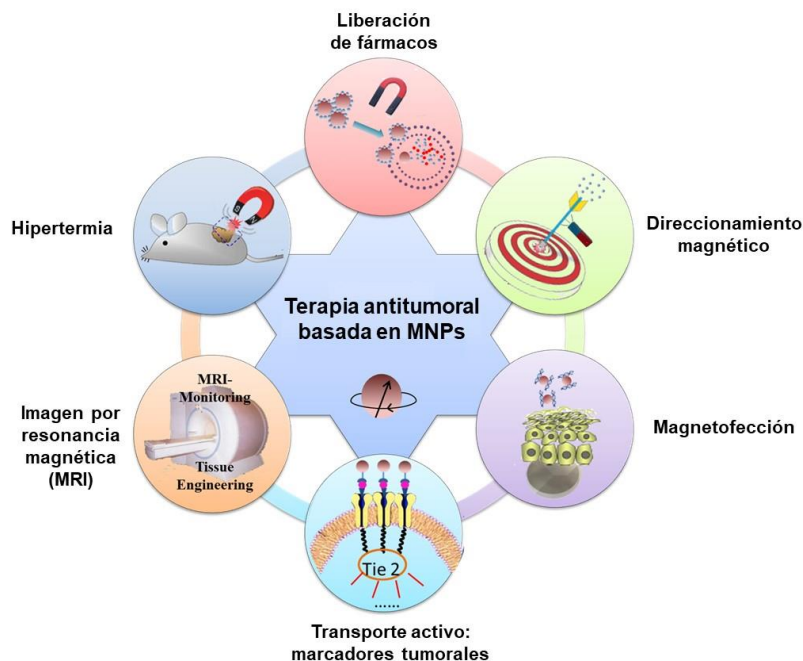
**Figura 11.** Ruta general del metabolismo, transporte, y biodegradación de las MNPs (modificada de Ali *et al.*, 2016).

## 6. Aplicaciones biomédicas antitumorales

En la actualidad, el cáncer es una de las enfermedades que más se está abordando desde enfoques nanomédicos debido a su alta incidencia, que aumentó dramáticamente durante las últimas décadas hasta convertirse en la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares (W.H.O., 2014). La Organización Mundial de la Salud ha estimado que aproximadamente 9,6 millones de personas en todo el mundo murieron de cáncer en 2018 (<https://www.who.int/cancer/en/>), y se espera que alcance más de 13 millones de muertes por año en 2030 (Strayer y Rubin, 2012). Las tres líneas principales en el tratamiento del cáncer son (1) escisión quirúrgica, (2) radioterapia, y (3) quimioterapia, dependiendo del tipo de tumor y de la etapa de su desarrollo. Para el cáncer localizado y metastatizado la quimioterapia es el tratamiento de elección, ya sea sola o en combinación con otras formas de terapia (Rang *et al.*, 2007). Sin embargo, la quimioterapia convencional tiene algunas limitaciones, como baja solubilidad de los fármacos, distribución deficiente, y falta de selectividad, que produce daño en tejidos, células y órganos sanos (Chidambaram *et al.*, 2011). Así, la administración sistémica de una alta cantidad de sustancias antitumorales determina su distribución por todo el organismo, con numerosos efectos adversos, como



cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, mielosupresión, nefrotoxicidad, etc (Carr *et al.*, 2008). Los nanomateriales pueden potencialmente superar estas limitaciones de las terapias convencionales. En general, las nanopartículas se caracterizan por presentar alta relación superficie/volumen y biorreactividad de la superficie, lo que las convierte en plataformas multifuncionales ideales para transportar diferentes fármacos a través del efecto EPR y el transporte activo mediante su funcionalización con ligandos (Sau *et al.*, 2018). Entre las diferentes nanopartículas utilizadas en aplicaciones biomédicas antitumorales, las MNPs se están aplicando cada vez más para diferentes usos (Figura 12), como liberación de fármacos mediante orientación magnética (Dobson, 2006; Sun *et al.*, 2008; Shubayev *et al.*, 2009; El-Boubbou, 2018a), como agentes de hipertermia (Ortega y Pankhurst, 2013; Alphandéry *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012; Obaidat *et al.*, 2015; Datta *et al.*, 2016), en ingeniería de tejidos y terapia de reemplazo celular (Bulte *et al.*, 2001), en suimienta celular y bioseparación (Weissleder *et al.*, 2000; Gupta y Gupta, 2005), y como agente de contraste en imagen por resonancia magnética (MRI; Lisy *et al.*, 2007).



**Figura 12.** Ilustración esquemática de terapias antitumorales basadas en MNPs (modificada de Jing *et al.*, 2013).

A continuación se detallan las aplicaciones antitumorales basadas en MNPs de mayor relevancia para esta Tesis Doctoral:

### **6.1. Transporte activo: marcadores tumorales**

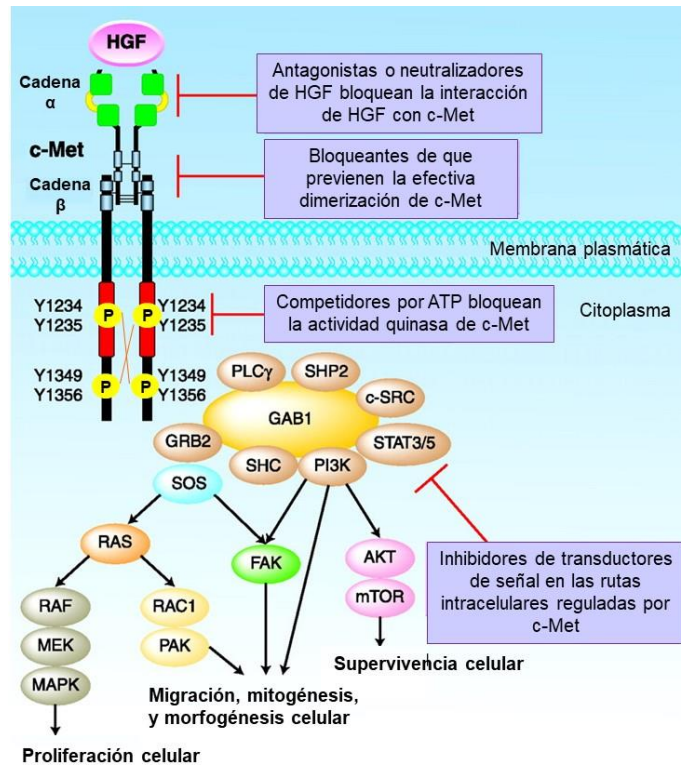
A diferencia de la falta de especificidad del efecto EPR o transporte pasivo, el transporte activo utiliza ligandos, es decir, moléculas capaces de reconocer una diana biológica específica (pueden ser anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos, etc), que se unen específicamente a receptores de superficie sobreexpresados en las membranas de células tumorales diana (Lammers *et al.*, 2008). Se ha investigado la funcionalización de las nanopartículas con estos ligandos para promover el suministro de las nanopartículas a una población celular específica y/o para controlar el tráfico intracelular de los nanotransportadores. Esta estrategia de "direccionamiento molecular" se basa en la idea de que los nanotransportadores que llevan ligandos se internalizarán a través de la misma vía que el ligando solo (Hillaireau *et al.*, 2009). En este sentido, el ácido fólico (Hilgenbrink y Low, 2005) o la transferrina (Sahoo y Labhasetwar, 2005) han sido ampliamente estudiados, especialmente para estrategias contra el cáncer (Chavanpatil *et al.*, 2006), ya que sus receptores celulares están sobreexpresados en la superficie de células tumorales, mientras que su presencia es reducida en tejidos normales (Weitman *et al.*, 1992; Qian *et al.*, 2002). Por tanto, los nanotransportadores funcionalizados con estas moléculas presentan una mayor internalización a través de endocitosis mediada por receptor, ya que todo el complejo (incluido la nanopartícula) se internaliza en la célula (Kirui *et al.*, 2010). Los ligandos de las moléculas de adhesión celular (CAM), como los péptidos RGD (Schiffelers *et al.*, 2003), también se han utilizado para atacar células tumorales con expresión incrementada de integrinas CAM específicas. Otros péptidos de interés son aquellos que penetran en células, también conocidos como dominios de transducción de proteínas, debido a su capacidad para translocarse a través de las membranas (Torchilin, 2008). Existen numerosos antígenos sobreexpresados en células tumorales, que pueden ser atacados de esta manera, como CD44 (proteína de la superficie celular con distintas isoformas, algunas presentes solo en células cancerosas específicas) (Senbanjo y Chellaiah, 2017), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata) (Chang *et al.*, 1999), mesotelina (Liu *et al.*, 2016), mHSP70 (Shevtsov *et al.*, 2015), etc. Por tanto, la decoración de nanotransportadores con ligandos ofrece una gran versatilidad para consuir su internalización en poblaciones celulares específicas.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) fueron de los primeros agentes utilizados para dirigir nanotransportadores a antígenos de superficie de tipos celulares específicos (Steinhauser *et al.*, 2006). Esto es debido a que, como agentes de direccionamiento, los mAbs tienen una selectividad y una afinidad de unión extremadamente altas gracias a la presencia de dos sitios de unión a epítipo en una sola molécula (Yu *et al.*, 2012). El primer anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un antígeno tumoral específico se desarrolló en 1975 (Kohler y Milstein 1975), pero el potencial papel de los mAbs en la terapia del cáncer no se exploró hasta casi 20 años después (Beduneau *et al.*, 2007). El Rituxan® fue el primer mAb aprobado en 1997 por la Administración de Medicamentos y Alimentos (F.D.A, 1997) para el tratamiento del linfoma de células B de bajo grado. En la actualidad, existen varios mAb aprobados por la F.D.A. para su uso clínico como terapia antitumoral, y hay cientos de ellos en ensayos clínicos (Chiavenna *et al.*, 2017). Entre las diferentes dianas potenciales para el transporte activo de nanopartículas mediado por mAbs, el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor de transferrina (TfR), y el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) han sido ampliamente investigados (Bazak *et al.*, 2015). Otro candidato, también muy estudiado por diferentes autores (Gherardi *et al.*, 2012; Prat *et al.*, 2014; Mo y Liu, 2017; Matsumoto *et al.*, 2017; Bouattour *et al.*, 2018), es el receptor tirosina quinasa c-Met, también denominado receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (RHGF), que se analizará en detalle en la siguiente sección.

### 6.1.1. Met/RHGF

Met/RHGF es un protooncogén que codifica un receptor tirosina quinasa Met para el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Bladt *et al.*, 1995; Sattler *et al.*, 2007). c-Met es una glucoproteína transmembrana que consiste en un heterodímero compuesto por una cadena  $\alpha$  (50 kDa) y una cadena  $\beta$  (145 kDa) unidas por enlaces disulfuro (Sierra y Tsao, 2011). Presenta una gran región extracelular, un segmento transmembrana y un dominio de tirosina quinasa intracelular. c-Met es el único receptor conocido de alta afinidad a HGF y se expresa ampliamente en células de origen epitelial-endotelial, incluyendo las células hepáticas, fibroblastos, células hematopoyéticas y queratinocitos (Naran *et al.*, 2009). La unión específica de HGF produce la dimerización y transfosforilación de c-Met, que a su vez activa distintas vías de señalización posteriores, que se fosforilan y activan sucesivamente (Scagliotti *et al.*,

2013) (Figura 13). Las reacciones de fosforilación en forma de cascada amplifican la señal paso a paso y, finalmente, la ruta de c-Met desencadena diversas respuestas celulares, que incluyen migración celular, mitogénesis, morfogénesis, proliferación, angiogenesis y protección contra la apoptosis (Prat *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2003; Eder *et al.*, 2009) (Figura 13). La expresión aberrante de Met se observa en diferentes neoplasias malignas, particularmente en carcinoma pulmonar no microcítico, tumor carcinoide gastrointestinal y carcinoma hepatocelular (Ichimura *et al.*, 1996; Siegfried *et al.*, 1998; Goyal *et al.*, 2013; Hack *et al.*, 2014), pero también en muchos otros tipos de cáncer ([www.vai.org/met](http://www.vai.org/met)). Varios mecanismos pueden hacer al receptor c-Met oncogénico, como mutaciones puntuales (Schmidt *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2008), sobreexpresión como consecuencia de amplificación génica o desregulación postranscripcional (Giordano *et al.*, 1989; Ruco *et al.*, 2001), o por activación inadecuada inducida por mecanismos autocrinos o paracrinos dependientes del ligando (Comoglio *et al.*, 2008). Además, varios autores (Olivero *et al.*, 1996; Cortesina *et al.*, 2000) han demostrado correlación entre el nivel de expresión de Met y la progresión de las metástasis. Por tanto, la activación Met en tumores malignos humanos hace que estas moléculas sean dianas atractivas para diferentes fármacos (Comoglio *et al.*, 2008; Eder *et al.*, 2009; Gherardi *et al.*, 2012). Se han desarrollado inhibidores de tirosina quinasa de bajo peso molecular, que antagonizan de manera competitiva al receptor, al ocupar el sitio de unión de ATP intracelular, impidiendo así su fosforilación, activación y señalización corriente abajo (Eder *et al.*, 2009) (Figura 13). Los mAbs anti-Met están adquiriendo cada vez más importancia, y están siendo evaluados en ensayos clínicos (Martin *et al.*, 2014; Prat *et al.*, 2014; Kim y Kim, 2017). Algunos de ellos inducen la regulación negativa de Met promoviendo la internalización y degradación del receptor, lo que interfiere con el reciclaje del receptor en la superficie celular. Otros inhiben la dimerización y, por lo tanto, la activación de c-Met, compitiendo con HGF para unirse al receptor y bloquearlo (Eder *et al.*, 2009) (Figura 13).



**Figura 13.** Principales vías de señalización y respuestas celulares que se activan a través de c-Met, y estrategias de inhibición de la señalización de c-Met (modificada de Eder *et al.*, 2009).

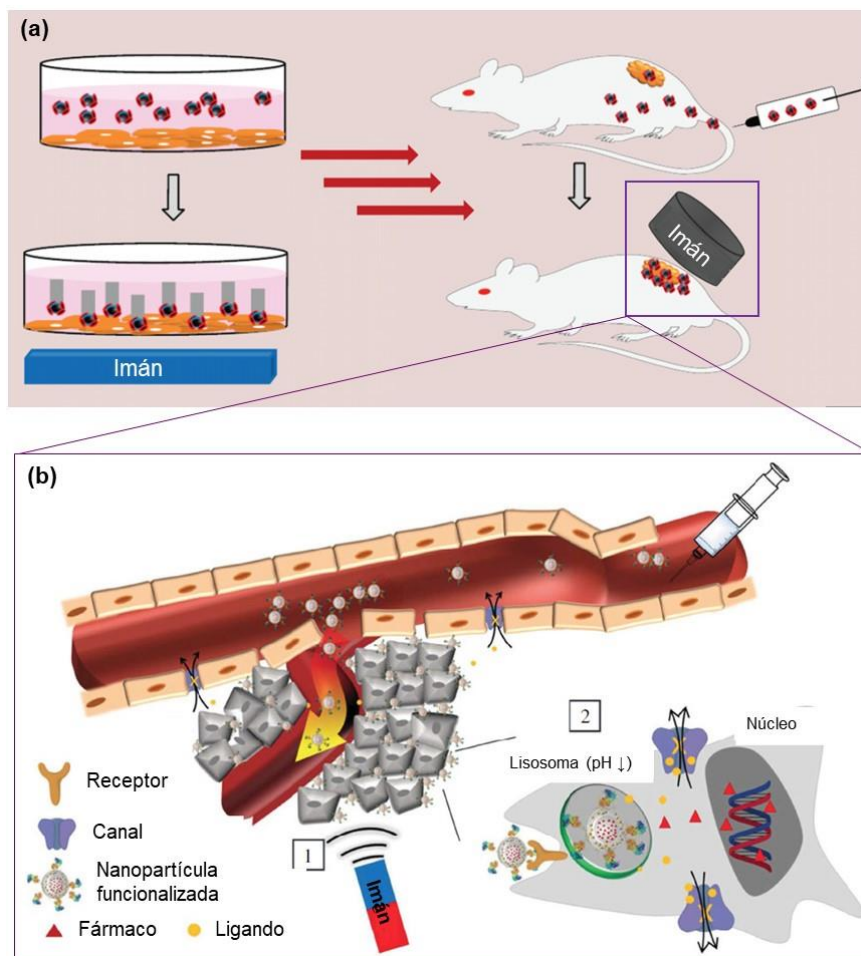
El transporte activo de estos anti-Met mAbs mediante nanopartículas, que son relativamente más grandes en comparación con los mAbs, ha demostrado una mayor penetración y retención en tumores sólidos, así como una farmacocinética, estabilidad, y vida media *in vivo* mejoradas (Sifniotis *et al.*, 2019). Esta estrategia se aplicó a mAbs, que reconocen el fragmento variable de cadena única (scFv) de Met, unidos a liposomas PEGilados (Lu *et al.*, 2011) y con el mAb DO-24, que reconoce la region PSI-IPT-1 del ectodominio de Met (Prat *et al.*, 2014), acoplado a nanocristales de hidroxapatita (Iafisco *et al.*, 2013). Estos autores observaron que los nanotransportadores se internalizaban de manera eficiente en células que expresan Met, donde el fármaco quimioterapéutico doxorubicina (DOXO), que tenían adsorbido o encapsulado, era liberado para después translocarse al núcleo, donde ejerce su toxicidad.

## 6.2. Orientación magnética

A diferencia de otras nanopartículas, las MNPs tienen propiedades de orientación únicas gracias a su respuesta a un campo magnético externo. Después de exponerse a un campo magnético externo, las MNPs pueden magnetizarse, transportarse magnéticamente, y concentrarse en un sitio diana específico (Figura 14) (Dobson, 2006). Después de la administración intravenosa de las MNPs, las fuerzas ejercidas sobre las partículas por el vaso sanguíneo y las fuerzas magnéticas determinan el destino de las nanopartículas. Cuando las fuerzas magnéticas exceden las tasas de flujo sanguíneo en las arterias (10 cm/s) o capilares (0.05 cm/s), las MNPs quedan retenidas en el sitio diana y pueden ser internalizadas por las células endoteliales del tejido diana (Medeiros *et al.*, 2011). La estrategia de orientación local magnética reduce la distribución sistémica de las nanopartículas, disminuyendo en consecuencia la dosis requerida, eliminando posibles efectos secundarios asociados con altas concentraciones de partículas, y disminuyendo su aclaramiento por el RES (Widder *et al.*, 1983; Chunfu *et al.*, 2004).

La orientación magnética se desarrolló por primera vez en 1963, cuando Meyers *et al.* (1963) acumularon partículas magnéticas de hierro en la vena de la pata de un perro mediante la aplicación de un imán de herradura, seguido de trabajos similares en las décadas posteriores (Widder *et al.*, 1983; Driscoll *et al.*, 1984; Gupta *et al.*, 1989). Sin embargo, estos avances se detuvieron hasta el desarrollo de las MNPs, que mostraron mayor susceptibilidad magnética que los materiales magnéticos previamente utilizados. Cheng *et al.* (2012) descubrieron que al colocar un imán cerca de un tumor, las MNPs migraban hacia el tumor tras su inyección intravenosa, con una acumulación aproximadamente 8 veces mayor en el tumor de la que ocurriría sin la orientación magnética. Este proceso controlado de forma remota y no invasiva es único y altamente efectivo, debido a su excelente penetración en el tejido (Wang y Kohane, 2017), y se puede utilizar para la administración de fármacos y otras moléculas *in vivo*, así como para la magnetofección celular *in vitro* (Figura 14). Como ya se ha explicado en la sección 3., los principales problemas de la administración de fármacos quimioterápicos provienen de su baja solubilidad, distribución deficiente y, especialmente, falta de selectividad, lo que conlleva una alta citotoxicidad y efectos secundarios graves (Carr *et al.*, 2008; Chidambaram *et al.*, 2011). Para minimizar estos inconvenientes de los fármacos convencionales y mejorar su localización en el área diana, se ha explorado la fuerza magnética mediante la utilización de un imán permanente implantado

internamente o aplicado externamente. Este método se remonta a 1978, cuando fue informado por Widder *et al.* (1978). Desde entonces, se han producido gran cantidad de trabajos con el objetivo de lograr una alta concentración de fármaco en el área afectada, con un tiempo de respuesta rápido, y efectos secundarios mínimos mediante la aplicación del campo magnético, entre los que se incluyen la administración de fármacos a tumores de pulmón (El-Sherbiny *et al.*, 2017); próstata (Struss *et al.*, 2017), cerebro (Cole *et al.*, 2011), melanoma, (Dandamudi y Campbell 2007), mama (Zhang *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2010), e hígado (Alexiou *et al.*, 2000, 2003).



**Figura 14.** Influencia de un campo magnético externo sobre MNP's funcionalizadas (a) *in vitro* en una placa de Petri (izquierda) e *in vivo* en modelo animal (derecha) (modificada de El-Boubbou *et al.*, 2018b), junto con (b) la ampliación del capilar, las células tumorales y el interior celular (modificada de Ye *et al.*, 2017).

### 6.3. Hipertermia mediada por campo magnético alterno

El efecto curativo del calor es bien conocido desde la antigüedad. En una de las primeras publicaciones científicas sobre este tema, Busch (1866) observó que el crecimiento del cáncer cesaba a temperaturas superiores a 42 °C. Esto es debido a que las células tumorales poseen una mayor sensibilidad al calor en comparación con las células sanas, que pueden tolerar esas temperaturas (Chatterjee *et al.*, 2011). Hoy en día, la producción de hipertermia en el tejido tumoral es una terapia aprobada para el cáncer (Falk *et al.*, 2001; Wust *et al.*, 2002), y se define como un aumento de la temperatura local en los tumores con el objetivo de lograr un daño selectivo del tejido tumoral. Este calentamiento se puede lograr por varios mecanismos físicos (microondas, ondas de radio, ultrasonido u ondas infrarrojas), pero estas técnicas pueden provocar efectos secundarios dañinos como la ionización del material genético o la falta de selectividad en las terapias de radiación y microondas que causan efectos secundarios dañinos en los tejidos sanos circundantes (El-Boubbou *et al.*, 2018b). En este sentido, la hipertermia magnética, es decir, la ejercida por MNPs en presencia de un campo magnético alterno (AMF) mejora su precisión, ya que se incorpora la fuente de calor, es decir, las MNPs en el tejido del tumor (Dutz y Hergt, 2013). La hipertermia magnética está resultando exitosa en ensayos clínicos (ClinicalTrials.gov., Magnetic hyperthermia, 2019) y en 2010 la F.D.A. aprobó la utilización de MNPs recubiertas de aminosilano para el tratamiento de hipertermia en glioblastoma (Tabla 1).

Cuando los materiales magnéticos se exponen a un campo magnético externo, su magnetización sufre un bucle cerrado durante la inversión de la orientación: el bucle de histéresis, que se ha explicado en la sección 1.2. del apartado I (Figura 3b). El área dentro del bucle mide la energía magnética suministrada en forma de calor al material magnético durante la reversión de la magnetización. La conversión de la energía en calor es causada por el acoplamiento de los momentos magnéticos atómicos en la red cristalina (Dutz y Hergt, 2013). El potencial de calentamiento depende en gran medida del tamaño del núcleo del óxido de hierro, la distribución de tamaños, la morfología de las partículas, la estructura cristalina del óxido de hierro, el medio, y de parámetros magnéticos como la anisotropía (Grüttner *et al.*, 2013). Las partículas de un solo dominio magnético con anisotropía suelen mostrar la mayor cantidad de energía de histéresis (Stoner *et al.*, 1948). Se ha demostrado que partículas con diámetros <50 nm exhiben las mayores tasas de calentamiento (Rosensweig, 2002; Kawashita *et al.*, 2005; Giustini *et al.*, 2010). Hergt *et al.* (2006) estudiaron la dependencia de la tasa de



calentamiento con la morfología y el tamaño medio de las partículas en un amplio rango de tamaños, desde partículas superparamagnéticas a múltiples dominios, y magnetosomas bacterianos. Las MNPs con un tamaño medio de 18 nm y una estrecha distribución de tamaños se identificaron como las óptimas para aplicaciones de hipertermia. En partículas de dominios magnéticos múltiples, la inversión de la dirección de magnetización tiene lugar a través del desplazamiento de la pared de cada dominio y, por ello, la energía de histéresis es comparativamente baja (Dutz y Hergt, 2013).

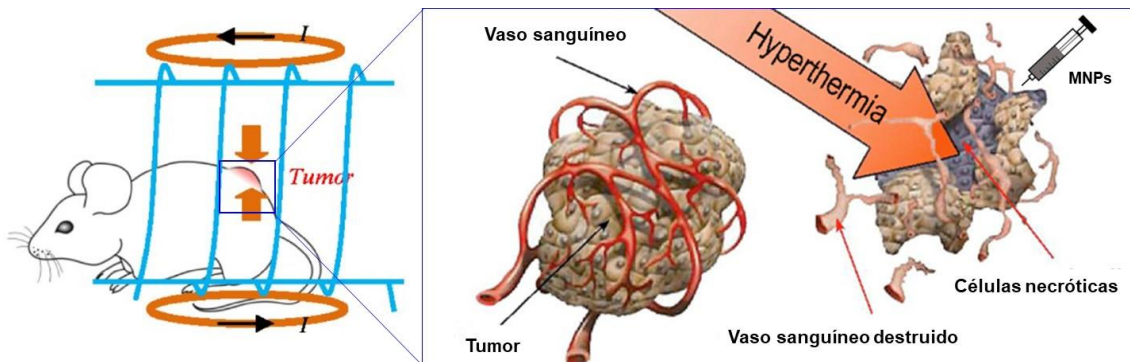
La medida común de la velocidad de calentamiento, denominada “tasa de absorción específica” (SAR) o “potencia de pérdida específica” (SLP), es la pérdida de potencia por unidad de masa del material magnético involucrado:

$$SAR [Wg^{-1} \text{ óxido de hierro}] = \frac{m_{muestra}}{m_{\text{óxido de hierro}}} \times C_m \times \frac{\Delta T}{\Delta t}$$

donde  $C_m$  es la capacidad calorífica específica del medio,  $m_{muestra}$  y  $m_{\text{óxido de hierro}}$  son las masas de la muestra total y de la que corresponde solamente al material magnético, respectivamente, y  $\Delta T$  es el aumento de temperatura durante el intervalo de tiempo  $\Delta t$  (Verges *et al.*, 2008). Además, Kallumadil *et al.* (2009) introdujeron el término de "potencia de pérdida intrínseca" (ILP) para hacer comparables los datos SAR de diferentes grupos. La ILP se define como el SAR normalizado por la fuerza de campo al cuadrado ( $H^2$ ) y la frecuencia ( $f$ ), asumiendo una dependencia del SAR en estos parámetros:  $IL = SAR/H^2f$ .

Desde el punto de vista biológico, después de inyectar las MNPs en el tumor, son internalizadas por las células tumorales, recubiertas por vesículas, y transferidas a los lisosomas. El aumento de la temperatura producido por las MNPs bajo la influencia de un AMF provoca cambios en la permeabilización de la membrana lisosomal o la destrucción inmediata de los lisosomas (Domenech *et al.*, 2013; Sanchez *et al.*, 2014). En estas condiciones, factores de los lisosomas, como la quimotripsina y la catepsina, se liberan al citoplasma y activan la apoptosis celular (Roberg *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2010). Por otra parte, el calor generado por las MNPs en contacto con la membrana plasmática, tanto interna como externamente, puede alterar la estructura de la membrana directamente, produciendo necrosis celular (Guardia *et al.*, 2012). Por encima de 42 °C también los vasos tumorales pueden colapsar, atrapando el calor aplicado y dando lugar a necrosis o apoptosis (Spirou *et al.*, 2018) (Figura 15). Además del daño térmico en las

células tumorales, existen observaciones de efectos dañinos "no térmicos" (Kim *et al.*, 2010), que muestran que las nanopartículas magnéticas que oscilan bajo la influencia del AMF pueden inducir daño mecánico en el interior de la célula. Este daño celular se observó a bajas frecuencias ( $<100$  Hz), donde se pueden excluir los efectos térmicos.



**Figura 15.** (a) Aplicación de un campo magnético alterno externo para la producción de hipertermia *in vivo*, en la que el ratón se coloca dentro de la bobina solenoide (color azul) con el tumor colocado en el centro de la bobina (máxima intensidad de campo) (modificada de Zhao *et al.*, 2012), y (b) ampliación del tumor antes y después de la aplicación del campo magnético alterno (modificada de El-Boubbou *et al.*, 2018b).

#### 6.4. Liberación de fármacos mediante estímulos

Para garantizar la liberación de un fármaco en el sitio diana, una buena estrategia es el uso de nanopartículas que experimentan cambios en las propiedades del material cuando se exponen a diferentes estímulos (Cheng *et al.*, 2013; Karimi *et al.*, 2016a; Wei *et al.*, 2017). Se han utilizado muchos estímulos diferentes para diseñar nanopartículas sensibles, incluidos la temperatura, la luz, el pH o las condiciones redox. Estos estímulos presentan ciertas ventajas, como que las moléculas terapéuticas estén protegidas de la degradación prematura en el organismo antes de alcanzar su diana, y también permiten un mayor control del tiempo, es decir, que estas moléculas estén activas en el momento deseado (Moros *et al.*, 2019). Las nanopartículas que responden al pH han generado gran interés debido a la disminución de pH ( $\approx$  pH 5.8) que se produce en las regiones extracelulares alrededor del tumor como consecuencia de la desviación del metabolismo hacia la producción de ácido láctico de las células tumorales (Guo *et al.*, 2008). Este pH ácido también se encuentra intracelularmente en el compartimento endosomal temprano ( $\approx$  pH 6.5) y en el compartimento lisosomal maduro ( $\text{pH} \leq 5$ ) (Such *et al.*, 2015) (Figura 14b). En este contexto, las nanopartículas

pueden diseñarse para responder al pH cambiando la química de su superficie, su tamaño o su forma. Y este cambio en las propiedades de las nanopartículas se puede utilizar para ajustar la captación celular y para controlar la liberación de las moléculas terapéuticas (Deirram *et al.*, 2019). Además, las nanopartículas que responden al pH también han demostrado la capacidad de atravesar la membrana endosomal/lisosomal (Selby *et al.*, 2017), asurando así un suministro más eficiente a las regiones de la célula donde los agentes terapéuticos son más activos, por ejemplo, el núcleo. Una estrategia simple y efectiva para diseñar materiales sensibles al pH es utilizar polímeros o fármacos que cambian la carga y/o hidrofiliicidad en función de su  $pK_a$  y del pH del entorno (Deirram *et al.*, 2019). Cuando estas moléculas presentan grupos básicos o ácidos ionizables, como  $\text{COO}^-$  o  $\text{R-NH}_2$ , pueden ganar o perder protones en respuesta a variaciones del pH local (Dalwadi y Patel, 2015; Karimi *et al.*, 2016b; Cinay *et al.*, 2017). Comúnmente se utilizan polímeros/fármacos catiónicos, que cambian de hidrofóbicos a cargados positivamente/hidrofílicos cuando el pH disminuye, o polímeros/fármacos aniónicos que cambian de negativos/hidrofílicos a hidrofóbico a medida que disminuye el pH (Deirram *et al.*, 2019).

Recientemente, se han desarrollado nuevos enfoques de liberación de fármacos combinando estos estímulos externos con hipertermia magnética para el tratamiento del cáncer, que van un paso más allá que la hipertermia magnética tradicional (Mertz *et al.*, 2017). En lugar de utilizar únicamente la generación de calor para inducir la muerte celular, combinan el aumento de temperatura y la rotación de las nanopartículas para desencadenar la liberación o la activación de moléculas terapéuticas, produciendo de esta manera un efecto sinérgico entre la hipertermia generada y la quimioterapia liberada (Issels, 2008). Además, el aumento de temperatura puede hacer que las células tumorales sean más sensibles a algunas moléculas terapéuticas (Hahn, 1979; van der Zee, 2002). Este doble tratamiento ha sido efectivo con diferentes materiales magnéticos, por ejemplo magnetita recubierta por polímeros termosensibles (Soares *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2017) u otros polimeros (Quinto *et al.*, 2015; Iglesias *et al.*, 2017, 2018)

### 6.5. Nanopartículas magnéticas en ensayos clínicos y comercializadas

Actualmente hay 167 ensayos clínicos en desarrollo que implican el uso de nanopartículas de óxidos de hierro (ClinicalTrials.gov., Iron oxides, 2019), de los cuales 20 específicamente son magnéticas (ClinicalTrials.gov., Magnetic nanoparticles, 2019), y gran parte de ellas se están estudiando como reactivos de mejora del contraste para imagen por resonancia magnética (MRI) ya que, como se ha explicado en la sección 2.2., tienen baja toxicidad y, por lo general, son biodegradables. Entre ellos, Ferucarbotran (Resovist®/Cliavist™) ha sido aprobado por la F.D.A., y Ferumoxytol (Feraheme®/Rienso®), ya aprobada por la F.D.A. para la anemia asociada a insuficiencia renal crónica, también se está estudiando como agente de contraste en numerosos ensayos clínicos (ClinicalTrials.gov., Ferumoxytol in MRI, 2019). Sin embargo, la mayoría de las nanoformulaciones de óxido de hierro aprobadas por la F.D.A. están indicadas como terapias de reemplazo de hierro (Tabla 1). Estas nanoformulaciones contienen un núcleo de óxido de hierro recubierto con polímeros hidrófilos, por ejemplo dextrano o sacarosa, que permiten que el hierro se disuelva lentamente después de la inyección intravenosa. El uso de esta formulación permite la administración rápida de grandes dosis sin un aumento en los niveles de hierro en la sangre, evitando la toxicidad (Bobo *et al.*, 2016).

Además, como también se ha explicado en esta sección, las MNPs pueden responder eficientemente a un campo magnético externo y funcionalizarse para alcanzar dianas tumorales específicas. Por ello, estas nanopartículas están siendo investigadas cada vez más como sistemas de administración de fármacos (Prasad *et al.*, 2018; El-Boubbou *et al.*, 2018a, b) y ya se han completado los ensayos clínicos para algunas de ellas (ClinicalTrials.gov., MTC-Dox, 2019) (Tabla 1).

Otra aplicación relevante para las MNPs, explicada en la sección 3.3. de este apartado, se refiere a su capacidad para liberar energía cuando se exponen a un AMF, que les permite ser utilizadas como agentes de hipertermia (Dutz y Hergt, 2013). Actualmente hay 108 ensayos clínicos donde se están estudiando MNPs como agentes de hipertermia (ClinicalTrials.gov., Magnetic hyperthermia, 2019). Por el momento, Nanotherm® (MagForce), que utiliza nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) recubiertas de aminosilano para el tratamiento de hipertermia local de glioblastomas ha sido la única aprobada por la F.D.A. (Tabla 1). Después de la inyección de Nanotherm® directamente en el tumor, se aplica un AMF para calentar selectivamente las partículas que, a su vez, producen el calentamiento local del

microentorno del tumor a 40–45 °C, lo que causa apoptosis y necrosis celular ([https://www.magforce.com/en/home/our\\_therapy/](https://www.magforce.com/en/home/our_therapy/)).

**Tabla 1.** Nanofármacos basados en óxidos de hierro aprobadas por la F.D.A. o para los que se han completado los ensayos clínicos.

Producto	Formulación	Indicación	Estado	Año
INFed®	Dextrano de hierro	Anemia asociada a insuficiencia renal crónica	Aprobado por F.D.A., Sanofi Aventis	1976
Ferrlecit®	Complejo de gluconato férrico de sodio en sacarosa	Anemia	Aprobado por F.D.A., R & D Laboratories	1999
Venofer®	Sacarosa de hierro	Anemia asociada a insuficiencia renal crónica	Aprobado por F.D.A., Luitpold Pharmaceuticals	2000
Ferucarbotran (Resovist®, Cliavist™)	Óxido de hierro recubierto por carboxidextrano	Agente de contraste para resonancia de hígado/bazo	Aprobado por F.D.A., Bayer Schering Pharma	2003
Ferumoxytol (Feraheme® /Rienso®)	Óxido de hierro recubierto por poliglucosa sorbitol carboximetiléter	Anemia asociada a insuficiencia renal crónica	Aprobado por F.D.A., AMAG Pharmaceuticals	2009
NanoTherm®	Óxido de hierro recubiertas de aminosilano	Hipertermia magnética en glioblastoma	Aprobado por F.D.A., MagForce	2010
MTC-Dox	Hierro metálico y carbón activado	Transporte magnético para liberación dirigida de fármacos	Ensayo clínico	Completado

### III. Potencial de las nanopartículas magnéticas en nanorremediación de agua contaminada por metales pesados

La contaminación del ambiente, especialmente la del agua, representa un problema mundial de suma importancia que debe abordarse lo antes posible. La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor del 3,1% de las muertes en todo el mundo, que suponen más de 1,7 millones de muertes al año, son causadas por el acceso insuro o inadecuado al agua (W.H.O., 2015). La rápida urbanización e industrialización ha conducido a la descarga de contaminantes tóxicos que producen un elevado impacto perjudicial en los recursos bióticos (Muchuweti *et al.*, 2006; Kim y Aga, 2007; Khan *et al.*, 2008). Jadhav *et al.* (2013) mostraron la existencia de restos de pesticidas, aceites y grasas, metales pesados, y otros químicos tóxicos en acuíferos. Kale *et al.*, 2010 analizaron parámetros fisicoquímicos del agua subterránea y también encontraron altas concentraciones de metales pesados, incluyendo Al, Cd, Cr, Fe, Zn, Ni y Pb. Los metales pesados presentan una distribución generalizada, no son biodegradables, y son tóxicos incluso en bajas concentraciones (Adriano, 2001; Elouear *et al.*, 2008). El límite en agua de consumo establecido por la Organización Mundial de la Salud es muy bajo, estableciendo un máximo de 2 ppm para el Cu, y aún más bajo para el Pb (0,01 ppm), al que considera la primera de las diez sustancias químicas que más preocupan en la salud pública (W.H.O., 2017) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Concentración límite de metales pesados en aguas de consumo (modificada de la W.H.O., 2017, 2018).

Metal pesado	Límite en agua de consumo (ppm)
Al	0,2
As	0,01
Cd	0,003
Cr	0,05
Cu	2
Pb	0,01
Mn	0,1
Hg	0,006
Zn	0,5
Ni	0,07

La mayoría de las estrategias de tratamiento de agua convencionales son eficientes, pero presentan limitaciones e inconvenientes importantes (Thekkudan *et al.*, 2016) que hacen necesaria la búsqueda de métodos alternativos. En este sentido, la nanotecnología está siendo ampliamente investigada debido a que parece mejorar la

eficacia general de los métodos de prevención, detección, monitoreo, y remediación de contaminantes mediante la aplicación de partículas a nanoescala, es decir, a través de la nanorremediación (Rajan, 2011; Rickerby y Morrison, 2007). Varios estudios e informes comerciales han destacado los beneficios de la nanotecnología para remediación ambiental (Zhang, 2003; Macé *et al.*, 2006; Ghasemzadeh *et al.*, 2014; Thatai *et al.*, 2014).

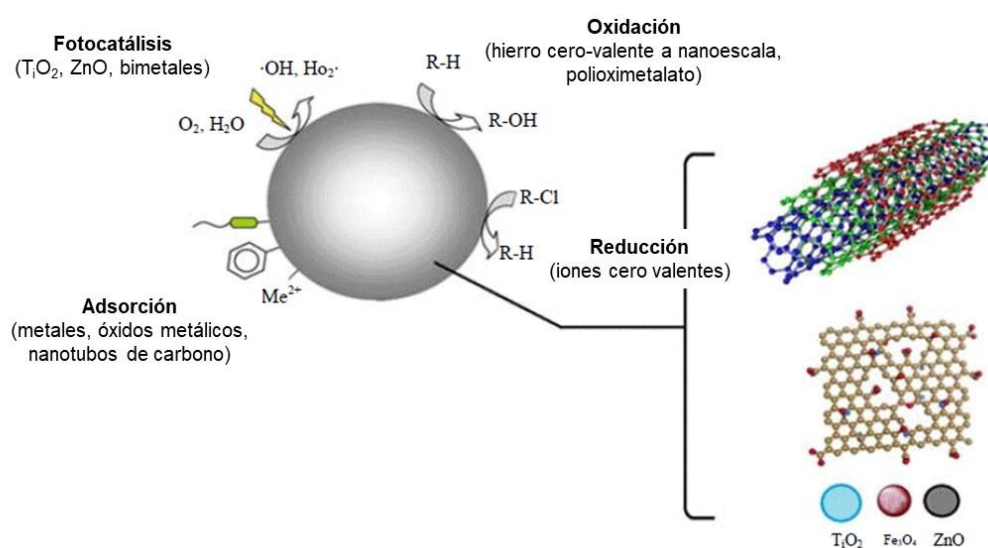
### 3. Métodos para la eliminación de contaminantes del agua

En las últimas décadas, se han establecido varios métodos para la eliminación de distintos contaminantes del agua y, concretamente, de metales pesados. Los más comúnmente empleados son la precipitación química (Fu *et al.*, 2012), el intercambio iónico (Dąbrowskia *et al.*, 2004), la ósmosis inversa (Chan y Dudeney 2008), la filtración por membrana (Song *et al.*, 2011), y el tratamiento electroquímico (Gupta *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de su alta eficiencia, estos tratamientos convencionales presentan una serie de limitaciones, como son la formación de residuos tóxicos que deben ser tratados posteriormente, la alta sensibilidad al pH de la solución, problemas de corrosión, falta de eficacia cuando la concentración del contaminante es baja y, además, algunos de los procesos no son económicamente viables, lo que hace que el proceso de eliminación sea improductivo (Dąbrowski *et al.*, 2004; Fu y Wang, 2011; Thekkudan *et al.*, 2016).

Métodos alternativos, como la biorremediación mediada por microorganismos o plantas (fitorremediación), presentan ventajas en relación a los métodos convencionales, como su bajo coste energético, su alta relación beneficio/coste, su capacidad de regeneración y, además, son respetuosos con el ambiente. Sin embargo, cuando las concentraciones de metales son muy altas, resultan tóxicas o letales para los microorganismos utilizados en biorremediación y, además, solo se produce cuando las condiciones ambientales permiten el crecimiento y la actividad de la cepa empleada (Jacob *et al.*, 2018). Las plantas utilizadas en fitorremediación suelen presentar mayor tolerancia a los metales, pero necesitan mucho tiempo para la remediación (Tangahu *et al.*, 2011). En este sentido, la nanorremediación presenta un gran potencial para abordar algunos de los desafíos de la biorremediación, mejorando la eficiencia general de los procesos, como se explicará a continuación.

### 3.1. Nanorremediación

La nanorremediación describe el uso de nanopartículas en el tratamiento de aguas subterráneas y suelos contaminados. Dependiendo de las propiedades de las diferentes partículas, los procesos de nanorremediación generalmente implican transformaciones fotocatalíticas, reacciones redox, adsorción o su combinación (Lee *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015) (Figura 16). Aunque las nanopartículas se definen generalmente como partículas con dimensiones inferiores a 100 nm (Rauscher *et al.*, 2015), en la práctica la nanorremediación puede aplicarse a partículas/materiales más grandes, por ejemplo compuestos o materiales híbridos que incluyan actividades en dimensiones a nanoescala. Se han desarrollado una gran variedad de nanomateriales eficientes, rentables, y ecológicos con funcionalidades únicas para su potencial aplicación en la desintoxicación de efluentes industriales, aguas subterráneas, aguas superficiales, y agua potable (Brumfiel, 2003; Theron *et al.*, 2008). Entre ellos, las nanopartículas más utilizadas son principalmente metales u óxidos metálicos, con mayor frecuencia hierro cero-valente a nanoescala, zeolitas a nanoescala, nanotubos de carbono y fibras, y nanopartículas bimetalicas (Gupta *et al.*, 2015) (Figura 16).



**Figura 16.** Procesos relevantes para la eliminación de metales pesados mediante nanorremediación (modificada de Gupta *et al.*, 2015).



### **3.1.1. Nanoadsorbentes**

La nanoadsorción describe un grupo de procesos que incluyen reacciones de adsorción y precipitación combinadas con partículas de escala nanométrica (Babel y Kurniawan, 2003; Gupta *et al.*, 2015; Thekkudan *et al.*, 2016). Recientemente, la nanoadsorción se ha convertido en una de las técnicas alternativas más adecuada para el tratamiento de aguas contaminadas por metales pesados, debido a su alta eficiencia de eliminación, incluso de trazas de iones metálicos, como consecuencia de su alta capacidad de adsorción (Savage y Diallo, 2005; Cloete, 2010), simplicidad operacional, y su bajo coste económico en comparación con los métodos convencionales. Esto se debe a sus propiedades únicas, tales como una alta relación superficie-volumen, modificabilidad de la superficie, biocompatibilidad, y reversibilidad (Fu y Wang, 2011; Hua *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Dave *et al.*, 2014). Además, la adsorción no produce residuos tóxicos secundarios durante el proceso (Gupta *et al.*, 2015). Diferentes nanomateriales, como óxidos metálicos, carbono, polímeros, y otros, se han desarrollado como posibles adsorbentes para la nanorremediación ambiental (Hua *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Ray y Shipley, 2015).

#### **3.1.1.1. Nanoadsorbentes magnéticos**

La gran estabilidad ambiental, elevada capacidad de adsorción, debido a su alta relación superficie/tamaño, eficiencia de eliminación, y fácil y rápido manejo hacen a los nanomateriales magnéticos adecuados para las operaciones de tratamiento de agua (Crane y Scott, 2012; Tang *et al.*, 2013). Además, son potencialmente reutilizables mediante simples procesos de desorción (Hao *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2016), y su naturaleza no tóxica permite que puedan utilizarse directamente en lugares contaminados sin riesgo de contaminación secundaria (Li *et al.*, 2003a, b). Otra característica distintiva de los nanoadsorbentes magnéticos es su capacidad de respuesta a un campo magnético externo, que facilita el proceso de separación/extracción del nanomaterial después de la adsorción del contaminante. Esta característica evita el uso de técnicas de separación adicionales, como la filtración y la centrifugación. Además, algunos autores han demostrado que las propiedades magnéticas pueden mejorar la afinidad de las nanopartículas a contaminantes orgánicos y metales pesados disueltos en agua (Lim *et al.*, 2009; Wiatrowski *et al.*, 2009). Dixit y Hering (2003) sugirieron que el comportamiento de adsorción depende completamente de la mineralogía del óxido de hierro. De hecho, Nassar (2010) observó que las nanopartículas de óxido de hierro eran

más eficientes en la eliminación de Pb en comparación con otros adsorbentes investigados. Por todo ello, numerosos estudios han utilizado nanomateriales magnéticos como nanoadsorbentes para eliminar diversos contaminantes del agua, incluidos metales pesados, compuestos orgánicos e inorgánicos y diversos colorantes (Xu *et al.*, 2012; Thakur y Karak, 2014; Song *et al.*, 2016).

### **3.1.1.2. Nanoadsorbentes magnéticos híbridos**

Los nanomateriales híbridos, compuestos por dos o más materiales de distinta naturaleza (orgánica/inorgánica), también se han investigado ampliamente en aplicaciones ambientales y, en particular, para la eliminación por adsorción de varios iones metálicos tóxicos, colorantes, y microorganismos de aguas residuales (Pandey *et al.*, 2017). Estos materiales son potencialmente más eficientes, selectivos y estables que los métodos basados en un único nanocompuesto debido a que reúnen propiedades específicas deseadas de cada uno de sus componentes (Guerra *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2019). Ocurre lo mismo con los materiales híbridos recuperables magnéticamente, que combinan las propiedades idóneas de las MNPs para la adsorción de contaminantes (comentadas en el apartado 1.1.1.1. de esta sección) con propiedades físico-químicas de los materiales con los que se combinan, que pueden favorecer o incrementar su capacidad de adsorción (Ge *et al.*, 2012; Khare *et al.*, 2016; Kalia *et al.*, 2014). En este contexto, la membrana de la cáscara de huevo (ESM) podría ser un adsorbente ecológico eficiente con el que combinar MNPs. Esto es así debido a que es un biomaterial con gran área superficial, consistente en una red estable de fibras reticuladas insolubles en agua (Cordeiro y Hincke, 2011; Hincke *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2017, 2019) y a que es un residuo abundante de la industria del procesamiento de alimentos. Además, al igual que las MNPs, se ha demostrado que la ESM puede unir iones metálicos (como Au, Pt, Pd, As) de soluciones acuosas (Suyama *et al.*, 1994; Ishikawa *et al.*, 2002a, b; Chen *et al.*, 2013). Por todo ello, el uso ESMs combinadas con MNPs para la eliminación de metales pesados de aguas contaminadas será objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

#### **4. Nanoadsorbentes magnéticos en plantas piloto**

El número de instalaciones para nanorremediación ha aumentado en los últimos años, pero el número total, particularmente en el contexto comercial, sigue siendo relativamente bajo en comparación con aquellas para la biorremediación y la remediación convencional por reducción química utilizando hierro a gran escala. Actualmente hay alrededor de 100 entidades relacionadas con nanorremediación, desde plantas piloto hasta aplicaciones comerciales, y en al menos 44 de ellas ya están consiguiendo resultados positivos (U.S.E.P.A., 2004). La mayoría se han diseñado para la gestión y control de contaminantes en aguas subterráneas, y se han aplicado con mayor frecuencia para la eliminación de solventes clorados y metales (como el cromo VI) (Bardos *et al.*, 2018). Por otro lado, el Proyecto de investigación NanoRem, financiado a través del Séptimo Programa Marco de la Comisión Europea, destinado a facilitar la nanotecnología práctica, segura, económica, y explotable para remediación *in situ* de suelos y aguas subterráneas contaminadas, ha desarrollado varias plantas pilotos para nanorremediación. El trabajo de NanoRem ha incluido la mejora del rendimiento de hierro cero-valente a nanoescala nZVI (NanoRem, 2017a) y una amplia gama de nanopartículas que potencialmente pueden dar solución a diversos problemas ambientales. Actualmente hay tres plantas piloto donde se están utilizando nano-goetitas para estimular la actividad microbiana y consuir la eliminación de tolueno de aguas subterráneas (República Checa) (NanoRem, 2017b) y la eliminación de metales pesados, (As, Pb, Zn, Cd, Cu y Ni) (Portugal y España) (NanoRem, 2017c).

## **OBJETIVOS**

El interés por las nanopartículas de magnetita ha aumentado en los últimos años en el campo de la nanotecnología debido a sus idóneas propiedades fisicoquímicas, como su alta estabilidad química, su alta relación superficie/volumen y sus propiedades magnéticas únicas, que permiten su uso en multitud de aplicaciones diferentes. Por ello, el objetivo general de esta Tesis Doctoral es la producción de nanosistemas magnéticos consistentes en nanopartículas biomiméticas de magnetita (BMNPs) producidas en presencia de las proteínas MamC y/o Mms6 de *Magnetococcus marinus* MC-1, y membranas de huevos magnéticas sintetizadas mediante precipitación de nanopartículas de magnetita (MESM), para su aplicación en biomedicina y remediación ambiental, respectivamente.

Concretamente, el **Capítulo I** tiene los objetivos específicos de profundizar en la comprensión de las funciones de las MAPs MamC y Mms6 de *Magnetococcus marinus* MC-1 en el proceso de biomineralización *in vitro*, así como analizar las propiedades químicas de estas proteínas, y las estructurales y magnéticas de las BMNPs formadas en su presencia, para su potencial uso en nanotecnología.

El objetivo principal de los **Capítulos II a V** es evaluar *in vitro* (II, III, IV) e *in vivo* (V) la aplicación de las BMNPs sintetizadas en presencia de MamC en biomedicina y, específicamente, como nanotransportadores dirigidos para terapias antitumorales. De esta manera, el **Capítulo II** tiene como objetivos específicos caracterizar físicoquímicamente las BMNPs, incluyendo sus propiedades magnéticas, carga superficial y contenido en MamC, así como evaluar su potencial como nanotransportadores de fármacos. En este sentido, se analiza la unión de un fármaco quimioterápico modelo, doxorubicina (DOXO), a las BMNPs (DOXO-BMNPs), su liberación a distintos pH y su cito- y hemocompatibilidad. Los objetivos específicos del **Capítulo III** amplían el estudio iniciado en el Capítulo II, evaluando la unión de un anticuerpo monoclonal (mAb) a las DOXO-BMNPs para la liberación dirigida del fármaco en células tumorales, así como un análisis más detallado de la citotoxicidad de las BMNPs y de los diferentes nanoensamblajes (DOXO-BMNPs, mAb-BMNPs y DOXO-mAb-BMNPs), incluyendo la evaluación de la citotoxicidad a tiempo real, las poblaciones de células necróticas y apoptóticas, y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

La mayoría de los nanosistemas basados en nanopartículas están dando resultados prometedores *in vitro* y en modelo animal, pero no han conseguido alcanzar la aprobación clínica, entre otros motivos por la falta de conocimiento sobre sus

interacciones biológicas. En este sentido, el **Capítulo IV** tiene como objetivo específico caracterizar la formación proteínas corona (PC) alrededor de las BMNPs y DOXO-BMNPs tras su incubación en plasma humano. Esta caracterización aborda la identificación de las proteínas plasmáticas más abundantes adsorbidas después de 1 y 24 h de incubación, el análisis de las propiedades magnéticas de los nanoensamblajes producidos (PC-BMNPs y PC-DOXO-BMNPs), su polidispersividad y estado de aglomeración, así como su citotoxicidad e internalización en diferentes líneas celulares y células primarias. Posteriormente, en base al conocimiento adquirido con los objetivos específicos del Capítulo IV, en el **Capítulo V** se plantea como objetivo principal el análisis *in vivo* de la potencial eficiencia de las BMNPs/DOXO-BMNPs como nanotransportadores de fármacos en ratones BALB/c. Para ello, como objetivo específico fundamental, se evalúa la biodistribución y biocompatibilidad de las BMNPs después de su inyección intravenosa, garantizando de esta manera su biosuridada, así como objetivos específicos relacionados con su efectividad antitumoral. Concretamente, la posibilidad de orientar magnéticamente estos nanotransportadores para la liberación dirigida de fármacos, y su capacidad de producir hipertermia en presencia de un AMF.

Finalmente, el objetivo principal del **Capítulo VI** trata de abordar la aplicación de un nuevo material magnético híbrido, compuesto por nanopartículas magnéticas inorgánicas (MNPs) precipitadas en membranas de cáscara de huevo (ESM), como adsorbente verde para la eliminación de metales pesados de ambientes acuosos, utilizando plomo como metal modelo. En este contexto, se plantearon como objetivos específicos, el análisis de la disposición de las MNPs sobre la ESM en presencia y ausencia de un campo magnético externo y la capacidad de las ESM magnéticas (MESM) producidas para eliminar metales pesados de agua, utilizando como modelo el plomo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## I. Análisis *in silico*

Se realizaron alineamientos múltiples de la secuencia de Mms6 (Mmc1\_2275, referencia en NCBI) de *Magnetococcus marinus* MC-1 con proteínas homólogas de otras bacterias magnetotácticas utilizando el programa Clustal Omega. Todas las secuencias de aminoácidos de estas proteínas se obtuvieron de la base de datos NCBI. Se dedujo el grado de hidrofobicidad y las propiedades físicoquímicas de Mms6 a partir de la secuencia de la proteína utilizando el servidor ExPASy y el programa SOSUI.

## II. Crecimiento de *Magnetococcus marinus* MC-1

*Magnetococcus marinus* MC-1 se cultivó de manera microaerobia (creándose un gradiente de oxígeno en el tubo) en un medio semisólido desarrollado por Bazylinski *et al.* (2013) y bajo condiciones de quimiolitotrofia, utilizando tiosulfato como donador de electrones en los cultivos, como está descrito por Williams *et al.* (2006). El medio semisólido consiste en agua de mar artificial estéril, consuida mediante la adición de diversos componentes en agua destilada desionizada. Para producir el agua marina artificial se añadieron los componentes de la Tabla 1. Además, a este agua se le adicionaron las vitaminas (Tabla 2) y los minerales (Tabla 3, 3 mL/L de la solución madre) de Wolfe, resazurina al 0,2% (indicador redox para detectar la presencia de oxígeno), NH<sub>4</sub>Cl (0,3 g/L), tampón PO<sub>4</sub> (0,5 M, 1.8 mL/L), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> al 25% (3 mL/L), 0,2 g/L de cisteína (agente reductor para eliminar el oxígeno), NaHCO<sub>3</sub> (0,0672 g/mL, 2,8 mL/L, fuente de carbono y para mantener condiciones anaerobias), 10 mM FeSO<sub>4</sub> (2,5 mL/L, fuente de hierro) y 0,7% de bacto-agar (Thermo Fisher), pH 7-7,2. Una vez preparado, se repartió en tubos estériles de 125 x 15 mm con septos de goma. De manera que, cuando gelifica, se forma un gradiente de oxígeno con color rosáceo en la zona óxica, volviéndose más tenue en la zona anóxica. Estos tubos se inocularon, mediante el uso de una jeringuilla estéril, con *Magnetococcus marinus* MC-1 en la interfase óxica-anóxica formada y se incubaron durante 1-2 meses a 25-28 °C.

Tabla 1. Agua marina artificial

NaCl	16,44 g/L
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	3,49 g/L
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,74 g/L
KCl	0,47 g/L
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,39 g/L



**Tabla 2.** Vitaminas de Wolfe

Vitaminas	Solución madre	Cantidad (para 100 mL)
Tiamina (vitamina B1)	-	90 mg
Inositol	-	40 mg
D-, L-Ca <sup>2+</sup> pantothenato	2 mg/mL	4 mL
Acido para-aminobenzoico (PABA)	2 mg/mL	2,5 mL
Vitamina B12	1 mg/mL	5 mL
Piridoxina (Vitamina B6)	1 mg/mL	4 mL
Niacina (ácido nicotínico)	1 mg/mL	4 mL
Biotina	0,1 mg/mL	1 mL
Ácido fólico	0,1 mg/mL	0,4 mL

**Tabla 3.** Minerales de Wolfe (referencia original: Wolin *et al.*, 1963)<sup>a</sup>. Los valores que están entre paréntesis corresponden a la referencia original.

Ácido nitrilotriacético (NTA)	1,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	3,0 g/L
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
NaCl	1,0 g/L
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O o CoSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0,025 g/L (0,01g/L) <sup>a</sup>
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> •12H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,4 g/L (0,01 g/L) <sup>a</sup>
NiCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,01 g/L (-) <sup>a</sup>

### **III. Técnicas de manipulación de ADN**

#### **1. Aislamiento y purificación del ADN de *Magnetococcus marinus* MC-1**

Una vez consuida biomasa suficiente, el ADN genómico de *Magnetococcus marinus* MC-1 se aisló siguiendo el método descrito por Martín-Platero *et al.* (2007). Brevemente, se recogió la banda de crecimiento mediante una jeringuilla estéril y se centrifugó a 4508 g rpm 5 min. El sedimento se resuspendió en 100 µL de tampón TE, se adicionaron 10 mg/mL de lisozima (USBiological) y se incubó 45 min a 37 °C. La lisis se completó mediante la adición de 10 mg/mL de proteinasa K (Sigma-Aldrich) y SDS al 10% y su incubación 30 min a 37 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron nuevamente, se añadieron 100 µL de Chelex (Chelex 100; 200-400 mesh; sodium form; 10% p/v) y se incubó durante 30 min a 56 °C, agitándose vigorosamente cada 10 s. La inactivación de las enzimas se llevó a cabo por choque térmico (10 min a 100 °C). El sobrenadante, que contenía el ADN, se recogió mediante centrifugación a 14 500 g durante 5 min, se transfirió a un nuevo tubo y se congeló a -20 °C hasta su uso.

#### **2. Amplificación y clonación**

El gen *mms6* (NCBI, número de acceso del gen ABK44776.1, número de acceso de la proteína Mmc1\_2275) se amplificó por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos diseñados específicamente para este gen: f6 (5'-ATGCCTGTTGCTGTACCAAATAAAGC-3') y r6 (5'-TCAGCTAATGGCCTCTTCCAATTC-3') (Thermo Fisher) a partir del genoma aislando de *M. marinus* MC-1. Los productos de PCR fueron purificados utilizando NucleoSpin Extract II kit (MACHEREY-NAGEL) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Posteriormente el gen amplificado se clonó en el vector pTrcHis-TOPO (Life Technologies: Invitrogen), de manera que la proteína Mms6 recombinante se produjera como proteína de fusión con una cola de seis histidinas en el N-terminal, que permitiera su posterior purificación por afinidad al níquel inmovilizado en columnas quelantes de alto rendimiento HiTrap (GE Healthcare). A continuación se transformaron células competentes de *Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies: Invitrogen), mediante choque térmico a 42 °C, con los vectores recombinantes. Por último, se verificó que se hubiera insertado el gen *mms6* en el vector, en la orientación correcta y sin ninguna mutación. Esto se realizó mediante PCR y secuenciación del vector recombinante, utilizando un secuenciador 3100 modelo ABI (Life Technologies: Applied Biosystems).

La amplificación y clonación del gen *mamC* (NCBI, número de acceso del gen ABK44776.1, número de acceso de la proteína Mmc1\_2275) se llevó a cabo previamente por Valverde-Tercedor *et al.* (2015). Al igual que el gen *mms6*, la amplificación de *mamC* se realizó a partir del genoma aislando de *M. marinus* MC-1 y el gen resultante se clonó en un vector recombinante pTrcHis-TOPO (Life Technologies: Invitrogen) con el que se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 (Life Technologies: Invitrogen).

#### **IV. Técnicas para el estudio de proteínas**

##### **1. Sobreexpresión y purificación**

###### **1.1. MamC**

La proteína MamC se sobreexpresó y purificó como describieron Valverde-Tercedor *et al.* (2015). Brevemente, se indujo la sobreexpresión de MamC a partir de cepas competentes de *Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies: Invitrogen) transformadas con el plásmido recombinante pTrcHis-TOPO (Life Technologies: Invitrogen) que portaba el gen *mamC*, mediante la adición de 2 mM de isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), suido de su incubación a 37 °C durante 5 h. Terminado el tiempo de incubación, las células se recogieron por centrifugación a 4508 g, se resuspendieron en tampón A (tampón fosfato 20 mM, pH 8,0, urea 6 M y NaCl 0,5 M) para empezar la lisis celular, romper los cuerpos de inclusión y desnaturalizar la proteína. Después de la agitación de los cultivos resuspendidos en el tampón A durante la noche, la lisis celular se completó mediante sonicación y el cultivo se centrifugó a 75 600 g durante 30 min a 4 °C a fin de eliminar los restos celulares. La purificación se realizó en condiciones desnaturalizantes, el sobrenadante se cargó en una columna quelante de alto rendimiento HiTrap (GE Healthcare), previamente cargada con níquel y equilibrada con el tampón A, utilizando un sistema FPLC ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare). La elución de la proteína se llevó a cabo por cambio de pH y su repliegamiento mediante la eliminación secuencial de la urea por diálisis a 4 °C. La 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 estimó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y su concentración se midió espectrofotométricamente utilizando el correspondiente coeficiente de extinción molar a 280 nm ( $14\ 440\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ) en un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

## **1.2. Mms6**

Para la sobreexpresión de la proteína Mms6, las células competentes de *Escherichia coli* TOP10 transformadas con los vectores recombinantes se cultivaron a 37 °C en un agitador orbital hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) de 0,6. Entonces se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM durante 5 h a 37 °C (las condiciones óptimas probadas). Posteriormente, las células se recogieron por centrifugación (4508 g, 10 min, 4 °C), resuspendidas en tampón fosfato (pH 7,4) suplementado con 0,5 mg/mL de lisozima y 5% de sarcosinato de lauroilo sódico (sarkosyl) y lisadas por sonicación. La fracción soluble se separó por centrifugación (15151 g, 40 min, 4 °C) y se cargó en una columna quelante de alto rendimiento HiTrap (GE Healthcare) previamente cargada con níquel y equilibrada con tampón fosfato (pH 7,4) suplementado con imidazol 20 mM y Triton X-100 (1,3 veces su concentración crítica micelar) para reducir la agregación de las proteínas y mejorar su estabilidad. La purificación se realizó mediante un sistema FPLC ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare). La elución de Mms6 se llevó a cabo aplicando un gradiente continuo de imidazol de 20 a 500 mM. Se recogieron las distintas fracciones eluidas y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Posteriormente, las fracciones que contenían Mms6 fueron sometidas a un paso adicional de purificación utilizando una columna C4 de hidrofobicidad (Jupiter® 5  $\mu$ m C4 300 Å, LC Column 150 x 4.6 mm) en un sistema HPLC (Agilent 1100), a fin de eliminar contaminantes menores (proteínas de *E. coli* y ácidos nucleicos) y consuir una mayor pureza. En este caso la elución de Mms6 se llevó a cabo aplicando un gradiente continuo de solventes orgánicos (ácido trifluoroacético y acetonitrilo) en H<sub>2</sub>O, debido a que Mms6 tiene un alto grado de hidrofobicidad. La pureza de Mms6 y su patrón de migración, correspondiente con el valor del peso molecular teórico calculado para Mms6-His (22,5 KDa, ExPASy Server), se estimaron mediante tinción por azul de Coomassie en un gel de poliacrilamida-SDS al 12%. Además, su concentración se determinó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976) y espectrofotométricamente utilizando el correspondiente coeficiente de extinción molar a 280 nm ( $17085 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Como experimento control, se realizó el mismo protocolo en células transformadas con un plásmido pTrcHis-TOPO que no contenía el gen de interés.

### **1.3. Anticuerpo monoclonal (mAb) DO-24**

La producción y purificación de DO-24, un anticuerpo monoclonal IgG 2a/k (mAb), producido contra el ectodominio del receptor humano de Met/HGF, se realizó como está descrito en Prat *et al.* (1998). Brevemente, los mAb DO-24 se purificaron a partir de fluido ascítico mediante precipitación con sulfato de amonio al 40% y cromatografía de afinidad en proteína G-sefarosa con elución a pH 3. Después de la purificación, la proteína eluida se dializó tres veces contra tampón fosfato (pH 7.4) para eliminar todo el tampón de glicina (pH 3.5) utilizado en la etapa de elución.

## **2. Identificación de proteínas**

### **2.1. Mms6**

Para la identificación de Mms6 se realizó huella de masas peptídicas (PMF) y fragmentación peptídica por MALDI-TOF/TOF (PFF). Para ello, la banda de proteína se visualizó mediante tinción con azul de Coomassie (Life Technologies), se aisló y digirió del gel de poliacrilamida-SDS al 12% siguiendo un protocolo no automatizado. El protocolo de digestión incluyó reducción con ditioneitol (DTT), derivatización con yodoacetamida (IAM) y posterior digestión durante la noche con tripsina (45 ng) a 30 °C. Los péptidos resultantes se extrajeron del gel con 15 µl de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,2% y acetonitrilo al 30%. La muestra se cristalizó en una placa "AnchorChip" usando ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) como matriz y se analizó en un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF modelo UltrafleXtreme de Bruker, obteniendo los correspondientes espectros de masa y fragmentación. La identificación de las proteínas se llevó a cabo en las bases de datos utilizando los softwares ProteinScape y MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) como motor de búsqueda.

### **2.2. Proteínas corona**

Las proteínas corona unidas a las nanopartículas biomiméticas de magnetita producidas en presencia de MamC se separaron de las partículas mediante incubación en tampón de muestra Laemmli (concentración final 2% p/v SDS, 5 min 95 °C) seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS con gradiente de 4-20% y desorción láser asistida por MALDI-TOF. Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (Life Technologies). Posteriormente las bandas individuales se aislaron siguiendo un protocolo de digestión trípica en gel. Para ello, las bandas de gel se cortaron y se eliminaron mediante incubación con una mezcla 1:1 de bicarbonato de

amonio (100 mM) y acetonitrilo (v/v) durante 15 min, y luego con acetonitrilo al 100% durante 5 min más. Después del secado, las proteínas se redujeron en ditioneol (100 mM, 56°C, 30 min), se centrifugaron brevemente y los trozos de gel se redujeron en acetonitrilo al 100%. A continuación, los trozos de gel se incubaron con yodoacetamida (55 mM, 20 min) en oscuridad para su alquilación, se lavaron con bicarbonato de amonio 100 mM y se mantuvieron en acetonitrilo al 100%. Luego se deshidrataron por centrifugación al vacío (SeedVac) y se incubaron durante la noche con tripsina (12,5 µg/mL en 25 mM de bicarbonato de amonio). Después de la eliminación del sobrenadante, los péptidos residuales se extrajeron utilizando acetonitrilo al 40% y TFA al 0,1%.

Las masas peptídicas se determinaron mediante espectrometría de masas de ionización desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) utilizando un instrumento Ultraflex-II TOF/TOF (Bruker Daltonics) equipado con un láser de haz inteligente de estado sólido de 200 Hz. Los espectros de masas se adquirieron en un rango de m/z de 600-4000. Las muestras de digestión de proteínas se prepararon usando la técnica de gotas secas, sobre ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico. La búsqueda en la base de datos se realizó utilizando MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>). La anotación de los espectros de MS/MS se realizó manualmente.

### **3. Análisis químico-físicos**

#### **3.1. Dicroísmo circular (CD)**

Los espectros de DC de Mms6 se registraron a 25 °C en la región del UV lejano (190-250 nm) usando un espectropolarímetro J-815 de Jasco equipado con un soporte de celda tipo Peltier. Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 0,2 cm de longitud y 1 mm de ancho de banda, utilizando un tiempo de respuesta de 1 s y una velocidad de barrido de 100 nm/min. Se acumularon tres medidas consecutivas y se almacenaron los espectros promedio. La contribución de la solución en la que estaban resuspendidas las proteínas (1,3 CMC Triton X-100 en agua) se substrajo de los espectros de las proteínas. El análisis de los datos experimentales se llevó a cabo mediante el software Spectra Manager. La estructura secundaria de Mms6 se calculó mediante la deconvolución del espectro utilizando el método de Raussens (Raussens *et al.*, 2003).

### **3.2. Interacción de proteínas**

La interacción entre MamC y Mms6 se investigó mediante el ensayo AlphaScreen. En este ensayo MamC es reconocida por un anticuerpo monoclonal anti-MamC de ratón (ProteoGenix, 1 mg/mL en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 0,02% de azida sódica) que será reconocido por un anti-IgG de ratón inmovilizado en bolitas Aceptoras (Perkin Elmer Cat. 6760606C). Mientras que Mms6 es reconocida por un anticuerpo policlonal anti-Msm6 de conejo (secuencia diana Cys\_YMKNRGEQADELEE, ProteoGenix, 0,84 mg/mL en PBS con 0,02% de azida sódica), que será reconocido por un anti-IgG de conejo inmovilizado en bolitas Donadoras (Perkin Elmer Cat. AS105D). De manera que, si MamC y Mms6 interaccionan, las bolitas Aceptoras y Donadoras se aproximarán. La excitación de las bolitas Donadoras dará como resultado la emisión de luz de las bolitas Aceptoras. La señal generada será proporcional a la cantidad de proteínas que interaccionan. Esta prueba ofrece ventajas sobre otros formatos de ensayo, ya que no son necesarios pasos de lavado, tiene menos pasos de protocolo (menor duración), requiere menos muestra y proporciona un gran rango dinámico. Para realizar esta prueba se utilizaron soluciones madre de Msm6 (1 mg/mL) en agua y Triton X-100 y MamC (1 mg/mL) en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8. Estas soluciones madre se diluyeron mediante la adición de tampón de ensayo (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, Tween-20 al 0,05%, BSA al 0,1%, pH 8) para alcanzar concentraciones de 200, 500 1000 y 1500 nM de MamC o Mms6 de manera independiente o en combinación. Las proteínas MamC y Mms6 se añadieron, a la concentración específica, en placas de 96 pocillos (Optiplate) y se incubaron durante 60 min a 28 °C. Los experimentos con solo MamC o Mms6 y sin proteínas se utilizaron como controles negativos. Después de la incubación de las proteínas, se añadieron las bolitas anti-Mms6 Donadoras y anti-MamC Aceptoras a todos los pocillos y se incubó durante 120 min a 23 °C. La concentración final de los anticuerpos anti-Mms6, anti-MamC y de las bolitas Aceptoras y Donadoras fue de 1 nM, 3 nM y 20 µg/mL, respectivamente. Finalmente, la señal/emisión se leyó utilizando instrumento Ensign™ Perkin-Elmer.

### **V. Extracción de membranas de huevo (ESM)**

Para la extracción de ESM, los huevos se partieron por la mitad y se eliminó el contenido. A continuación, el interior de la cáscara del huevo se lavó primero con agua corriente y posteriormente se realizaron tres lavados con agua MilliQ para eliminar

todos los restos de material interior. Se adoptaron dos estrategias para obtener la ESM total (ESM) o para separar la ESM interna (iESM) y externa (oESM). Para obtener la ESM, el huevo se llenó con HCl 1 N a través del agujero realizado en uno de los extremos y se incubó durante 25 min a temperatura ambiente, para solubilizar parcialmente la cáscara interna del huevo y separar la ESM. Después de esta incubación, el interior se enjuagó varias veces con agua MilliQ y se extrajo la ESM total utilizando pinzas. Para obtener las iESM y las oESM, antes del tratamiento con ácido, la ESM interna se extrajo tirando de ella desde el interior del huevo mediante el uso de pinzas, lo que dejó a la ESM externa adherida a la cáscara interna. La ESM externa se retiró del interior de la cáscara del huevo después de rellenar el interior del huevo con HCl 1 N e incubar. Las diferentes membranas se cortaron en tiras de 4 x 4 cm para los experimentos realizados en placas de 12 pocillos, o se realizaron cortes a las membranas completas (correspondientes a  $104 \pm 7 \text{ cm}^2$  de área) para desplegarlas y realizar los experimentos en placas de Petri. Se trató de dejar un pequeño fragmento de cáscara para ayudar a distinguir cada lado. El área de la ESM, correspondiente a un huevo completo, se calculó a partir de las dimensiones generales del huevo (es decir, el radio máximo en el ecuador del huevo y la altura) utilizando el “Egg shape calculator” (<https://rechneronline.de/pi/egg-shape.php>).

## **VI. Biomineralización**

### **1. Formación de magnetita biomimética en presencia de MamC y/o Mms6**

Se prepararon soluciones desoxigenadas (para evitar la oxidación de la magnetita) de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,15 M/0,15 M),  $\text{FeCl}_3$  (1 M),  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  (0,5 M), y  $\text{NaOH}$  (5 M) utilizando agua desionizada pasada a través de un sistema de purificación de agua Millipore Milli-Q Plus ( $\lambda = 18,2 \text{ M}\Omega$ ). La desoxigenación del agua (1 L) se llevó a cabo hirviéndola durante 30 min, usando piedras de teflón que facilitan la formación de burbujas, y después enfriándola en hielo mientras se burbujeaba con  $\text{N}_2$  ultrapuro durante otros 30 min. Inmediatamente después la botella de agua libre de oxígeno se introdujo en el interior de una cámara de anaerobiosis (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI). Las soluciones stock de MamC y Mms6 también se desoxigenaron con  $\text{N}_2$  ultrapuro y se metieron en la cámara de anaerobiosis. La precipitación de magnetita se llevó a cabo en sistema cerrado (free-drift) a  $25^\circ\text{C}$  y 1 atm de presión total siguiendo el protocolo descrito por Perez-Gonzalez *et al.* (2011) dentro de la cámara de anaerobiosis, que contenía un 4% de  $\text{H}_2$  en  $\text{N}_2$  para evitar la potencial



oxidación de los productos. Para preparar la solución de precipitación se añadió agua desoxigenada, 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>, 2,78 mM Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, MamC y/o Mms6, y el pH y el potencial redox (Eh) se variaron mediante la adición de NaOH para alcanzar el campo de estabilidad de la magnetita, más específicamente condiciones reductoras (valores Eh negativos) y altos valores de pH, según el diagrama de estabilidad calculado para estos experimentos por las ecuaciones de Garrels y Christ (1990). La síntesis de magnetita mediante coprecipitación con MamC y/o Mms6 se llevó a cabo en presencia de (1) diferentes concentraciones (2,5, 5 y 10 mg/mL) de cada una de las proteínas, (2) las proteínas "contaminantes" purificadas a partir de células de *E. coli TOP10* transformadas con el plásmido pTrcHis-TOPO, (3) el tampón en el que estaba resuspendida MamC (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) y (4) el tampón en el que estaba resuspendida Mms6 (agua con 1,3 CMC Triton X-100). Como experimentos control se llevó a cabo la precipitación de magnetita inorgánica (en ausencia de las proteínas).

Cada reacción se dejó dentro de la cámara de anaerobiosis para la formación de las nanopartículas de magnetita durante 30 días, después de lo cual se recogió el producto precipitado. Los sólidos se concentraron en el fondo del tubo con un imán y el sobrenadante se desechó. A continuación, los precipitados se lavaron tres veces con agua desoxigenada. Después de cada lavado, las botellas se agitaron vigorosamente, el precipitado se concentró de nuevo magnéticamente y se retiró el sobrenadante. Se realizó un último lavado con etanol absoluto, previo a la preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM), o con tampón HEPES (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) y esterilizadas para su uso en los estudios *in vitro*. Finalmente, las botellas se sellaron herméticamente y almacenaron a 4 °C hasta su uso.

## **2. Formación de magnetita inorgánica sobre ESM (MESM)**

Trozos de 4 x 4 cm de las ESM interna, externa y total o la ESM total completa ( $104 \pm 7$  cm<sup>2</sup>) se colocaron en placas de 12 pocillos o placas de Petri, respectivamente. Algunos de los trozos fueron sometidos a un campo magnético externo: perpendicular (imán sujetado debajo del fondo de los pocillos) o paralelo (imanes sujetados a la pared exterior de los pocillos) usando imanes de neodimio de tracción de 1,8 kg (Magnet Expert Ltd). Se introdujo un trozo de ESM por pocillo o una ESM completa por placa de Petri, con la superficie interna o externa hacia arriba, y se añadió agua MilliQ para evitar su desecación. Los diferentes trozos fueron (a) depositados en el fondo del pocillo

o (b) colgados de hilos atados a los bordes de la boca de cada pocillo. Las placas se introdujeron dentro de una cámara de anaeróbiosis (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI) y las ESM se lavaron con agua MilliQ desoxigenada para eliminar el oxígeno de las membranas y así evitar posteriormente la oxidación de la magnetita. Se prepararon soluciones desoxigenadas de los reactivos de precipitación de magnetita y se añadieron a los pocillos o a las placas de Petri que contenían las ESM, a una concentración final de 3,5 mM NaHCO<sub>3</sub>/3,5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,7 mM Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5,56 mM FeCl<sub>3</sub>, pH = 9. Estos experimentos de coprecipitación de magnetita en las ESM se llevaron a cabo a 25 °C y 1 atm de presión total dentro de la cámara de anaerobiosis durante dos semanas. Algunos pocillos control contenían solo las ESM en 3,5 mM NaHCO<sub>3</sub>/3,5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Pasados los 14 días, se eliminó el sobrenadante de los pocillos o de las placas de Petri y las ESM se lavaron tres veces con agua MilliQ libre de oxígeno. Durante los lavados, las MESM se recuperaron magnéticamente quedando atrapadas por el imán en solo 2 s. Posteriormente, las MESM se prepararon para difracción de rayos X (XRD), Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido - espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (VP-FESEM- EDX) o se incubaron con plomo a fin de comprobar su potencial para biorremediación. Las magnetitas formadas pero no asociadas con las ESM también se recolectaron para analizarlas por VP-FESEM- EDX. Además, las MESM se disolvieron en 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 65% de ácido nítrico 1:1 (v/v) para analizar su contenido de hierro por espectrometría de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) y determinar la concentración de nanopartículas de magnetita adsorbidas en la ESM.

## **VII. Adsorción de moléculas a nanopartículas de magnetita biomiméticas (BMNPs)**

### **4. Funcionalización con doxorubicina (DOXO)**

#### **4.1. Cinética e isoterma de adsorción**

La cinética de la adsorción de DOXO en las BMNPs (DOXO-BMNPs) se llevó a cabo para determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Para estos análisis se mezclaron 5 mg de estas nanopartículas resuspendidas en tampón HEPES (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) o previamente incubadas con 20 mg/mL de tampón citrato y posteriormente resuspendidas en el mismo tampón, con 1 mg/mL de DOXO disuelta en agua MilliQ, dentro de botellas cerradas herméticamente para evitar la

oxidación de la magnetita. Las mezclas se mantuvieron a 25 °C con agitación (200 rpm) durante distintos tiempos hasta 24 h. Terminado este tiempo, las partículas se lavaron, utilizando un imán, tres veces con tampón HEPES hasta que la absorbancia fue menor que 0,02 unidades a 490 nm (equivalente a una cantidad despreciable). El contenido de DOXO se evaluó mediante espectroscopía UV-Vis ( $\lambda = 490$  nm) mediante comparación con curvas estándar. La cantidad de DOXO adsorbida se calculó a partir de la diferencia entre la concentración antes y después de su adsorción a las nanopartículas. La cantidad de DOXO no absorbida ( $C_e$ ) y la cantidad de DOXO adsorbida por unidad de masa de adsorbente ( $Q$ ) también se calcularon a partir de estas mediciones. Finalmente, las nanopartículas funcionalizadas se resuspendieron en tampón HEPES y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

La isoterma de adsorción se obtuvo mezclando 5 mg de BMNPs (previamente incubadas con 20 mg/mL de tampón citrate) con 1 mL de diferentes concentraciones de DOXO, hasta 7,4 mM, en tampón HEPES. Se realizaron más de 15 experimentos independientes a concentraciones iniciales iguales o diferentes de DOXO en el sobrenadante para construir la isoterma de adsorción. Las mezclas se incubaron a 25 °C durante 3 h (tiempo requerido para alcanzar el equilibrio, en base a la cinética de adsorción). Los datos se ajustaron a los modelos de Langmuir y Langmuir – Freundlich (LF) utilizando Origin 8. El modelo de adsorción de Langmuir (Langmuir, 1918) considera que la superficie es homogénea desde el punto de vista energético y la superficie de adsorción máxima se produce en una monocapa, sin considerar la posible interacción entre las moléculas de fármaco adsorbidas. El modelo de Langmuir se define mediante la ecuación 1, donde  $Q$  es la cantidad de fármaco adsorbido por cantidad de nanopartículas,  $K_L$  es la constante de afinidad de Langmuir,  $Q_{max}$  es la capacidad de carga del fármaco y  $C_e$  es la concentración de equilibrio del fármaco en el sobrenadante.

$$Q = \frac{Q_{max}(K_L C_e)}{1 + (K_L C_e)} \quad (1)$$

Alternativamente, el modelo LF considera que la energía de adsorción es heterogénea y también se tienen en cuenta los efectos de la cooperatividad. Este modelo se describe mediante la ecuación 2, donde  $K_{LF}$  es la constante de afinidad de LF y  $r$  es el coeficiente de cooperatividad. Los valores de  $r > 1$  indican una cooperatividad positiva, mientras que los valores de  $r < 1$  indican una cooperatividad negativa.

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

## **4.2. Liberación**

La estabilidad de los complejos DOXO-BMNPs se determinó mediante el análisis de la liberación de DOXO a pH 7,4 (tampón HEPES) y a pH 5 (solución de ácido cítrico de sodio 0,1 M) después de su incubación a 37 °C, 200 rpm, durante diferentes tiempos (0, 1, 3, 5 y 7 días). Se preparó una muestra individual para cada intervalo de tiempo, y se prepararon, al menos, tres réplicas de cada muestra. En cada tiempo especificado, los complejos DOXO-BMNPs se separaron del sobrenadante mediante el uso de un imán. La concentración de DOXO en el sobrenadante se determinó como se indicó en el punto anterior. La eficiencia de liberación (DR) se definió mediante la ecuación 3, como la relación entre la cantidad de moléculas liberadas en un tiempo fijo  $t$  ( $Q(t)$ ) y la  $Q_{max}$ .

$$D_R = \frac{Q(t)}{Q_{max}} \times 100 \quad (3)$$

## **5. Funcionalización con mAb DO-24**

### **5.1. Cinética de adsorción**

Para la funcionalización de las BMNPs con el mAb DO-24 (mAb-BMNPs) y, éstas a su vez, con DOXO (DOXO-mAb-BMNPs) se mezclaron 5 mg de estas nanopartículas resuspendidas en tampón HEPES (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) con 1 mg/mL de mAb disuelto en el mismo tampón y, en su caso, 1 mg/mL de DOXO disuelta en agua MilliQ, dentro de botellas cerradas herméticamente para evitar la oxidación de la magnetita. Las mezclas se mantuvieron a 25 °C con agitación (200 rpm) durante distintos tiempos hasta 24 h. Terminado este tiempo, las partículas se lavaron, utilizando un imán, tres veces con tampón HEPES, hasta que la absorbancia fue menor que 0,02 unidades a 280 nm (para mAb) o a 490 nm (para DOXO) (equivalente a una cantidad despreciable). El contenido de mAb y de DOXO se evaluó

mediante espectroscopía UV-Vis ( $\lambda = 280$  y  $490$  nm, respectivamente) comparando los resultados con curvas estándar. La cantidad de DOXO y de mAb adsorbido se calculó a partir de la diferencia entre la concentración antes y después de su adsorción a las nanopartículas. Finalmente, las nanopartículas funcionalizadas se resuspendieron en tampón HEPES y se mantuvieron a  $4$  °C hasta su uso. En el caso de las BMNPs funcionalizadas con ambas moléculas (DOXO-mAb-BMNPs), la funcionalización con el mAb se llevó a cabo en primer lugar y, posteriormente, con DOXO en base a experimentos previos realizados por Iafisco *et al.* (2013).

### **5.2. Inmunocompetencia**

La inmunocompetencia de los mAb DO-24 unidos a las nanopartículas también se realizó a fin de corroborar que estaban unidos y que mantenían su actividad. Para ello, los complejos mAbs-BMNPs y DOXO-mAb-BMNPs se incubaron durante la noche a  $4$  °C con extractos preparados a partir de la línea celular GTL-16 de carcinoma gástrico ( $\text{Met}^+$ ) y la línea celular Huh7 de hepatocarcinoma como control negativo ( $\text{Met}^-$ ), en tampón DIM (50 mM Pipes pH 7,4, 300 mM sacarosa, 100 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ ), 1% de Triton X-100, 1 mM de TRIS HCl pH 8,8 y un cóctel de inhibidores de proteasas. Nanopartículas no funcionalizadas (BMNPs) y funcionalizadas solo con DOXO (BMNPs-DOXO) también se analizaron como control. Posteriormente, las nanopartículas se lavaron y las proteínas se solubilizaron en tampón de muestra Laemmly, se calentaron a  $95$  °C durante 5 min y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. A continuación las muestras separadas en los geles se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno para llevar a cabo un Western blot, en el que se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, que permitieron la detección de las bandas de interés por liberación de quimioluminiscencia (kit ECL), que fue analizada mediante un instrumento VersaDoc (Bio-rad, USA).

### **5.3. Estabilidad**

La estabilidad de los complejos mAb-BMNPs se determinó mediante el análisis de la liberación de mAb a pH 7,4 (tampón HEPES) y a pH 5 (solución de ácido cítrico de sodio 0,1 M) después de la incubación a  $37$  °C, 200 rpm, durante diferentes tiempos (0, 1, 3, 5 y 7 días). Se preparó una muestra individual para cada intervalo de tiempo y, al menos, tres réplicas de cada muestra. En cada tiempo especificado, los complejos mAb-BMNPs se separaron del sobrenadante mediante el uso de un imán. El

sobrenadante se recogió y se midió espectrofotométricamente como se describe en el punto 2.1 de esta misma sección. Por otro lado, el sedimento que contenía los complejos mAb-BMNPs se solubilizó en tampón Laemmly (concentración final 2% p/v SDS), se calentó a 95 °C durante 5 min, y las proteínas se separaron en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10%. A continuación, este gel se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno para realizar un Western blot, anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, que permitieron la detección de las bandas de interés por liberación de quimioluminiscencia (kit ECL), que fue analizada mediante un instrumento VersaDoc (Bio-rad, USA).

#### **6. Adsorción de proteínas plasmáticas o proteínas corona (PC)**

Para analizar la interacción de PC con las BMNPs y DOXO-BMNPs se utilizó plasma humano aislado de la sangre total de donantes sanos (con permiso de la Deutsches Rotes Kreuz). La sangre se centrifugó durante 5 min a 400 g, los sobrenadantes se agruparon y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Las BMNPs se funcionalizaron con DOXO (DOXO-BMNPs), siguiendo el protocolo descrito en el punto 1 de esa sección, y/o con proteínas corona (PC-BMNPs y PC-DOXO-BMNPs) a partir de suspensiones de plasma humano. Las BMNPs y los complejos DOXO-BMNPs se incubaron con suspensiones de plasma humano (1:1 v/v) durante 1 o 24 h a 37 °C (simulando la temperatura corporal). En todos los casos, al final del tiempo de incubación, las partículas se recogieron con un imán y se lavaron tres veces con tampón HEPES (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) para eliminar las PC no unidas. La concentración de PC adsorbida se analizó mediante el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) después de 1 h de tratamiento con tampón HEPES con SDS al 1%, de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante y mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Después de los lavados, los complejos de DOXO-BMNPs, PC-BMNPs y PC-DOXO-BMNPs se resuspendieron en tampón HEPES y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización. Además, las proteínas corona unidas se separaron de las BMNPs mediante incubación en tampón de muestra Laemmli (concentración final 2% p/v SDS, 5 min 95 °C) seguido de electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS con gradiente de 4-20%. Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (Life Technologies).

## **VIII. Adsorción de cationes por ESM y/o MESM**

### **1. Hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ )**

Los trozos de 4 x 4 cm de ESM se incubaron en 25 mL de una solución 5,56 mM de  $\text{FeCl}_3$  (reactivo utilizado en los experimentos de precipitación de magnetita) disuelto en agua MilliQ, que corresponde a 310 ppm de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ). El propósito de este experimento fue dilucidar si existe interacción entre el  $\text{Fe}^{3+}$  y la ESM. Después de la incubación, las membranas se extrajeron para el análisis de su contenido elemental mediante Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), difracción de rayos X (XRD) y Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).

### **2. Plomo ( $\text{Pb}^{2+}$ )**

Los trozos de 4 x 4 cm de ESM y MESM totales o las ESM y MESM totales completas ( $104 \pm 7 \text{ cm}^2$ ) se incubaron en 25 mL de soluciones de 25, 50 y 75 ppm de plomo preparadas a partir de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  disuelto en agua MilliQ (pH 4,35), durante 48 h con agitación (100 rpm). Después de este tiempo de incubación, se extrajeron las membranas para el análisis de su contenido elemental mediante FVP-FESEM-EDX, espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) y difracción de rayos X (XRD). La solución de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  restante después de la incubación de las ESM y MESM también se analizó mediante Espectroscopía de absorción atómica (AAS) y espectrometría de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).

## **IX. Análisis de las magnetitas precipitadas y funcionalizadas**

### **1. Difracción de rayos X (XRD)**

Los sólidos formados en todos los experimentos de biomineralización (MNPs, MamC-BMNPs, Mms6-BMNPs, Mms6-MamC-BMNPs y MESM), así como después de su funcionalización (mAb-BMNPs, PC-BMNPs, DOXO-BMNPs, DOXO-mAb-BMNPs y PC-DOXO-BMNPs, MESM-Pb) se identificaron como magnetita utilizando XRD. Estos análisis se realizaron mediante un difractómetro de rayos X Xpert Pro (PANalytical), utilizándose radiación de  $\text{Cu K}\alpha$ . Las nanopartículas y nanoensamblajes se liofilizaron y escanearon de 20 a 60 ° en  $2\theta$  ( $0.01^\circ/\text{paso}$ ; 3 s por paso) mientras que para el análisis de las membranas, el escáner se realizó de 3 a 70° en  $2\theta$  ( $0.04^\circ/\text{paso}$ ; 4 s por paso). Todos los datos se procesaron con el software X Powder para identificar la fase mineral.

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

La morfología y el tamaño de las nanopartículas de magnetita producidas en todos los experimentos de biomineralización (inorgánicas, así como las diferentes concentraciones de MamC-BMNPs, Mms6-BMNPs and Mms6-MamC-BMNPs) se estudiaron mediante TEM utilizando un microscopio electrónico LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT. Para ello las nanopartículas se concentraron en etanol absoluto mediante el uso de un imán y se embebieron en resina Embed 812. Posteriormente, se prepararon secciones ultrafinas (50-70 nm) de estas partículas embebidas en resina utilizando un microtomo Reichert Ultracut S (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) y se depositaron sobre rejillas de cobre para su observación.

## **3. Distribución de tamaños**

### **3.1. TEM + ImageJ**

La determinación de la morfología y el tamaño de los cristales sintetizados en presencia de diferentes concentraciones de MamC y/o Mms6 se realizaron en imágenes de TEM tomadas con un aumento de 20 kX. Estas imágenes se maximizaron y la barra de escala se usó para calibrar la conversión de píxel a nm en el programa ImageJ 1.47. A continuación, los cristales individuales se midieron manualmente para evitar una posible sobreestimación del tamaño debido a la agregación de partículas, ya que como es bien conocido el ojo humano tiene una mayor resolución en comparación con los programas de análisis de imágenes. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, los tamaños de los cristales se midieron en varias micrografías a 20 kX con un exceso de 1000 nanopartículas para cada experimento. Las curvas de distribución de tamaño se determinaron a partir de estas mediciones.

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

Las mediciones del radio hidrodinámico de las nanopartículas (MNPs BMNPs y DOXO-BMNPs) se realizaron a 25 °C en un instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Instruments Ltd, U.K.) utilizando cubetas de poliestireno desechables. El instrumento utiliza la técnica de dispersión dinámica de la luz, midiendo las fluctuaciones de intensidad en la luz dispersada que se relacionan con la difusión de los objetos dispersos para proporcionar una medida de la distribución del tamaño de las nanopartículas en suspensión. Para ello, se añadieron 200 µl de cada stock de nanopartículas a 10 mL de NaClO<sub>4</sub> (10 mM) libre de oxígeno. El pH de cada solución se ajustó añadiendo HCl (0,1 M) o NaOH (0,1 M) libres de oxígeno para alcanzar



diferentes valores de pH que variaron de 3 a 10. Las muestras se sonicaron durante 2 min antes de las mediciones. Se realizaron nueve réplicas por medición.

### **3.3. Análisis de suimiento de nanopartículas (NTA)**

Las diferentes nanopartículas (BMNPs, PC-BMNPs, DOXO-BMNPs y PC-DOXO-BMNPs) se caracterizaron por Nanoparticle Tracking Analyses (NTA) que utiliza las propiedades de la dispersión de la luz y el movimiento browniano, midiendo las trayectorias de los objetos dispersos individuales que se observan bajo un microscopio y su desplazamiento relacionado con el tamaño de cada objeto, para obtener la distribución del tamaño de partícula en suspensión líquida. Como el DLS, el NTA obtiene el tamaño de las partículas a partir de la medida del coeficiente de difusión. Sin embargo, el NTA proporciona mayor resolución de los picos (permitiendo un mayor análisis de la polidispersidad) e información sobre la agregación. Este análisis se realizó en un Malvern NanoSight NS500 equipado con un láser He-Ne ( $\lambda = 642$  nm) con un ángulo de dispersión de  $100^\circ$  y una cámara SCMOS. La captura de video se realizó con un nivel de cámara, un obturador deslizante y una ganancia deslizante ajustada en 13, 800 y 350, respectivamente. Todas las muestras se diluyeron en tampón HEPES (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) y se midieron a 25 °C. Para cada muestra, se grabaron 3 cuadros de video de 30 s con 25 FPS. El análisis se llevó a cabo utilizando NTA 3.0 0064. Se realizaron seis réplicas por medición.

### **3.4. Método de Brunauer–Emmett–Teller (BET)**

Las isotermas de adsorción de nitrógeno de las BMNPs en polvo se obtuvieron a 77 K en un equipo TriStar 3000 (Micromeritics). Una alícuota de 50 mg de estas partículas se desgasificaron aproximadamente a 100 °C durante 4 h antes del análisis utilizando un sistema de desgasificación de muestras VacPrep 061 (Micromeritics). El área de superficie de las BMNPs se determinó utilizando el método de Brunauer–Emmett–Teller (BET).

## **4. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) + difracción de electrones del área seleccionada (SAED)**

Las distintas nanopartículas de magnetita formadas en ausencia (MNPs) y presencia de las proteínas MamC y Mms6 del magnetosoma (MamC-BMNPs, Mms6-BMNPs and Mms6-MamC-BMNPs) a distintas concentraciones, se observaron en microscopios electrónicos de alta resolución FEI TITAN G2 80-300 y HR-TEM Philips

CM200. TEM (HR-TEM). Los patrones de difracción de electrones del área seleccionada (SAED) se recolectaron utilizando una abertura de 10  $\mu\text{m}$ . Los espaciados  $D$  se midieron utilizando imágenes HR-TEM de 500 kX de aumento y la dirección cristalográfica se determinó utilizando datos de magnetita en el sitio web del Proyecto RRUFF (<http://rruff.info/ams/amcsd.php>).

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

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un analizador termogravimétrico SHIMADZU mod. TGA-50H con diseño de horno vertical y con una precisión máxima de 0,001 mg, que permitió observar la pérdida diferencial de peso de las muestras de MNPs o BMNPs con un peso inicial de  $\sim 10$  mg de sólido mientras se calentaban en una celda de albúmina bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  a una velocidad de 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta una temperatura final de 950  $^{\circ}\text{C}$ .

## **6. Medida de las propiedades magnéticas**

### **6.1. Ciclo de histéresis**

Las mediciones de magnetización se llevaron a cabo utilizando un magnetómetro superconductor de interferencia cuántica (SQUID) 5 T (Quantum Design MPMS XL). Bajo un suave flujo de argón, se depositaron entre 1-2 mg de MNPs o de BMNPs en polvo en una cápsula de policarbonato de doble pared y se sometieron a un campo magnético de hasta 50 kOe. Los ciclos de histéresis para cada tipo de nanopartículas se realizaron a 5 y 300 K.

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

Las mediciones de enfriamiento de campo cero (ZFC-W) y de enfriamiento de campo (FC-C) también se llevaron a cabo utilizando un magnetómetro superconductor de interferencia cuántica (SQUID) 5 T (Quantum Design MPMS XL). Bajo un suave flujo de argón, se colocó una cantidad dada de cada muestra (MNPs, MamC-BMNPs=BMNPs, PC-BMNPs, DOXO-BMNPs, PC-DOXO-BMNPs, DOXO-mAb-BMNPs, Mms6-BMNPs y Mms6-MamC-BMNPs) en polvo en una cápsula de policarbonato de doble pared. Las muestras se enfriaron a 5 K inmediatamente en un campo aplicado a cero para preservar la magnetización aleatoria de los nanocristales, después de lo cual se aplicó un campo magnético de 500 Oe y las muestras se calentaron hasta 300 K y luego desde 300 K hasta 5 K sin apagar el campo. Para permitir la comparación entre las diferentes nanopartículas, las curvas  $M$  (T) se normalizaron por la

cantidad (g) de cada muestra analizada y por el valor de magnetización de la muestra específica a 300 K. La temperatura de bloqueo (TB) es aquella por debajo del "bloqueo" de las partículas superparamagnéticas que ya no están equilibradas térmicamente, y se calculó como los valores máximos de magnetización de las curvas ZFC. La temperatura de irreversibilidad (Tirr), es aquella en la que las curvas ZFC y FC divergen, y se calcula como aquella en la que las diferencias entre los valores de FC-C y ZFC-W a una temperatura dada caen por debajo del error experimental (0,3% de la medición).

## **7. Hipertermia magnética**

### **7.1. Hipertermia producida por aplicación de campos magnéticos alternos**

Las pruebas de hipertermia se llevaron a cabo en 0,5 mL de suspensiones de DOXO-mAb-BMNPs (30 mg/mL) utilizando un generador de corriente alterna (rango de frecuencia 136 kHz-205 kHz, intensidad de campo máxima  $H_0 = 13 \text{ Ka m}^{-1}$ ). La corriente se pasó a través de una bobina de doble tubo de cobre de 5 vueltas (diámetro: 20 mm, longitud: 50 mm) enfriada a 20 °C. La temperatura de las muestras se midió cada 3 s mediante un termómetro Optocom Fotemp-4H (Alemania) con un sensor de fibra óptica TS3. A partir de la pendiente inicial de la variación de temperatura con el tiempo ( $dT dt^{-1}$ ), la tasa de absorción específica SAR ( $\text{W g}^{-1}$ ) se calculó (4):

$$SAR = \frac{CV_s}{m} \frac{dT}{dt} \quad (4)$$

donde C es la capacidad de calentar del volumen del medio (para el agua,  $C = 4,18 \text{ J mL}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ),  $V_s$  es el volumen de la muestra y m es la masa de material magnético en la muestra. Dado que la respuesta de hipertermia también depende de la frecuencia f y la fuerza  $H_0$ , también se determinó la potencia de pérdida intrínseca (ILP,  $\text{nHm}^2 \text{ kg}^{-1}$ ) (5):

$$ILP = \frac{SAR}{fH_0^2} \quad (5)$$

### **7.2. Liberación de DOXO causada por hipertermia magnética**

El efecto de la hipertermia en la liberación de DOXO de las BMNPs se analizó aplicando un campo magnético de corriente alterna a las suspensiones de DOXO-BMNPs resuspendidas en solución de ácido cítrico de sodio 0,1 M, pH 5. Se prepararon muestras idénticas que se mantuvieron en un baño termostático a 37 °C, para poder comparar con el efecto del pH ácido de manera independiente como control. La

liberación de DOXO se midió en diferentes intervalos de tiempo hasta 58 h y por triplicado. A cada tiempo específico, los complejos DOXO-BMNPs se separaron del sobrenadante mediante el uso de un imán y el tubo se rellenó con solución de ácido cítrico nueva para continuar con los siguientes tiempos. La intensidad del campo magnético se controló manualmente para garantizar una temperatura constante de  $43,0 \pm 0,5$  °C.

## **8. Carga superficial de las nanopartículas (Potencial $\zeta$ )**

Las mediciones de potencial  $\zeta$  de las nanopartículas (MNPs, BMNPs, DOXO-BMNPs, mAb-BMNPs, DOXO-mAb-BMNPs y PC-DOXO-BMNPs) se realizaron a 25 °C en un instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Instruments Ltd, U.K.), utilizando cubetas de poliestireno desechables, ya que incorpora un analizador que utiliza la dispersión de luz electroforética y proporciona valores de potencial  $\zeta$ , determinados a partir de mediciones de movilidad electroforética, aplicando la ecuación de movilidad de Helmholtz-Smoluchowski (Von Smoluchowski, 1921). Para ello, se añadieron 200  $\mu$ l de cada una de las muestras de nanopartículas o nanoensamblajes previamente citadas en tubos individuales para cada muestra, que contenían 10 mL de NaClO<sub>4</sub> (10 mM) libre de oxígeno. El pH de cada solución se ajustó añadiendo HCl (0,1 M) o NaOH (0,1 M) libres de oxígeno para alcanzar diferentes valores de pH, que variaron de 3 a 10 para MNPs, BMNPs y DOXO-BMNPs; 7,4 y 5 para mAb-BMNPs y DOXO-mAbs-BMNPs; y 7,4 para PC-BMNPs y PC-DOXO-BMNPs. Las muestras se sonicaron durante 2 min antes de las mediciones. Se realizaron nueve réplicas por medición. Los valores de potencial  $\zeta$  se calcularon utilizando el software Malvern Zetasizer (Malvern Instruments, Reino Unido).

## **9. Determinación elemental de hierro y/o plomo unido a ESM y MESM**

### **9.1. Determinación directa**

#### **9.1.1. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)**

Se utilizó un espectrómetro FT-IR modelo 6600 typeA, Jasco Analytical Instruments, equipado con una ventana de cristal de diamante de reflexión total atenuada (ATR) (ATR Pro One, Jasco Analytical Instruments) para identificar los grupos funcionales de ESM, MESM y ESM incubadas con 310 ppm de Fe<sup>3+</sup> (correspondiente a la concentración en la reacción de biomineralización). Los espectros de infrarrojos se tomaron en modo de absorbancia de 400 cm<sup>-1</sup> a 4000 cm<sup>-1</sup> a una resolución de 2 cm<sup>-1</sup> y 72 escaneos.

### **9.1.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de presión variable - Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (VP-FESEM-EDX)**

La topografía de MESM, la morfología y el tamaño de las MNPs y el contenido de Pb en MESM después de su incubación se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de presión variable (VP-FESEM) utilizando un instrumento Zeiss SUPRA40VP. Cada trozo de MESM se colocó en un soporte para muestras de SEM (SEM pin stub specimen mount) y se recubrió con carbón. El instrumento VP-FESEM está equipado con un sistema de microanálisis de energía de dispersión de rayos X (EDX) que dispone de un detector de superficie grande de 500 mm X-Max para caracterización elemental.

### **9.1.3. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)**

Mediante XPS se analizó el contenido de Fe de MESM y ESM después de su incubación con una cantidad equivalente a la utilizada en la precipitación de magnetita. También se evaluó el contenido de Pb después de su adsorción en ESM y MESM. Estos análisis se realizaron con un espectrómetro fotoelectrónico de rayos X Kratos Axis Ultra-DLD. Este instrumento permite el análisis de la composición química de una región de la muestra de área de 300  $\mu\text{m}$  x 700  $\mu\text{m}$ , y 10  $\mu\text{m}$  de profundidad y la determinación del estado de oxidación de los elementos encontrados en ESM y MESM (antes y después de la adsorción de hierro y/o plomo) mediante la comparación de la energía de enlace característica (eV) de cada elemento en las bases de datos (<https://xpssimplified.com>).

## **9.2. Determinación indirecta**

### **9.2.1. Espectroscopía de absorción atómica (AAS)**

El contenido de plomo de los trozos de ESM y MESM, después de su incubación durante 48 h en soluciones de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  que contenían 25, 50 o 75 ppm de Pb, se determinó utilizando un espectrómetro de absorción atómica VARIAN SPECTRAA 140. La cantidad de plomo absorbido a ESM o el MESM se calculó como la diferencia entre la concentración inicial de Pb en la solución y la concentración final restante después del experimento de adsorción.

### **9.2.2. Espectrometría de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)**

Utilizando un espectrómetro ICP-OES PERKIN-ELMER OPTIMA 8300 (visión dual) se determinó el contenido de Pb adsorbido a una membrana de huevo completa (correspondiente a  $104 \pm 7 \text{ cm}^2$ ) magnética (MESM) después de su incubación en soluciones de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  que contenían 25, 50 o 75 ppm de Pb, a diferentes tiempos (1, 4, 8, 24 y 48 h). Además, después de la incubación con las soluciones de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , estas MESM se disolvieron en 35% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 65% de ácido nítrico 1:1 (v/v) para analizar su de manera directa el contenido en Fe por ICP-OES y determinar la concentración de MNPs adsorbidas a la ESM.

## **X. Estudio *in vitro***

### **1. Preparación de cultivos celulares**

#### **1.1. GTL-16 y Huh7**

Las células GTL-16, una línea celular derivada de carcinoma gástrico humano poco diferenciada que expresa Met ( $\text{Met}^+$ ), y las células Huh7 (proporcionadas por el Dr. H. Nakabayashi, Facultad de Medicina de la Universidad de Hokkaido, Japón), una línea celular de carcinoma hepático bien diferenciada negativa para Met ( $\text{Met}^-$ ), se utilizaron para analizar (1) la inmunocompetencia de los mAbs (como extractos celulares) solos y adsorbidos a las nanopartículas, (2) la captación celular de las nanopartículas funcionalizadas (microscopía óptica – azul de Prusia, microscopía de fluorescencia y citofluorimetría), y (3) la citotoxicidad de BMNPs, BMNPs-DOXO BMNPs-mAb y BMNPs-mAb-DOXO. Para ello, estas líneas celulares se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (FCS), 50 U/mL de penicilina y 50  $\mu\text{g}$  de estreptomina, a 37 °C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células se trasplantaron dos veces a la semana, cuando estaban en torno a 90-95% de confluencia.

#### **1.2. HUVEC, HeLa y KB-V1 multirresistentes**

Se cultivaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), ya que el epitelio endotelial es la primera barrera que las partículas deben atravesar cuando se inyectan de manera intravenosa; células KB-V1 humanas resistentes a múltiples fármacos (DSMZ no ACC 149) como línea de células tumorales resistentes a DOXO; y células de cáncer cervical (HeLa) humanas (ATCC® CRM-CCL-2) como línea tumoral modelo, a 37 °C con 5% de  $\text{CO}_2$  utilizando medio de crecimiento de células endoteliales

(EGM), medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 y medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), respectivamente. Todos ellos suplementados con un 10% de suero de ternera fetal (FCS), 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales. Las células se trasplantaron dos veces a la semana, cuando estaban entorno a 90-95% de confluencia.

### **1.3. Macrófagos primarios**

Los macrófagos humanos primarios se utilizaron como miembros representativos de células inmunes innatas. Se generaron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), aisladas mediante el uso de NycoPrep 1.077, de donantes sanos (con el permiso del Deutsches Rotes Kreuz, Berlín, Alemania). Después de tres fases de lavado y centrifugación, utilizando PBS libre de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  suplementado con 2 mM EDTA, los monocitos se separaron de las PBMC. A continuación, estos monocitos se cultivaron en medio de crecimiento completo (RPMI-1640 suplementado con 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina al 10% en suero de ternera fetal inactivada por calor y 20 ng/mL de factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF)) durante seis días a 37 °C con 5% de  $\text{CO}_2$ . El medio se sustituyó dos veces por medio fresco durante estos seis días.

### **1.4. 4T1**

Las células 4T1 (ATCC® CRL-2539™) son una línea celular de carcinoma de mama murino derivada de ratones BALB/cfC3H, que presentan un crecimiento tumoral y una diseminación metastásica en ratones BALB/c, simulando el estadio IV del cáncer de mama humano. Estas células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (FCS), 50 U/mL de penicilina y 50 µg de estreptomicina. Las células se trasplantaron dos veces a la semana, cuando estaban en un 90-95% de confluencia. Estas células se utilizaron para verificar (1) la captación celular de BMNPs (microscopía óptica – azul de Prusia) y de DOXO-BMNPs (microscopía de fluorescencia) en ausencia/presencia de un campo magnético; (2) la citotoxicidad de BMNPs y DOXO-BMNPs en ausencia/presencia de un campo magnético; (3) para los experimentos *in vivo*, ya que son el modelo perfecto para estudiar el cáncer de mama humano y al ser un tumor superficial facilita su tratamiento con un campo magnético externo (imán).

## **2. Interacciones celulares de las BMNPs**

### **2.1. Microscopía óptica (azul de Prusia)**

Se sembraron células (aproximadamente  $12 \times 10^3$  GTL-16,  $6 \times 10^3$  Huh7 y  $20 \times 10^3$  4T1 por pocillo) sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos y, después de 24 h, se añadieron 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de suspensiones de BMNPs o mAb-BMNPs. Después de su incubación a 37 °C durante diferentes tiempos: (a) 5 min, 15 min, 30 min, 1 h o 2 h para las BMNPs y mAb-BMNPs; (b) 5 s, 30 s, 1 min, 2,5 min o 5 min en ausencia o presencia de un campo magnético externo para las BMNPs, los cubreobjetos se lavaron con PBS fresco (pH 7.2) y se fijaron con paraformaldehído (2% en peso en PBS). A continuación se añadió a los cubreobjetos una solución de azul de Prusia (1:1 de ferrocianuro de potasio al 2% en  $\text{H}_2\text{O}$  y HCl al 2% en  $\text{H}_2\text{O}$ ). De esa manera, cualquier ion férrico (+3) presente en las muestras se combina con el ferrocianuro y da como resultado la formación de pigmentos azules brillantes llamados azul de Prusia o ferrocianuro férrico. Después de otros dos lavados con PBS fresco, se añadió Nuclear Fast Red para teñir los núcleos celulares. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con  $\text{H}_2\text{O}$  y se montaron en portaobjetos utilizando una gota de medio de montaje de endurecimiento rápido Eukitt para cada muestra. La interacción de las BMNPs teñidas con células se analizó mediante microscopía óptica a 100X.

### **2.2. Cuantificación del hierro por tiocianuro de potasio**

Se sembraron células (aproximadamente  $22 \times 10^4$  4T1/pocillo) en placas de 6 pocillos y, después de 24 h de incubación a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ , se añadieron 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de suspensiones de BMNPs en medio DMEM. Después de su incubación durante 5, 30, 60, 150, y 300 segundos en presencia y ausencia de un campo magnético, se eliminó el sobrenadante, se lavaron las células con PBS fresco, se tripsinizaron, se transfirieron a tubos de 0,5 mL y se centrifugaron a 1000 rpm, 5 minutos. Posteriormente, los pellet celulares formados se disolvieron en HCl al 37%, se mezclaron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 10% y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, las muestras se colorearon con 1 mL de tiocianuro de potasio al 1% en agua MilliQ, y se midió su absorbancia a 490 nm. La concentración de iones férricos, es decir, de BMNPs, se calculó con referencia a la absorbancia obtenida en una curva estándar realizada con las BMNPs solas. El hierro endógeno de las células se sustrajo de las muestras tratadas normalizándose la cantidad en base a la de las células control no tratadas.



### **2.3. Microcopía de fluorescencia**

Se sembraron células (aproximadamente  $12 \times 10^3$  GTL-16,  $6 \times 10^3$  Huh7 y  $20 \times 10^3$  4T1 por pocillo) sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos y, después de 24 h, se añadieron suspensiones de DO-24 mAb o DOXO soluble (como controles positivos), DOXO-BMNPs, mAb-BMNPs o DOXO-mAb-BMNPs. Después de su incubación a 37 °C durante diferentes tiempos: (a) 5 min, 15 min, 30 min, 1 h o 2 h para las BMNPs, mAb-BMNPs, DOXO-BMNPs y DOXO-mAb-BMNPs; (b) 30 s, 5 min o 30 min en ausencia o presencia de un campo magnético externo para las DOXO-BMNPs, los cubreobjetos se lavaron con PBS fresco (pH 7.2) y se fijaron con paraformaldehído (2% en peso en PBS). Para minimizar las interacciones inespecíficas y permeabilizar las células, los cubreobjetos se lavaron con solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía 5% de albúmina de suero bovino (BSA), 0,1% de Triton-X100 y 5% de suero de cabra y, posteriormente, se tiñeron. En concreto, los microfilamentos de actina citoesquelética se tiñeron con TRITC-faloidina (1/200, Sigma-Aldrich, excitación a 543 nm; emisión a 560-620 nm) o con FITC-faloidina (1/200, Sigma-Aldrich, excitación a 488 nm; emisión a 500-535 nm), los núcleos con TO-PRO-3 (1/70, Life Technologies; excitación a 633 nm; emisión a 650-750 nm), y los DO-24 mAb con IgG anti-ratón de conejo marcados con FITC (1/100, excitación con Abcam a 488 nm; emisión a 500-535 nm). La DOXO se detectó después de la excitación a 476 nm y la emisión a 575-630 nm. La fluorescencia se detectó utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS. Las imágenes se tomaron con un aumento de 400X. Se utilizó el software ImageJ para el análisis de las imágenes tomadas.

### **2.4. TEM**

Se incubaron células KB-V1 multirresistentes, HeLa, y 4T1 (aproximadamente  $10 \times 10^5$  células/pocillo) en frascos T25 durante 48 h. Terminado este tiempo, se añadieron 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (concentración comparable a la utilizada en el ensayo de citotoxicidad MTT) de BMNPs, PC-BMNPs, DOXO-BMNPs o PC-DOXO-BMNPs. Después de una incubación de (a) 5 h para las BMNPs, PC-BMNPs, DOXO-BMNPs o PC-DOXO-BMNPs y (b) 30 s, 1 h o 24 h en ausencia o presencia de un campo magnético externo para las BMNPs, las células se lavaron tres veces con tampón de cacodilato de sodio antes de la fijación con glutaraldehído al 2,5% durante 1 h. A continuación, las muestras se lavaron nuevamente tres veces con tampón de cacodilato

de sodio y se incluyeron en resina epon. Se cortaron secciones ultrafinas (50–70 nm), paralelas al eje vertical de las células, utilizando un microtomo Reichert Ultracut S (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Posteriormente, estas secciones se montaron en rejillas de cobre y se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo para su análisis por TEM. Además, los espectros de pérdida de energía de electrones (EELS) y las imágenes de Espectroscopía de electrones (ESI) se utilizaron para confirmar la visualización de las nanopartículas por detección de hierro.

### **2.5. Citofluorimetría**

Se llevaron a cabo análisis de citofluorimetría de flujo para cuantificar la cantidad de DOXO internalizada en células GLT-16, después de 15 min de incubación con DOXO-BMNPs. Las células GLT-16 (aproximadamente  $10^5$  células/pocillo) se incubaron en placas de 6 pocillos durante 24 h. Posteriormente, se añadieron 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de suspensiones de DOXO soluble, DOXO-BMNPs o DOXO-mAb-MNPs y se incubaron durante 15 min a 37 °C en presencia o ausencia de un campo magnético externo. Terminado este tiempo, las células se lavaron cuidadosa y extensamente con PBS fresco, se recuperaron después de la tripsinización, se centrifugaron, se fijaron con paraformaldehído al 1% (PFA) en PBS, pH 7.2, FBS al 2% y se analizaron en un citómetro de flujo Attune NxT 2018 (ThermoFisher). Antes del análisis, las partículas se eliminaron utilizando un imán.

## **3. Citotoxicidad**

### **3.1. Ensayo colorimétrico mediante bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT)**

Las células (aproximadamente  $5 \times 10^3$  4T1,  $12 \times 10^3$  GTL-16,  $6 \times 10^3$  Huh7 o  $10 \times 10^3$  HUVEC, HeLa y KB-V1 por pocillo) se incubaron en placas de 96 pocillos durante 24 h. Posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones (0,1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de DOXO soluble (como control positivo), BMNPs, DOXO-BMNPs, mAb-BMNPs, DOXO-mAb-BMNPs, PC-BMNPs o PC-DOXO-BMNPs a las placas en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . Se utilizaron cantidades equimolares de DOXO, soluble o adsorbida a las nanopartículas, así como de BMNPs. En paralelo, DOXO soluble (como control positivo), BMNPs o DOXO-BMNPs también se incubaron con células 4T1 en presencia de un campo magnético externo, utilizando una placa magnética debajo de las placas de 96 pocillos. Estas muestras se incubaron con las células durante 72 h a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ .

En otros experimentos, las células 4T1 también se incubaron con 100 µg/mL de DOXO-BMNPs pero durante períodos de tiempo más cortos (5, 30, 60, 150 y 300 s) en presencia y ausencia de un campo magnético externo. Estas muestras también se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

En otra serie de experimentos, aproximadamente 95 x 10<sup>4</sup> células 4T1 se transfirieron a un tubo de 0,5 mL y se añadieron suspensiones de 100, 300, y 500 µg de BMNPs en medio DMEM. A continuación, se expusieron a un campo magnético alterno (AMF, 130 kHz y 18 kAm<sup>-1</sup>) durante 20 minutos. Después de este tratamiento, las células se contaron utilizando trypan blue, se sembraron en placas de 96 pocillos (aproximadamente 10 x 10<sup>3</sup> 4T1/pocillo), y se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h.

Al final de cada tiempo específico de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT. Para ello se añadieron 20 µL de solución de MTT (5 mg/mL en PBS) a cada pocillo. A continuación la placa se incubó a 37 °C durante 2 h y los sobrenadantes se aspiraron cuidadosamente. Posteriormente, se agregaron 125 µL de HCl 0.2 N en isopropanol para disolver los cristales de formazán formados. Se retiraron cuidadosamente 100 µL y se midió la densidad óptica en un lector de múltiples pocillos (2030 Multilabel Reader Victor TM X4, PerkinElmer o Tecan Infinite M200 Pro) a 570 nm. La viabilidad de cultivos paralelos de células no tratadas se tomó como el 100% de viabilidad, y los valores obtenidos de las células sometidas a los diferentes tratamientos se normalizaron con este valor. Los experimentos se realizaron 3-5 veces utilizando 3 réplicas por cada muestra.

### **3.2. Ensayo a tiempo real (ExCelligence)**

Dado que el ensayo colorimétrico MTT solo produce datos a tiempo final, permitiendo verificar únicamente la tendencia de cada muestra, se realizaron experimentos de monitoreo ininterrumpido de la cinética de respuesta citotóxica de las BMNPs funcionalizadas en células vivas utilizando el instrumento ExCelligence. Este instrumento tiene un sensor que mide la impedancia eléctrica de la población celular en los pocillos. La medición de impedancia proporciona información cuantitativa a tiempo real sobre el estado de las células, incluyendo el número de células, la viabilidad y la morfología. Para estos experimentos, se sembraron células (aproximadamente 12 x 10<sup>3</sup> GTL-16/pocillo y 6 x 10<sup>3</sup> Huh7/pocillo) en placas apropiadas de múltiples pocillos durante 24 h. Después de este tiempo de incubación, se añadió 100 µg/mL de DOXO

soluble (como control positivo), BMNPs, DOXO-BMNPs, o DOXO-mAb-BMNPs, en cantidades equimolares de DOXO, soluble o adsorbida a las nanopartículas, en un volumen final de 100  $\mu$ L. Posteriormente, la impedancia de las células se monitorizó continuamente utilizando el instrumento ExCelligence durante 72 h.

### **3.3. Test de hemocompatibilidad**

La hemocompatibilidad se evaluó *ex vivo*, para lo cuál se obtuvieron 0,5 mL de sangre humana mediante punción intravenosa de un voluntario informado y se centrifugó (10 min, 3000 g). Los sobrenadantes se descartaron y los glóbulos rojos (RBC) se lavaron tres veces más con PBS para eliminar trazas de plasma, dejándose a una concentración de  $4 \times 10^9$  células/mL. Se prepararon diluciones seriadas (0,1-100  $\mu$ g/mL) de BMNPs (tratadas con UV o autoclavadas) y se mezclaron volúmenes de 0,5 mL de cada dilución con 25  $\mu$ L de suspensión de RBC. Las mezclas se incubaron a 25 °C, bajo agitación continua durante 10 min o 24 h y, posteriormente, se centrifugaron (5 min, 3000 g). La absorbancia de cada solución se midió a una longitud de onda de 540 nm y los valores se compararon con controles positivos (agua destilada) y negativos (PBS). También se prepararon frotis de sangre, después de la incubación de las células con las BMNPs y de retirar estas últimas con un imán. A continuación las células se lavaron con PBS, los frotis se prepararon y se tiñeron usando la técnica May-Grünwald Giemsa (MGG, Biolyon, Dardilly, Francia). Las muestras se analizaron mediante microscopía óptica (Nikon ECLIPSE Ci) y las fotos se tomaron con una cámara digital.

### **3.4. Detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Para medir el potencial estrés oxidativo en células vivas como consecuencia de la presencia de las BMNPs, se utilizó CellROX® Green Oxidative Stress Reagent (ThermoFisher) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las células (aproximadamente  $24 \times 10^3$  GTL-16,  $12 \times 10^3$  Huh7 y  $20 \times 10^3$  4T1 por pocillo) se sembraron en cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos. Después de su exposición a diferentes concentraciones de DOXO soluble (10 $\mu$ g/mL como control positivo), BMNPs, (0,1, 1, 10, 100  $\mu$ g/mL) o mAb-BMNPs (10, 100  $\mu$ g/mL) durante 4 h, las células se lavaron con PBS y se añadió CellROX® Green Oxidative Stress Reagent a una concentración final de 5  $\mu$ M en 300  $\mu$ l de medio DMEM sin suero. A continuación la placa se incubó en oscuridad a 37 °C durante 30 min. Después del tiempo de incubación, los cubreobjetos se lavaron con PBS (pH 7,2), se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS, se lavaron de nuevo y se permeabilizaron con Triton-

X100 al 0,1% durante 10 min. Finalmente, los cubreobjetos se tiñeron y montaron en portaobjetos de muestras (Biosigma). La actina del citoesqueleto se tiñó con TRITC-faloidina (1/200, Sigma-Aldrich, excitación a 543 nm; emisión a 560-620 nm) y los núcleos con TO-PRO-3 (1/50, Life Technologies, excitación a 642 nm, emisión a 650-750 nm). Se detectó DOXO después de la excitación a 476 nm y la emisión a 575-630 nm. CellROX® Green Oxidative Stress Reagent solo es fluorescente en el estado oxidado (como consecuencia de la producción de ROS). La emisión de fluorescencia verde (excitación máxima a 485 nm; emisión a 520 nm) es estable y se produce después de la unión al ADN y, por tanto, su señal se encuentra principalmente en el núcleo y en las mitocondrias. La fluorescencia se detectó utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS. Las imágenes se tomaron con un aumento de 400X o 630X. El software ImageJ se utilizó para el análisis.

### **3.5. Test de Anexina-V y yoduro de propidio (PI)**

Se sembraron células (aproximadamente  $300 \times 10^3$  GTL-16,  $150 \times 10^3$  Huh7 y  $200 \times 10^3$  macrófagos primarios por pocillo) en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 h. Después se añadieron diferentes cantidades de mAb-BMNPs (10 o 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), BMNPs o PC-BMNPs (1, 10 o 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y las células se incubaron durante 72 h (GTL-16 y Huh7) o 4 h (macrófagos primarios) a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Se utilizó peróxido de hidrógeno (30 mM) como control positivo. Las poblaciones de células necróticas y apoptóticas se identificaron mediante su tinción con yoduro de propidio (PI) y anexina V. La anexina V se conjuga con un fluorocromo (FITC) que se une a los sitios en la fosfolípido fosfatidilserina, que se transloca desde la parte interna a la lámina externa de la membrana plasmática, siendo este proceso una de las indicaciones más tempranas de apoptosis. PI es una contratinción cromosómica y nuclear fluorescente roja, que no se aplica a las células vivas. Por eso se utilizó para detectar células necróticas en la población. Se analizaron al menos 100 000 células por muestra en un citómetro de flujo FACScan o un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter) equipados con un láser de argón. Para ello las células y los sobrenadantes se recuperaron, se centrifugaron y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con 2  $\mu\text{l}$  de anexina V-FITC (Enzo Lifesciences, 100 nM) y 5  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio (PI, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) disuelto en 93  $\mu\text{L}$  de tampón (10 mM HEPES-NaOH, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4) en oscuridad. Los experimentos se realizaron por triplicado, utilizándose 3 réplicas por muestra.

## **XI. Estudio *in vivo***

### **1. Biocompatibilidad y biodistribución**

Se inyectaron 10 µg de BMNPs/g de peso de ratón diluidos en un volumen final de 100 µL de PBS estéril en quince ratones BALB/c en la vena de la cola. Los animales se monitorizaron cada dos días hasta 2 meses y se subdividieron en 5 grupos, que diferían sólo en el momento de la eutanasia (de 1 h a 2 meses). Para cada grupo, compuesto por 3 ratones, se incluyó un ratón control sin tratar. Sus órganos se recolectaron, se fijaron, se embebieron en parafina y se procesaron para su análisis histológico. Las secciones seriadas se tiñeron con azul de Prusia y hematoxilina-eosina (Sigma Aldrich) y se sometieron a evaluación histológica por un patólogo independiente no informado de la identidad de cada muestra. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de conformidad con la Directiva de la Comunidad Europea para el Cuidado y las Leyes Italianas sobre la experimentación con animales (Ley por Decreto 116/92).

### **2. Orientación magnética y actividad antitumoral**

Se indujeron tumores en 30 ratones hembras BALB/c mediante inyección subcutánea de  $10^5$  células 4T1 en la bolsa de grasa de la glándula mamaria. Cuando los tumores fueron palpables (10 días después de la inoculación celular), los ratones se dividieron en seis grupos diferentes con volúmenes tumorales comparables entre ellos. Los seis grupos se inyectaron por vía intravenosa y se trataron de la siguiente manera: (1) PBS (control negativo), (2-3) BMNPs +/- campo magnético, (4-5) DOXO-BMNPs +/- campo magnético, y (6) DOXO soluble. Se inyectó cinco veces a los ratones con una dosis de 2 mg/kg de peso corporal de DOXO soluble o adsorbida a las BMNPs o dosis comparables de BMNPs cada 3 a 4 días y, en el caso de tratamiento magnético, después de cada inyección se aplicó un campo magnético externo a los ratones durante 1 h. El campo magnético se aplicó adhiriendo una moneda de neodimio de alto momento magnético con un adhesivo de tejido 3MTM Vetbond™ en el sitio del tumor, y manteniéndola unida durante 1 h después de la inyección. Este imán de neodimio, con una anisotropía magnética normal al plano y una saturación de magnetización de 800 emu/cc, puede generar un campo magnético de corriente continua del orden de 100 Oe a unos pocos milímetros de la superficie. Por lo tanto, el efecto del imán es equivalente a la aplicación de un campo magnético local externo de corriente continua de 100 Oe inmediatamente después de la administración de las nanopartículas. A lo largo del estudio, los volúmenes tumorales (medidos con calibre) se registraron cada 3-4 días.

Finalmente, tres días después de las últimas inyecciones (día 15), los ratones se sometieron a eutanasia, se evaluaron sus pesos y los pesos de los tumores y se recogieron los tumores y distintos órganos (corazón, hígado, bazo, cerebro, pulmones y riñones) y se prepararon secciones histológicas de los tumores para su tinción con hematoxilina-eosina y azul de Prusia para, posteriormente, analizar la biodistribución de las partículas.

### **3. Hipertermia mediante campo magnético alterno y actividad antitumoral**

Se indujeron tumores en 36 ratones hembras BALB/c mediante inyección subcutánea de  $10^5$  células 4T1 en la bolsa de grasa de la glándula mamaria. Después de ~ 15 días de la inoculación celular, cuando las dimensiones del tumor eran ~  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se dividieron en 6 grupos diferentes con volúmenes tumorales comparables entre los grupos. Los 6 grupos se inyectaron por vía intratumoral y se trataron de la siguiente manera: i) PBS (control), ii-iii) DOXO-BMNPs +/- campo magnético alternante, iv-v) BMNPs +/- campo magnético alternante, y vi) DOXO soluble. Los ratones se inyectaron solo una vez al comienzo del tratamiento (día 0) con una dosis de 3 mg de BMNPs/ratón, equivalente a 80  $\mu\text{g}$  de DOXO para los grupos de DOXO soluble y DOXO-BMNPs. Después de cada inyección, algunos grupos se expusieron a un AMF (130 kHz y  $18 \text{ kAm}^{-1}$ ) durante 20 minutos inmediatamente después de la administración de las nanopartículas. A lo largo del estudio, los volúmenes de tumores se midieron con calibre cada dos días. Finalmente, cinco días después del tratamiento, los ratones se sometieron a eutanasia y se registró el peso de los tumores.

## **XII. Análisis estadísticos**

Para todos los resultados obtenidos en esta Tesis se realizaron análisis estadísticos ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni o de Tukey para análisis agrupados utilizando GraphPad Prism versión 4.03 (San Diego, CA). Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se consideraron significativas cuando los valores de p fueron  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

## **RESULTADOS**



## **Chapter I. Tuning properties of biomimetic magnetic nanoparticles by combining magnetosome associated proteins**

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

\* Corresponding author

<sup>1</sup>Department de Microbiología, Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18002 Granada, Spain

<sup>2</sup>Department de Química Física, Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18002 Granada, Spain

### **Abstract**

The role of magnetosome associated proteins on the *in vitro* synthesis of magnetite nanoparticles has gained interest, both to obtain a better understanding of the magnetosome biomineralization process and to be able to produce novel magnetosome-like biomimetic nanoparticles. Up to now, only one recombinant protein has been used at the time to *in vitro* form biomimetic magnetite precipitates, being that a scenario far enough from what probably occurs in the magnetosome. In the present study, both Mms6 and MamC from *Magnetococcus marinus* MC-1 have been used to *in vitro* form biomimetic magnetites. Our results show that MamC and Mms6 have different, but complementary, effects on *in vitro* magnetite nucleation and growth. MamC seems to control the kinetics of magnetite nucleation while Mms6 seems to preferably control the kinetics for crystal growth. Our results from the present study also indicate that it is possible to combine both proteins to tune the properties of the resulting biomimetic magnetites. In particular, by changing the relative ratio of these proteins, better faceted and/or larger magnetite crystals with, consequently, different magnetic moment per particle could be obtained. This study provides with tools to obtain new biomimetic nanoparticles with a potential utility for biotechnological applications.

**Keywords:** magnetite nanoparticles; MamC; magnetotactic bacteria; nanocarriers; DOXO.

## Introduction

Magnetotactic bacteria form an ubiquitous and heterogeneous group of prokaryotic microorganisms that possess an unique organelle, the magnetosome, formed by a magnetic mineral [magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) or greigite ( $\text{Fe}_2\text{S}_4$ )] surrounded by a lipid bilayer.<sup>1-4</sup> Magnetosomes constitute the ideal magnetic nanoparticles<sup>5</sup> that could be used in numerous nanotechnological applications in which they show important advantages over other type of nanoparticles. Among these applications are the detection of nucleotidic polymorphism,<sup>6,7</sup> cell separation,<sup>8</sup> DNA isolation and purification,<sup>9</sup> contrast agent in magnetic resonance imaging [MRI],<sup>10</sup> early diagnosis, drug transporter/carrier for a targeted chemotherapeutic treatment<sup>11</sup> and hyperthermia cancer treatments, understanding by that thermal damage induced by dipolar magnetic interactions.<sup>12-14</sup>

However, the massive production of magnetosomes cannot be done up to date because of the difficulties scaling up the culture of magnetotactic bacteria, being that the bottleneck for the application of magnetosomes in nanotechnology. In this context, one of the proposed alternatives to *in vitro* produce magnetosome-like magnetic nanoparticles without the need of cultivating magnetotactic bacteria is biomimetic, i.e the *in vitro* production of magnetosome-like magnetic nanoparticle mediated by magnetosome associated proteins (MAPs), which are crucial for the *in vivo* magnetosome formation.<sup>5,15-17</sup> The ability of some of these MAPs, expressed as recombinant proteins, to *in vitro* control magnetite nucleation and/or crystal growth has been showed by several authors.<sup>18-30</sup> In fact, magnetite crystals formed *in vitro* in the presence of these proteins are distinct to those formed in their absence under identical conditions and they present some magnetosome-like features. Mms6, MamD (Mms7), MamC (Mms13), MamG (Mms5) and MmsF are MAPs already identified as candidates to *in vitro* produce biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs).<sup>15,16,31,32</sup> 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>18-22,24,25,27,28</sup> MamC from *Magnetococcus marinus* MC-1<sup>26,29,33</sup> and MmsF from *Magnetospirillum magneticum* AMB-1<sup>31</sup> have also been studied, although in a much

less extent. Therefore, and although those proteins have been showed to individually control the size and/or the morphology of the resulting magnetite precipitated *in vitro*, only one protein was introduced at the time in the reaction mixture from which magnetite was precipitating and the combined effect of introducing mixtures of them in the same precipitation reaction has not been yet tested. Combining different proteins in *in vitro* experiments creates an scenario probably closer to that of the magnetosome in which there are high chances that several magnetosome proteins are simultaneously involved in the nucleation and growth of the magnetite crystals. Therefore, it may open new ways to tune some properties like size, morphology and, consequently, magnetic moment of the resulting biomimetic nanoparticles. Consequently, the goal of this paper is to determine the effect of introducing two MAPs, Mms6 and MamC from *Magnetococcus marinus* MC-1, expressed as full length recombinant proteins, at different ratios in the reaction mixture from which magnetite precipitates, being the first time in which two proteins from the same magnetotactic bacteria have been introduced in the same reaction mixture.

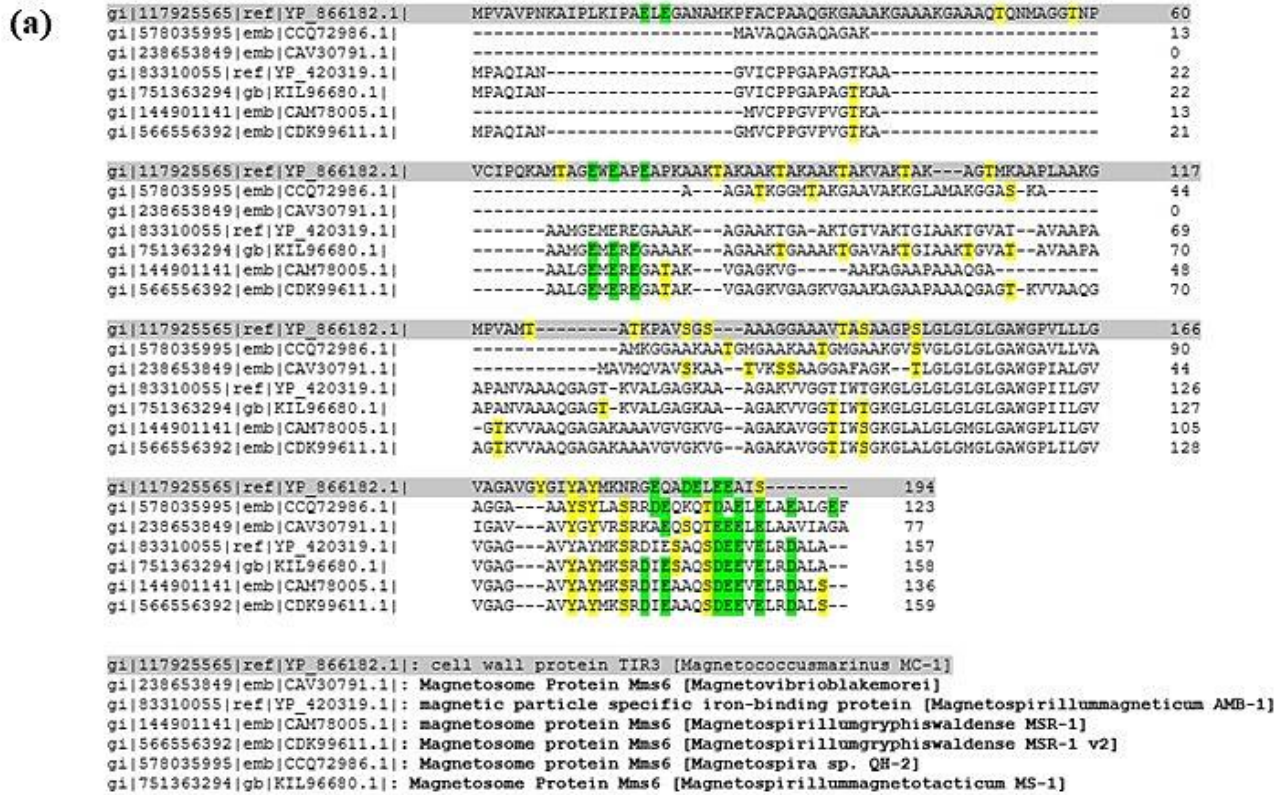
MamC was chosen because it is the second most abundant protein in the known magnetotactic bacteria<sup>34,35</sup> and, moreover, its effect on the size and shape on magnetite crystals grown *in vitro* in the presence of this protein was previously demonstrated.<sup>26,29,30</sup> Mms6 has been identified as the most abundant magnetosome protein<sup>35</sup> and, moreover, Mms6 from AMB-1 has been extensively used in *in vitro* magnetite precipitation experiments by several groups.<sup>18–22,24,25,27,28</sup> However, this is the first time that Mms6 from *Magnetococcus marinus* MC-1 is expressed as recombinant protein, purified and used to *in vitro* precipitate magnetite.

## **Results**

### ***In silico* analysis of the magnetosome associated protein Mms6**

Being the first time that Mms6 from MC-1 was purified, a multiple sequence alignment of this Mms6 with other homologous proteins from other magnetotactic bacteria was done for comparison. The analyses show similarities in the C-terminal domain of all Mms6 homologous proteins compared (Figure 1a). This C-terminal is rich in acidic amino acids (aspartate and glutamate) and in amino acids containing hydroxyl groups (tyrosine, threonine and serine), which can bind metal cations. As in the other Mms6 homologous, Mms6 from MC-1 has one predicted transmembrane region, and a

high grade of hydrophobicity due to the transmembrane  $\alpha$ -helix and the N-terminal region (Figure S1a).



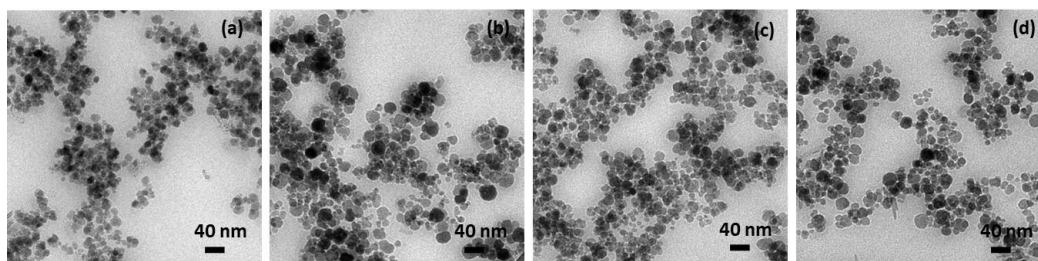
**Figure 1.** (a) CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment of Mms6 protein in different magnetotactic bacteria. Negatively charged amino acids (Asp, Glu) are marked in green and amino acids containing hydroxyl groups (Tyr, Thr, Ser) in yellow. (b) Circular dichroism (CD) spectra in the far-UV (190–250 nm) of Mms6 protein.

## Purification of MamC and Mms6 proteins and characterization of Mms6

SDS-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) of MamC and Mms6 show intense bands with a high grade of purity (>90%) and a migration pattern corresponding to the theoretical molecular weight values calculated (17.46 and 22.5 KDa for MamC-His and Mms6-His, respectively; Figure S1b). Figures S2a and S2b show the identity of Mms6 protein confirmed by peptide mass fingerprinting (PMF) (Figure S2a) and peptide fragmentation (PFF) (Figure S2b) by MALDI-TOF/TOF. The CD spectrum presents a minimum at 197 nm, which is characteristic of proteins with high random coil or unstructured content (Figure 1b).

## Analysis of Mms6-MamC mediated magnetite nanoparticles

The solids formed in all the biomineralization experiments were identified as magnetite using XRD. TEM analysis of the magnetite particles produced in MamC-buffer experiment (Figure 2a), Mms6-buffer experiment (Figure 2b), empty-vector experiment (Figure 2c) and inorganic control experiment (Figure 2d) show similar crystal sizes of  $16 \pm 6$  nm. Also, no differences in morphology were observed either, being the particles poorly faceted. Therefore, the potential differences on the crystal size and/or morphology observed on the magnetites collected from the protein-bearing experiments should be solely attributed to the proteins involved.

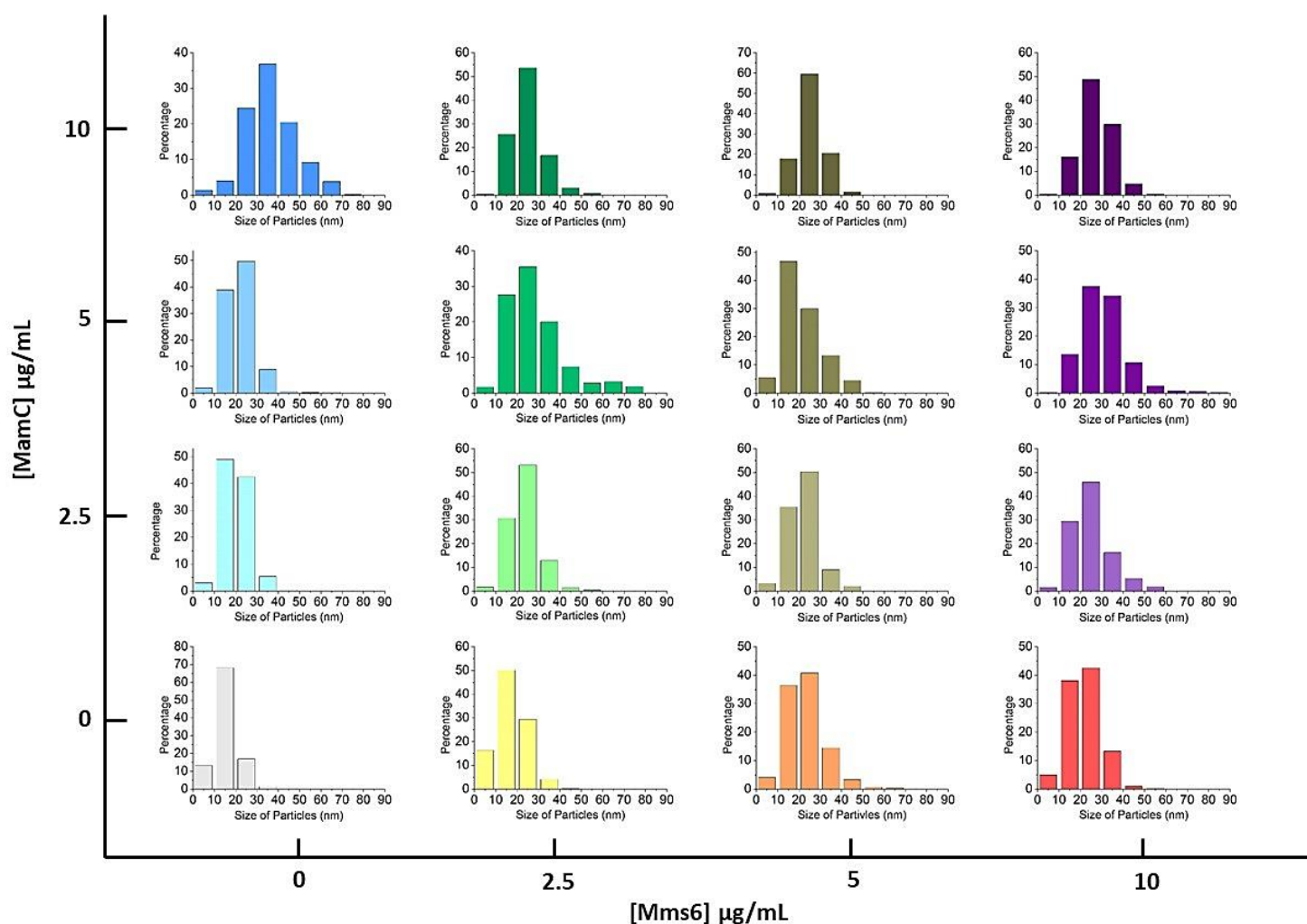


**Figure 2.** TEM images of magnetite formed in: (a) MamC-buffer experiments, (b) Mms6-buffer experiments, (c) empty-vector experiments and (d) inorganic (protein free) experiments.

TEM images of the Mms6-mediated magnetites show differences in size and shape with respect to those from the inorganic control experiments, depending on the concentration of Mms6 in solution (Figure S3). At Mms6 concentration of  $2.5 \mu\text{g/mL}$ , non-faceted crystals of  $17 \pm 7$  nm similar to those from the control experiments precipitated from solution. However, at Mms6 concentrations of 5 and  $10 \mu\text{g/mL}$ , magnetite crystals had uniform polyhedral morphologies with well-faceted faces and



sizes of ~23 nm, which are significant larger than those of magnetites obtained from the inorganic control experiment (Figures 3, S3 and S4a). By adjusting the average size of the magnetite crystals versus the relevant protein concentration (Figure S4b-c), regression lines and slopes were determined. The size of the magnetite crystals formed in the presence of solely Mms6 increased at a rate of 1.58 nm per  $\mu\text{g/mL}$  of Mms6 ( $R^2 = 0.6803$ ) up to  $[\text{Mms6}] = 10 \mu\text{g/mL}$  (Figure S4b). In the context of MamC, magnetite crystals formed in the sole presence of 2.5  $\mu\text{g/mL}$  and 5  $\mu\text{g/mL}$  of this protein had sizes of  $20 \pm 6 \text{ nm}$  and  $22 \pm 7 \text{ nm}$ , respectively. At 10  $\mu\text{g/mL}$  of MamC, magnetite crystals displayed well-developed crystal faces and sizes of  $37 \pm 12 \text{ nm}$  (Figures 3, S3 and S4a). In this case, the rate of the increase of the size of the crystal with respect to the concentration of MamC was 4.42 nm per  $\mu\text{g/mL}$  ( $R^2 = 0.799$ ) (Figure S4c).



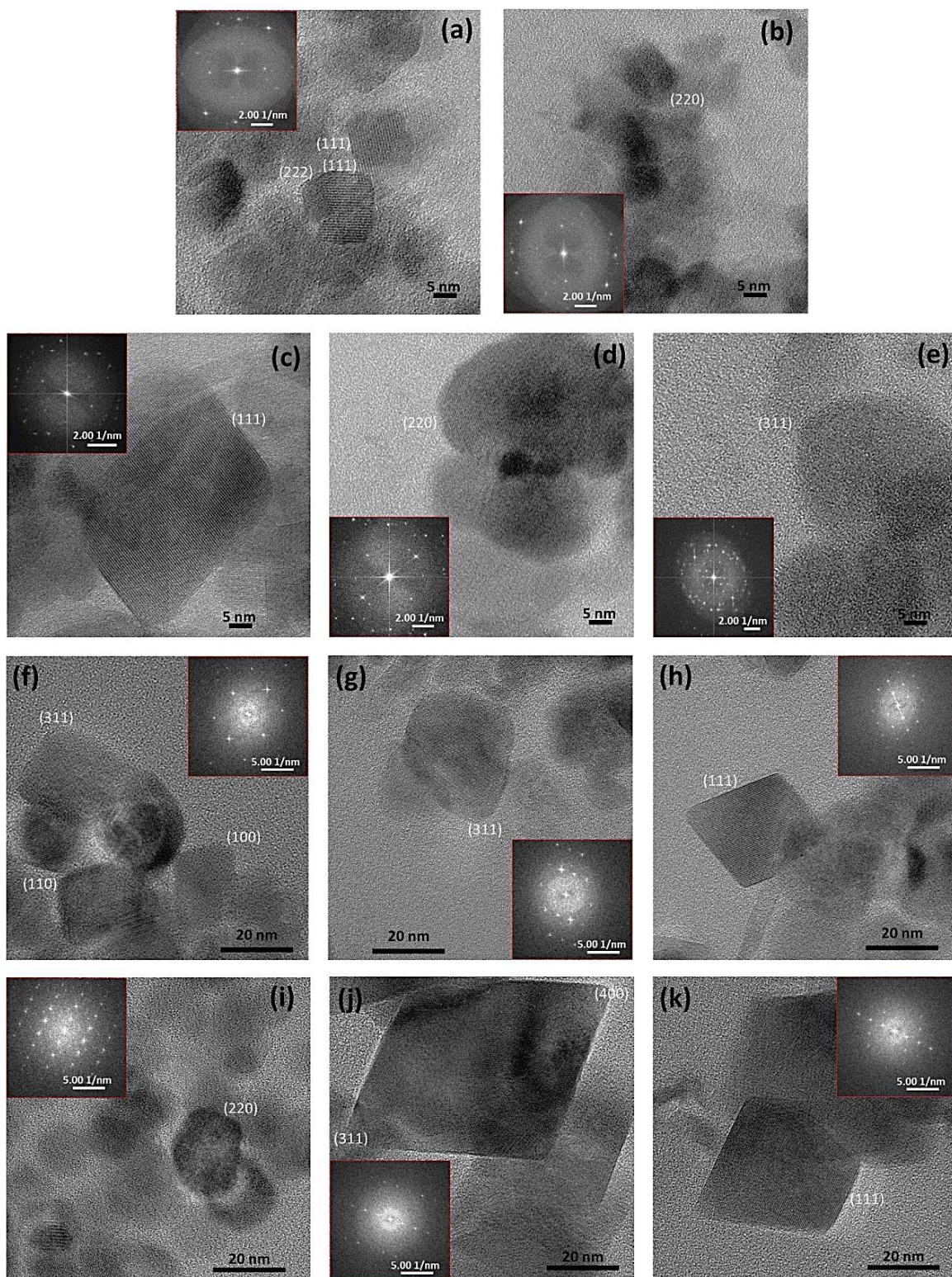
**Figure 3.** Size distribution histograms of particles obtained in MamC-experiments, Mms6-experiments, and Mms6-MamC-experiments.

When both MamC and Mms6 were present in the reaction solution, cumulative effects from both proteins were observed, since, as it was shown, crystals obtained in the presence of both proteins were different in size and/or morphology than those obtained in the presence of each one of these proteins separately or if no protein was present (Figures 3, S3 and S4a). In fact, magnetite crystals collected from these experiments displayed better faceted morphologies and/or larger sizes compared, not only to crystals from the inorganic control experiment, but also to crystals collected from experiments in which only one of the proteins was present. At low concentrations of Mms6 (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ), the size of the crystals increased with the concentration of MamC up to  $[\text{MamC}] = 5 \mu\text{g/mL}$  (Figure 3 and S4b-c). This trend is identical to that observed at the highest concentration of Mms6 (10  $\mu\text{g/mL}$ ). However, at  $[\text{Mms6}] = 5 \mu\text{g/mL}$  no change in the size of the crystals was observed independently of the concentration of MamC in the solution. The larger crystals are obtained at MamC concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$  + Mms6 concentration of 10  $\mu\text{g/mL}$ . At higher MamC/Mms6 ratios, crystal size decreases, being this decrease statistically significant (Table S2). It is interesting to notice that the averages for crystal sizes obtained by introducing only MamC in the reaction mixture at a given concentration are always (with the exception of comparing  $[\text{MamC}]$  and  $[\text{Mms6}]$  at 5  $\mu\text{g/mL}$ ) statistically different than those obtained when Mms6 is individually introduced at identical concentration or the mixture of MamC+Mms6 at a total protein concentration that matches that of the individual MamC (Table S2). This result seems to indicate that MamC and Mms6 affect the nucleation and growth processes differentially.

HRTEM images show that crystals obtained from the inorganic control experiments have a square and rhombic 2-D shapes bounded by (111) face and a few crystals showed rounded corners corresponding to incipient (110) crystal face (Figure 4a-b). MamC-mediated nanoparticles expressed the (111) crystal face with rounded corners corresponding to nascent (110) and (311) crystal faces (Figure 4c-e). In this case, crystals appeared elongated along [111] direction. Crystals obtained in the presence of Mms6 protein also showed rhombic, rectangle and hexagon shapes bounded by (111) crystal face and rounded corners corresponding to (311), (110) and (100) crystal faces (Figure 4f-h). These crystals were elongated as well along the [111] direction. Nanoparticles obtained at 5  $\mu\text{g/mL}$  of MamC and 10  $\mu\text{g/mL}$  of Mms6 expressed the same faces listed above [(111), (110), (311) and (100)], crystals also



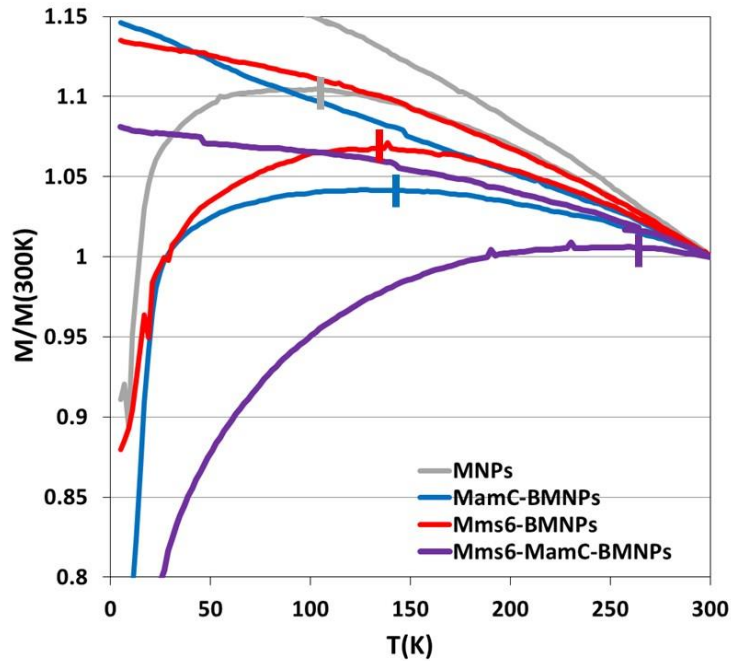
elongated along [111], but in this case shapes and corners were the best defined of all experiments.



**Figure 4.** HRTEM images of (a,b) inorganic magnetite nanoparticles, (c-e) MamC-magnetite nanoparticles, (f-h) Mms6-magnetite nanoparticles and, (i-k) MamC-Mms6-mediated nanoparticles. Selected areas electron diffraction are shown for each sample.



ZFC-FC curves at 500 Oe show differences between the different biomimetic and inorganic magnetic nanoparticles (Figure 5). The slowest increase in magnetization was found in Mms6-MamC-BMNPs while the faster increase occurred in the inorganic (protein-free) experiments (MNPs). Moreover, the blocking temperature and the irreversibility temperature of the different biomimetic particles and those of MNPs are also different. The lowest  $T_B$  (103K) and  $T_{irr}$  (274K) correspond to MNPs, then to Mms6-BMNPs, then MamC-BMNPs while the largest  $T_B$  (260K) and  $T_{irr}$  (296K) correspond to Mms6-MamC-BMNPs. This slow magnetization increase and higher  $T_B$  and  $T_{irr}$  is consistent with particles with high crystallinity and a large magnetic moment per particle, also consistent with a less polydisperse magnetic moment.<sup>5</sup>



**Figure 5.** ZFC-W and FC-C of inorganic magnetites (MNPs), MamC mediated biomimetic nanoparticles (MamC-BMNPs), Mms6 mediated biomimetic nanoparticles (Mms6-BMNPs) and Mms6+MamC mediated biomimetic nanoparticles (Mms6-MamC-BMNPs).

## Discussion

It seems clear from these results that both MamC and Mms6 alter the kinetics of magnetite nucleation and growth. In fact, the size of the magnetite crystals formed in the presence of either each protein individually, or in the presence of a combination of both proteins, is significantly larger than that of the crystals obtained in the absence of any protein and, also, the combination of both proteins results in magnetite crystals different in size and/or morphology than those formed in the presence on any of these proteins individually. Moreover, both proteins affect such a kinetic differentially, since the presence of MamC has a greater effect on the size of the crystals compared to that of Mms6. This output was also observed by Nudelman *et al.* (2018).<sup>36</sup>

In the context of the individual effect of each protein on the *in vitro* magnetite nucleation and growth, Nudelman and Zarivach<sup>15</sup> predicted that the secondary structure of Mms6 from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 shows an unstructured N-terminal with a transmembrane region and an acidic C-terminal, which may form an  $\alpha$ -helix structure, which is exposed to the magnetosome lumen and, thus, it would be able to interact with the magnetite crystal. In fact, several studies have demonstrated that the C-terminal of Mms6 from AMB-1 controls the size and morphology of *in vitro* synthesized magnetite.<sup>19,22,28,37</sup> Acidic amino acids [Asp123, Glu124, Glu125<sup>38</sup>] are claimed to be responsible for such a control through iron binding. Some of these amino acids (Asp12 and Glu13) have been identified in Mms6-MIC as strong iron binders with a low dissociation constants (Kd).<sup>36</sup> Although these studies have been performed with Mms6 proteins from *Magnetospirillum magnetotacticum* AMB-1,<sup>18-22,24,25,27,28</sup> our multiple sequence analysis show that this C-terminal is relatively conserved into different species (Figure 1a). In fact, in the context of MC-1, the C-terminal of Mms6 has 3 tyrosines, 4 glutamic acids, 1 aspartic acid, and 1 serine that can bind metal cations.<sup>39</sup> These acidic amino acids (glutamic and aspartic acids) are present in the C-terminal of all the sequenced Mms6 proteins, only varying the number of them (between 5 and 7) among the different homologous proteins (Figure 1a). In this case, the percentage of negatively charged amino acids is 17.9% of the total amino acids of the C-terminal and, as proposed by previous authors, those acidic amino acids may bind Fe cation, being Asp12, Glu13, Glu16, and Asp19 (in Mms6-MIC peptide) specially relevant in terms of Kd ( $0.21 \text{ mM} \pm 0.12 \text{ mM}$  for  $\text{Fe}^{2+}$ ).<sup>36</sup> Such binding results in a local increase of the supersaturation of the system with respect to magnetite and, thus, the

nucleation of such a phase is induced in those specific areas due to an ionotropic effect.<sup>18,19,22,28,37,38,40</sup>

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*. On one hand, MamC from MC-1 contains 5 amino acids negatively charged that represent 15.6% of the total amino acids of the loop. Moreover, Nudelman *et al.* (2018)<sup>36</sup> identified in MamC-MIC two residues with special affinity for Fe<sup>2+</sup>: Asp14, which corresponds to the Asp70 of the full length protein from AMB-1 (NCBI reference: WP\_011383388.1), a residue that was already known to play a role in magnetite nucleation and binding,<sup>29</sup> and Gly16. Therefore, as in the case of Mms6, ionotropic effects could induce magnetite nucleation on those specific negatively charged areas. However, some authors<sup>29,30,41</sup> also claim a template effect that rules magnetite nucleation based on: a) the distance between the Glu66 and Asp70 (8 Å) is similar (within the helix elasticity) to the 6 Å distance between the Fe cations in specific crystal faces, namely (111), (100), (110) and (311), that become expressed in the final morphology of MamC-mediated magnetites, and b) when MamC was not correctly folded, the size of the resulting crystals was equal to that from crystals precipitated in protein-free experiments, so an extended protein structure was needed for MamC to control the size and/or morphology of magnetite.

In the protein-free experiments, and since the system is supersaturated with respect to magnetite [ $\log\Omega_{\text{magnetite}} = 22.57^{26}$ ] bulk nucleation occurs, giving rise to the formation of a large number of crystals with small size, probably being the restricted concentration of Fe cation the limiting step for crystal growth. Different is the scenario when the proteins are present, since, by providing nucleation sites, magnetite nucleation is kinetically favored with respect to bulk nucleation (either due to the ionotropic and/or template effects<sup>42</sup>) and, therefore, less nuclei form than can grow to larger sizes compared to those formed in the protein-free experiment. However, and since the concentration of Fe in solution is limited, such a phenomenon could be reversed if the number of nucleation sites is too large, so, at some point, those nuclei cannot grow any further because there is no more Fe available in solution. This explains why magnetite crystals produced in the experiments containing the highest protein concentrations (especially MamC) were smaller than those grew at lower protein concentrations (Figure 3, S3 and S4a). These results are in agreement with the trend observed by Valverde-Tercedor *et al.* (2015).<sup>26</sup>

Our observations that MamC and Mms6 affect crystal size and morphology differently have previously been observed also by Nudelman *et al.* (2018)<sup>36</sup> working with MamC and Mms6 peptides (MamC-MIC and Mms6-MIC). These authors observed that the MamC-MIC showed the weakest binding of ions but, however, created the most significant effect in enhancing magnetite particle size. Instead, the strong ion binder Mms6-MIC had almost no effect in modulating magnetite particle size. These authors concluded that the strong ion-binding affinity of Mms6 might be critical for nucleation by ionotropic effect while MamC mainly contributes modulating magnetite particle size and shape and potentially recognizing particles. Therefore, these authors suggest that the regulation of magnetite particle formation and the recruiting of metal ion could be decoupled.

Our interpretations fall along this suggestion with some modifications. According to the results of Berczk-Tompa *et al.* (2017)<sup>43</sup> and being the iron binding by negatively charged amino acids (in extended surfaces) a less specific process than the binding of previously formed nuclei, magnetite nucleation induced by the ionotropic effect is probably kinetically favoured in the case of MamC.<sup>44</sup> HRTEM images of MamC-mediated magnetite crystals in Lopez-Moreno *et al.* (2017)<sup>30</sup> showing that they are single crystals with no discontinuities in the crystal lattices also supports this hypothesis versus the oriented aggregation of previously formed nuclei.

The question then remains what effect is kinetically more favourable for nucleation under the conditions of the present study, whether it is template effect (MamC) or ionotropic effect (mainly Mms6 but also MamC in a less extent). Under the limited iron conditions in which our experiments were run, if Mms6 was controlling nucleation by ionotropic effect, then, a given concentration of this protein would determine the number of nuclei that form and, in turn, being the iron concentration in the solution limited, the size of the crystal would be inversely related to the number of nuclei. As a consequence, Mms6 should have had an important role controlling the size of the crystal. Conversely, it was MamC, and not Mms6, the protein that had more input determining the size of the crystals. Several studies<sup>26,29,30,41,44,45</sup> have shown the effect of MamC on the size of the magnetite crystals formed in the presence of the protein and had demonstrated the importance of the conformation of MamC loop in properly controlling such a size. Therefore, the template effect, rather than the ionotropic effect seems to stand as the key factor controlling nucleation and the size of the final crystals under limited iron conditions.

Once formed, these nuclei grow, first probably at the expenses of the Fe available in the bulk solution, and then, from the Fe previously bind by the acidic amino acids in the proteins, which act as Fe reservoirs for crystal growth. The fact that better faceted crystals are obtained when Mms6 is present in the solution supports this hypothesis, indicating that the effect of Mms6 is mainly directed to lower the kinetics of crystal growth by lowering the supersaturation of the system with respect to magnetite.

As a summary, our model of how magnetite nucleation and growth occurs in the presence of MamC and Mms6 is the following: a) First, acidic amino acids of Mms6 and MamC bind Fe cations from the solution by an ionotropic effect, also confirmed by the results of Nudelman *et al.* (2018),<sup>36</sup> thus lowering the supersaturation of the system with respect to magnetite and preventing bulk nucleation. Then, nucleation occurs in the extended surface provided by the MamC loop mainly driven by a template effect. MamC strongly controls the kinetic of nucleation determining the number of nuclei that form, which would be dependent on the concentration of MamC with the adequate conformation. b) Secondly, previously formed nuclei grow at the expense of the Fe cations in solution and then, when needed for crystal growth, the Fe cations concentrated at the acidic amino acids of, firstly MamC and then Mms6 (according to the Kd calculated by Nudelman *et al.* 2018)<sup>36</sup> are released and become available. Mms6, thus, controls the kinetics of crystal growth since the binding of Fe and the controlled release of such cations lowers the supersaturation of the system at which magnetite grows. c) Magnetite crystal grow slower, such a growth being controlled by the release of the Fe cations from Mms6, thus the resulting magnetite crystals accumulate a lower number of defects. d) This growth occurs while the system is supersaturated with respect to magnetite, probably being Fe cation the limitant component for further crystal growth.

Some of the crystal faces identified for Mms6 in the present work were previously described by other authors in Mms6 (from AMB-1)-mediated magnetites synthesized *in vitro*. For instance, Arakaki *et al.* (2010)<sup>22</sup> observed the expression of the crystal faces (400) and (311). Also Amemiya *et al.* (2007)<sup>19</sup> observed the expression of the (100) face. Curiously, and although we are aware that the direct extrapolation of the results obtained *in vitro* to the *in vivo* scenario is not possible, the crystals faces observed in the present study (Mms6-MamC-magnetites) are identical to those determined by Mann *et al.* (1984)<sup>46</sup> for MC-1 magnetosomes.

For that combined effect to happen, MamC and Mms6 may or may not have to be physically interacting by an specific (or inespecific) interaction, as long as the Mms6 C-terminal and MamC-loop are intact. Preliminary immuno-precipitation experiments carried out in our laboratory with these two proteins (Figure S5) gave us some hints suggesting the existence of some type of interaction. However, in order to unambiguously prove this specific interaction, further experiments are needed that should be directed not only to prove the interaction, but also to determine de area of both proteins involved in it. This would not be the first case in which interactions between magnetosome proteins have been described.<sup>34,47</sup> For example, the interaction of MamK and MamJ, essentials to the assembly of magnetosomes in a chain, was determined by Carrilo *et al.* (2013)<sup>48</sup>. Up to date, there is only experimental evidence for the interaction between Mms6 (from *M. magneticum* AMB-1) and MamA.<sup>49</sup> MamA is not directly involved in magnetite formation, but it has TPR motifs that are known to play an important role in protein–protein interactions.<sup>15,32</sup> Also, Tanaka *et al.* (2011)<sup>50</sup> proposed that the N-terminal of Mms6 could have sorting functions to properly localize other proteins onto the magnetite crystal surface.

The larger and better crystals obtained in presence of both MamC and Mms6 were consistent with the measurements of the magnetic moment of the solid samples. While the size of the particles in all cases falls within the range of single magnetic domain,<sup>5</sup> the blocking temperature of the particles ( $T_B < 300$  K in all cases) indicates that they do not display a net magnetization in the absence of an external magnetic field probably because the crystals have their magnetic moments randomly distributed at such temperature.<sup>5</sup> The slower magnetization increase and higher  $T_B$  are characteristic of particles of higher crystallinity, larger size, and a larger magnetic moment per particle.<sup>5</sup> In this context, all biomimetic magnetic nanoparticles display higher  $T_B$  compared to that of MNPs. This is important since for clinical applications, in the absence of an external magnetic field, the samples do not show magnetization, probably caused by a random distribution of magnetic moments at this temperature, which would prevent agglomeration. However, once an external magnetic field is applied in order to direct the nanoparticles to the target site, the larger the magnetic moment per particle is, the more efficient response is expected. Both crystal size and crystallinity accounts for this difference in  $T_B$ . Therefore, the possibility of producing magnetic nanoparticles with tuned magnetic properties by combining recombinant magnetosome proteins has

an important potential in the design of magnetic nanoparticles for biotechnological applications.

## **Experimental section**

### **Cloning, expression and purification of recombinant MamC**

*Magnetococcus marinus* MC-1 cells were grown microaerobically under chemolithoautotrophic conditions with thiosulfate as the electron donor in cultures as described by Williams *et al.* (2006)<sup>51</sup>. Genomic DNA from *Magnetococcus marinus* MC-1 #ATCC BAA-1437(T), JCM 17883(T) was isolated following the method described by Martín-Platero *et al.* (2007)<sup>52</sup>. MamC cloning, expression and purification were carried out as described in Valverde-Tercedor *et al.* (2015)<sup>26</sup>. Briefly, the *mamC* gene was cloned into a pTrcHis-TOPO vector (Life Technologies: Invitrogen, Grand Island, NY) so that the recombinant MamC protein is expressed with an N-terminal hexahistidine tag. The recombinant vector was transformed into an *Escherichia coli* TOP10 strain (Life Technologies: Invitrogen) and MamC expression was induced with isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). A HiTrap chelating HP column (GE Healthcare) was used for protein purification under denaturing conditions and MamC was later folded by sequential removal of the urea initially contained in the elution buffer.

### ***In silico* analysis of Mms6. Cloning, expression and purification of recombinant Mms6**

Sequence alignments of Mms6 protein with homologous proteins in other bacteria were performed using Clustal Omega. All amino acid sequences of those proteins were obtained from NCBI Database. Hydrophobicity and physicochemical properties of Mms6 were deduced from its protein sequence using the ExPASy Server. The *mms6* gene from *M. marinus* MC-1 (NCBI Database, gene accession ABK44776.1, protein accession Mmc1\_2275) was amplified by polymerase chain reaction using the specific primers: f6 (SEQ ID NO: 1, 5'-ATGCCTGTTGCTGTACCAAATAAAGC-3') and r6 (SEQ ID NO: 2, 5'-TCAGCTAATGGCCTCTTCCAATTC-3'). The amplified *mms6* gene was cloned into a pTrcHis-TOPO vector and the host was *E. coli* TOP10. The amplified gene was verified by dideoxynucleotide sequencing. The expression of Mms6 was almost identical to that of MamC, but 1 mM IPTG was used instead. After centrifugation cells were resuspended in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) supplemented with 0.5 mg/mL lysozyme and 5% sodium lauroylsarcosinate (sarkosyl)

and disrupted by sonication. The soluble fraction was separated by centrifugation and loaded onto a HiTrap chelating HP column (GE Healthcare) by using an ÄKTA Prime Plus FPLC System (GE Healthcare). The column was previously equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) supplemented with 20 mM imidazole and Triton X-100 at 1.3 x the critical micelle concentration (CMC) to reduce protein aggregation and to improve protein stability. The elution of Mms6 (2 mL/min) was performed by applying a continuous imidazole gradient from 20 to 500 mM. Fractions were collected and analyzed by 12% SDS-PAGE electrophoresis. Fractions containing Mms6 were subjected to an additional chromatographic step in a C4 hydrophobicity column (Jupiter® 5 µm C4 300 Å, LC Column 150 x 4.6 mm) using a HPLC system (Agilent 1100) to remove minor contaminants, *E. coli* proteins, and nucleic acids. In this case, the elution of Mms6 protein (0.5 mL/min) occurred by applying a continuous organic solvent (trifluoroacetic acid and acetonitrile) gradient into water because of the high hydrophobicity of Mms6. The purity of the Mms6 protein was tested by Coomassie-stained 12% SDS-PAGE. Protein concentration was determined using a Bradford protein assay<sup>53</sup> and using a NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific), by using the corresponding molar extinction coefficient at 280 nm (17085 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

As a control experiment, TOP10 competent cells were also transformed with pTrcHis-TOPO that did not contain the genes of interest. The purification protocol of MamC and Mms6 was followed with those transformed bacteria and their corresponding elution fractions were used for magnetite precipitation (control) experiments.

Since MamC was extensively characterized by other authors,<sup>26,29,30,33</sup> all characterization analyses were performed on Mms6. This protein was analyzed by peptide mass fingerprinting (PMF) and peptide fragmentation (PFF) by MALDI-TOF/TOF. The protein was digested by reduction with dithiothreitol (DTT), derivatization with iodoacetamide (IAM) and subsequent digestion overnight with trypsin (45 ng) at 30 °C. The resulting peptides were extracted from the gel with 15 µl of 0.2% Trifluoroacetic acid (TFA) and 30% acetonitrile. The samples were crystallized in an "AnchorChip" plate using α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) as matrix, and analyzed in a MALDI TOF/TOF mass spectrometer (UltrafleXtreme, Bruker). The identification of the protein was carried out by using MASCOT 2.4.0 (MatrixScience) software<sup>54</sup> as a search engine.



Circular dichroism (CD) spectra were recorded at 20 °C in the far-UV spectral region (190-250 nm) using a spectropolarimeter Jasco J-815 equipped with a Peltier-type cell holder. Measurements were performed in a 0.2 cm length x 1 mm band width quartz cell at a protein concentration between 0.2 - 0.8 mg/mL (time 1s, scan rate 100 nm/min). Five consecutive scans were accumulated, and the average spectra were stored. Triton X-100 background was subtracted from protein spectra. Analysis of the experimental data was carried out with Spectra Manager software. Secondary structure composition was calculated by deconvolution of the spectrum using by Raussens *et al.* method.<sup>55</sup> The macromolecular structure of Mms6 protein suspensions deposited in carbon grids was analysed by transmission electron microscopy (TEM, LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss SMT electron microscope).

### **Biom mineralization experiments**

Deoxygenated solutions of 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) were prepared by using oxygen-free deoxygenated Milli-Q water and magnetite precipitation was carried out in free-drift experiments held at 25 °C and 1 atm total pressure following the protocol described in Perez-Gonzalez *et al.* (2011)<sup>56</sup>. The final reaction mixture from which magnetite precipitated was 3.5 mM NaHCO<sub>3</sub>/3.5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.78 mM Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5.56 mM FeCl<sub>3</sub>, pH = 9. MamC and/or Mms6 were added to the reaction mixture at concentrations ranging from 0 to 10 µg/mL. Specifically, nineteen magnetite coprecipitation experiments were carried out under the following conditions (three replica per condition) [1] sixteen experiments performed by adding MamC and Mms6 to the reaction solution at protein concentrations of 0, 2.5, 5, 7.5, 10 µg/mL and MamC/Mms6 and Mms6/MamC ratios ranging from 0 to 4, here referred as MamC-, Mms6-, Mms6-MamC-bearing experiments; [2] one experiment performed by adding to the reaction mixture the “contaminant” proteins purified from cells transformed with the “empty” pTrcHis-TOPO, here referred as empty-vector experiments; [3] two experiments carried out by adding to the reaction mixture the buffer in which each one of the proteins was stored (50 mM Tris and 150 mM NaCl, here referred as MamC-buffer experiments) and 1.3 CMC Triton X-100 in water (here referred as Mms6-buffer experiments); [4] one inorganic experiment in which no proteins and/or buffer were added to the reaction mixture. Experiments were always done in triplicate and particle size determinations were done for each one of the replica, all values accounting for the averages and

standard deviations given for a particular experiment. Each experiment was allowed to proceed inside the anaerobic chamber for 30 days, after which the precipitated product was harvested. The solids were concentrated in tubes with a magnet and the supernatant (that looked completely clear) was discarded. Then the precipitates were washed with oxygen-free deoxygenated Milli-Q water two times and a last wash was performed with absolute ethanol (5 mL in each reaction). Between washes, each reaction flask was vigorously shaken for several seconds, the precipitate was magnetically concentrated, and the liquid removed. After the last ethanol washing the precipitate was concentrated in 1-2 mL of ethanol, hermetically sealed and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analyzed.

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  $60^{\circ}$  in  $2\theta$  ( $0.01^{\circ}/\text{step}$ ;  $3\text{ s}$  per step). Identification of the precipitates was performed by using the X Powder software.<sup>57</sup> The morphology and size of the magnetite nanoparticles collected in those experiments were studied by Transmission Electron Microscopy (TEM) using a LIBRA 120 PLUS of Carl Zeiss SMT microscope. Magnetic nanoparticles were embedded in Embed 812 resin. Ultrathin sections ( $50\text{--}70\text{ nm}$ ) were prepared using a Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), after which the sections were deposited onto copper grids. The determination of the size of the crystals were done on TEM images taken at  $20\text{ kX}$  magnification. These 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 individual crystals were measured manually to avoid potential overestimation of the size due to particle aggregation, since it is well known that the human eye has a greater resolution compared to an image analysis program. To ensure reproducibility of results, crystal sizes were measured on several micrographs at  $20\text{ xK}$  with an excess of  $1000$  nanoparticles for each experiment. The size distribution curves were determined from those measurements by using Origin pro 9. In addition, statistical significance of the results obtained was tested using Tukey test with a fixed value of  $\alpha < 0.05$ . High Resolution TEM (HRTEM) was also performed at  $500\text{ Kx}$  of magnification by using a FEI TITAN G2 80-300 and HRTEM Philips CM200 microscopes. The selected area electron diffraction (SAED) patterns were collected using a  $10\text{ }\mu\text{m}$  aperture. D-spacings were measured using HRTEM images and the crystallographic direction was determined by using magnetite data in RRUFF Project Web site (<http://rruff.info/ams/amcsd.php>).

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.<sup>5</sup> 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 that below the “blocking” of the superparamagnetic particles, which are no longer thermally equilibrated.<sup>5</sup>

## Conclusions

The present study demonstrates that it is possible to combine MamC and Mms6 proteins from *M. marinus* MC-1 to obtain *in vitro* biomimetic magnetite nanoparticles different than those obtained by using only one of the proteins at a time and/or no protein at all. The combined effect of MamC and Mms6, specifically at MamC concentrations of 5  $\mu\text{g/mL}$  and Mms6 concentrations of 10  $\mu\text{g/mL}$ , produces *in vitro* well faceted crystals both large in size ( $30 \pm 10$  nm) and with the highest blocking temperature, indicating the largest magnetic moment per particle. Although the presence of MamC and Mms6 affects magnetite nucleation and growth *in vitro*, they affect the kinetics of both processes differently. MamC seems to control the kinetics of crystal nucleation because of the combined ionotropic and template effects while Mms6 seems to preferably control the kinetics of crystal growth by acting as an Fe reservoir. These experiments provide with novel biomimetic magnetic nanoparticles that could be potentially useful in nanotechnological applications.

## Acknowledgements

We acknowledge projects CGL2013-46612 and CGL2016-76723 from the Ministerio de Economía y Competitividad from SPAIN and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) for financial support and Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 of the University of Granada. Thanks go to CIC personnel of the University of Granada for technical assistance in the CD, TEM, SQUID and Unidad de Radioquímica e Inmunoanálisis (LAR), to the Proteomics Unit personnel of the Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra" (IPBLN) for technical assistance in the PMF and PFF by MALDI-TOF / TOF, and to the University of Málaga for technical assistance in HRTEM measurements.

## Author contributions statement

A.P. and C.J-L. designed research; A.P., Y.J. and M.A.F.V. performed research; A.P., Y.J. and C.J-L. analysed data; C.J-L. supervised; and all authors interpreted and discussed the data, and wrote the paper. S.C. and A.I.A participated in the discussion about proteins interaction.

## References

1. Balkwill, D. L., Maratea, D. & Blakemore, R. P. Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* **141**, 1399–1408 (1980).
2. Gorby, A., Beveridge, T. J. & Blakemore, R. P. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**, 834–841 (1988).
3. Bazylinski, D. A. *et al.* Controlled biomineralization of magnetite (Fe( $\text{inf}3$ )O( $\text{inf}4$ )) and greigite (Fe( $\text{inf}3$ )S( $\text{inf}4$ )) in a magnetotactic bacterium. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3232–3239 (1995).
4. 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.* **101**, 3839–3844 (2004).
5. Prozorov, T., Bazylinski, D. A., Mallapragada, S. K. & Prozorov, R. Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: Topical review. *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* **74**, 133–172 (2013).
6. Maruyama, K. *et al.* Single nucleotide polymorphism detection in aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene using bacterial magnetic particles based on dissociation curve analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 687–694 (2004).

7. Maruyama, K. *et al.* Detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) using a fully automated system with a nano-scale engineered biomagnetite. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2282-2288 (2007).
8. Matsunaga, T., Takahashi, M., Yoshino, T., Kuhara, M. & Takeyama, H. Magnetic separation of CD14+ cells using antibody binding with protein A expressed on bacterial magnetic particles for generating dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 1019-1025 (2006).
9. Ota, H. *et al.* Automated DNA extraction from genetically modified maize using aminosilane-modified bacterial magnetic particles. *J Biotechnol.* **125**, 361-368 (2006).
10. Lisy, M. R. *et al.* Fluorescent bacterial magnetic nanoparticles as bimodal contrast agents. *Invest. Radiol.* **42**, 235-241 (2007).
11. Sun, J. B. *et al.* Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 1313-1320 (2008).
12. Alphan ery, 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.* **5**, 6279-6296 (2011).
13. Serantes, D. *et al.* Anisotropic magnetic nanoparticles for biomedicine: bridging frequency separated AC-field controlled domains of actuation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 30445–30454 (2018).
14. Martinez-Boubeta, C. *et al.* Learning from Nature to Improve the Heat Generation of Iron-Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Applications. *Sci. Rep.* **3**, 1652 (2013).
15. Nudelman, H. & Zarivach, R. Structure prediction of magnetosome-associated proteins. *Front. Microbiol.* **5**, 9 (2014).
16. Peigneux, A. *et al.* Learning from magnetotactic bacteria: a review on the synthesis of biomimetic nanoparticles mediated by magnetosome-associated proteins. *J. Struct. Biol.* **196**, 75-84 (2016).
17. Uebe, R. & Sch uler, D. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 621-637 (2016).
18. Arakaki, A., Webb, J. & Matsunaga, T. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 8745-8750 (2003).
19. 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.* **28**, 5381-5389 (2007).
20. Prozorov, T. *et al.* Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 951–957 (2007a).

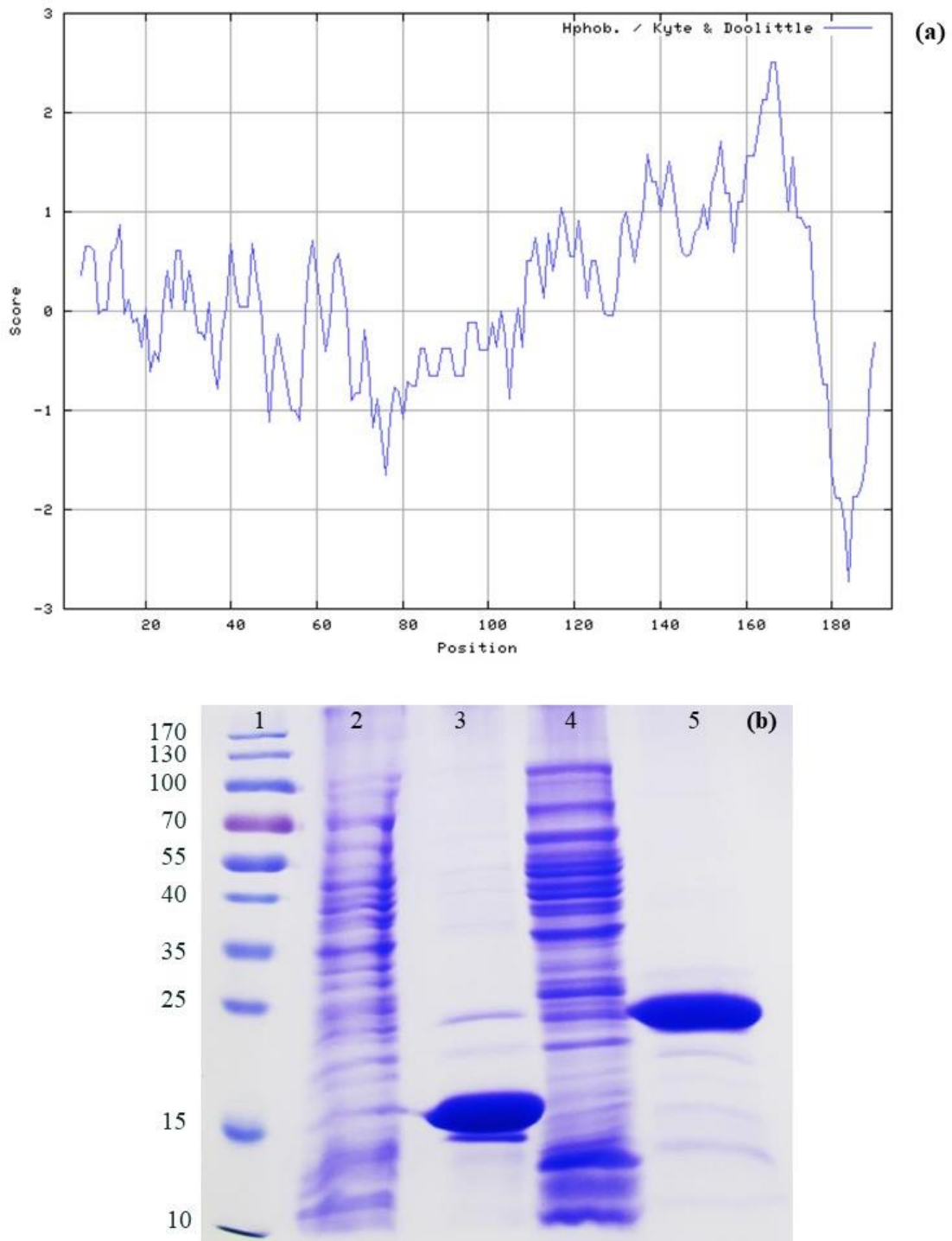
21. Prozorov, T. *et al.* Cobalt ferrite nanocrystals: out-performing magnetotactic bacteria. *ACS Nano*. **1**, 228-233 (2007b).
22. Arakaki, A., Masuda F., Amemiya, Y., Tanaka, T. & Matsunaga, T. Control of the morphology and size of magnetite particles with peptides mimicking the Mms6 protein from magnetotactic bacteria. *J. Colloid. Interface Sci.* **343**, 65-70 (2010).
23. Galloway, J. M. *et al.* Magnetic bacterial protein Mms6 controls morphology, crystallinity and magnetism of cobalt-doped magnetite nanoparticles *in vitro*. *J. Mater. Chem.* **21**, 15244–15254 (2011).
24. Galloway, J. M. & Staniland, S. S. Protein and peptide biotemplated metal and metal oxide nanoparticles and their patterning onto surfaces. *J. Mater. Chem.* **22**, 12423–12434 (2012).
25. Liu, X. *et al.* Effect of surface hydrophobicity on the function of the immobilized biomineralization protein Mms6. *Ind. Eng. Chem. Res.* **54**, 10284–10292 (2015).
26. Valverde-Tercedor C. *et al.* Size control of *in vitro* synthesized magnetite crystals by the MamC protein of *Magnetococcus marinus* strain MC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 5109-5121 (2015).
27. Zhang, H. *et al.* Morphological transformations in the magnetite biomineralizing protein Mms6 in iron solutions: a small-angle X-ray scattering study. *Langmuir*. **31**, 2818-2825 (2015).
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.* **6**, 7356-7363 (2016).
29. Nudelman, H. *et al.* Structure-function studies of the magnetite-biomineralizing magnetosome-associated protein MamC. *J. Struct. Biol.* **194**, 244-252 (2016).
30. Lopez-Moreno, R. *et al.* 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 (2017).
31. Rawlings, A. E. *et al.* Self-assembled MmsF proteinosomes control magnetite nanoparticle formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **111**, 16094–16099 (2014).
32. Barber-Zucker, S., Keren-Khadmy, N. & Zarivach, R. From invagination to navigation: The story of magnetosome-associated proteins in magnetotactic bacteria. *Protein Sci.* **00**, 338–351 (2016).
33. Kashyap, S. *et al.* Visualization of Iron-Binding Micelles in Acidic Recombinant Biomineralization Protein, MamC. *J. Nanomater.* **2014**, 7 (2014).
34. 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.* **190**, 377-386 (2008).

35. Raschdorf, O. *et al.* A quantitative assessment of the membrane-integral sub-proteome of a bacterial magnetic organelle. *J. Proteomics*. **172**, 89-99 (2018).
36. Nudelman, H. *et al.* Understanding the biomineralization role of Magnetite-Interacting Components (MICs) from magnetotactic bacteria. *Front. Microbiol.* **9**, 2480 (2018).
37. Wang, L. *et al.* Self-assembly and biphasic iron-binding characteristics of Mms6, a bacterial protein that promotes the formation of superparamagnetic magnetite nanoparticles of uniform size and shape. *Biomacromolecules*. **13**, 98-105 (2012).
38. Yamagishi, A., Narumiya, K., Tanaka, M., Matsunaga, T. & Arakaki, A. Core amino acid residues in the morphology-regulating protein, Mms6, for intracellular magnetite biomineralization. *Sci. Rep.* **6**, 35670 (2016).
39. Lippard, S. J. & Berg, J. M. Principles of bioinorganic chemistry. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **23**, 115–115 (1995).
40. Rawlings, A. E. *et al.* Ferrous iron binding key to Mms6 magnetite biomineralisation: a mechanistic study to understand magnetite formation using pH titration and NMR spectroscopy. *Chemistry* **22**, 7885-7894 (2016).
41. Nudelman, H. *et al.* The importance of the helical structure of a MamC-derived magnetite-interacting peptide for its function in magnetite formation. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **74**, 10-20 (2018).
42. Mann, S. *Biomaterialization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press, New York, (2001).
43. Bereczk-Tompa, É., Vonderviszt, F., Horváth, B., Szalai, I. & Pósfai, M. Biotemplated synthesis of magnetic filaments. *Nanoscale* **9**, 15062–15069 (2017).
44. Ubago-Rodríguez, A. *et al.* Structure–function of MamC loop and its effect on the in vitro precipitation of biomimetic magnetite nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* **19**(5), 1952927-1952935 (2019).
45. Jabalera, Y. *et al.* Protein conservation method affects MamC-mediated biomineralization of magnetic nanoparticles. *Cryst. Growth Des.* **19**(2), 1064-1071 (2019).
46. Mann, S., Frankel, R. B. & Blakemore, R. P. Structure, morphology and crystal growth of bacterial magnetite. *Nature*. **310**, 405 (1984).
47. Lohße, A. *et al.* Genetic Dissection of the mamAB and mms6 Operons Reveals a Gene Set Essential for Magnetosome Biogenesis in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* **196**, 2658 (2014).
48. Carillo, M. A., Bennet, M. & Faivre, D. Interaction of proteins associated with the magnetosome assembly in magnetotactic bacteria as revealed by two-hybrid two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy Förster resonance energy transfer. *J. Phys. Chem. B*. **117**, 14642-14648 (2013).

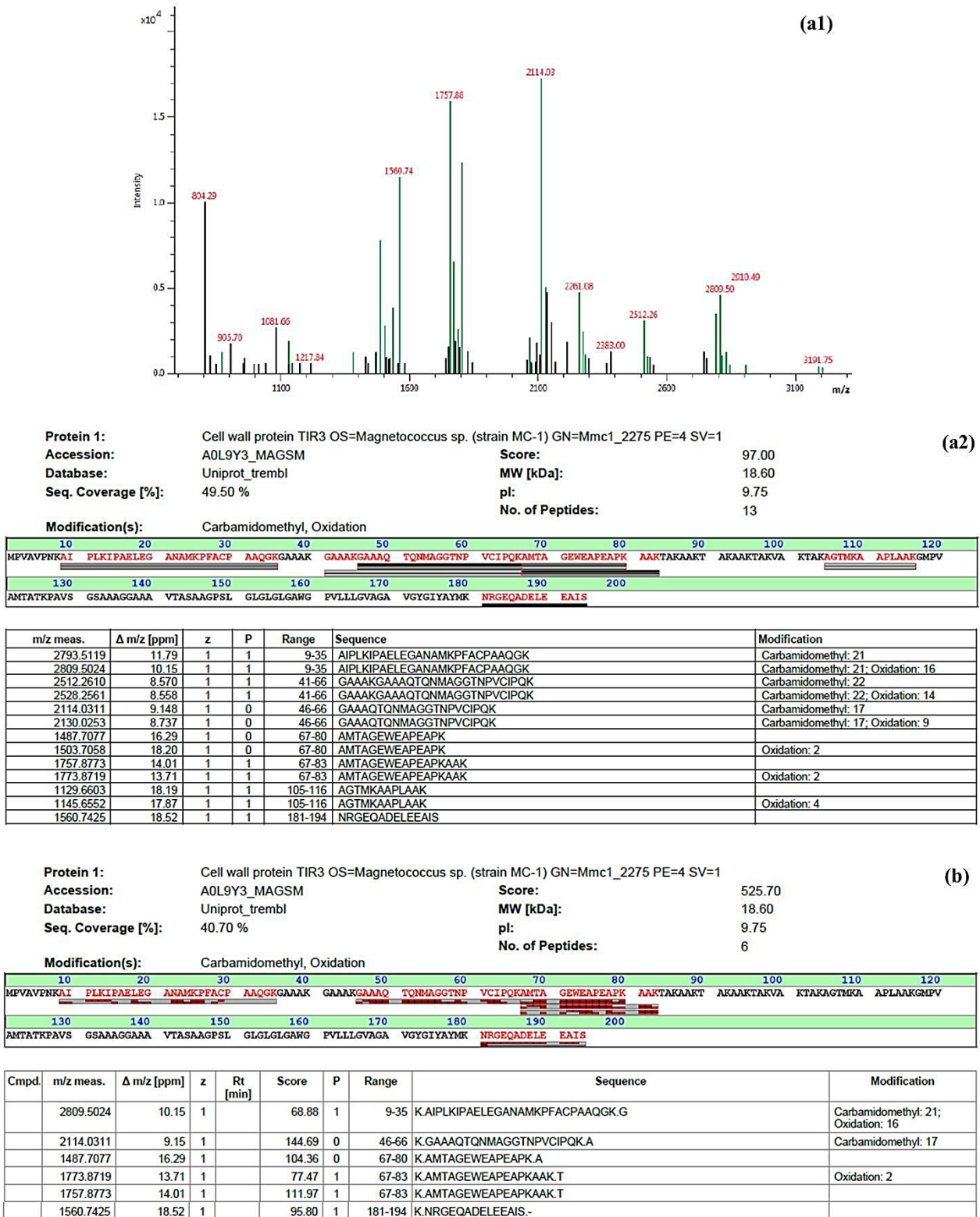
49. Nguyen, H. V. *et al.* A protein-protein interaction in magnetosomes: TPR protein MamA interacts with an Mms6 protein. *Biochem Biophys Res.* **7**, 39-44 (2016).
50. Tanaka, M., Mazuyama, E., Arakaki, A. & Matsunaga, T. Mms6 protein regulates crystal morphology during nano-sized magnetite biomineralization *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **286**, 6386–6392 (2011).
51. Williams, T. J., Zhang, C. L., Scott, J. H. & Bazylinski, D. A. Evidence for autotrophy via the reverse tricarboxylic acid cycle in the marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1322–1329 (2006).
52. Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M. & Martínez-Bueno, M. Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein “salting-out” procedure. *Anal. Biochem.* **366**, 102-104 (2007).
53. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
54. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* **20(18)**, 3551-3567 (1999).
55. Raussens, V., Ruyschaert, J. M. & Goormaghtigh, E. Protein concentration is not an absolute prerequisite for the determination of secondary structure from circular dichroism spectra: a new scaling method. *Anal. Biochem.* **319**, 114–121 (2003).
56. 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.* **24**, 549–557 (2011).
57. Martín Ramos, J. D. X Powder, a software package for powder X-ray diffraction analysis. Legal Deposit GR 1001/04 (2004).



## Supporting information



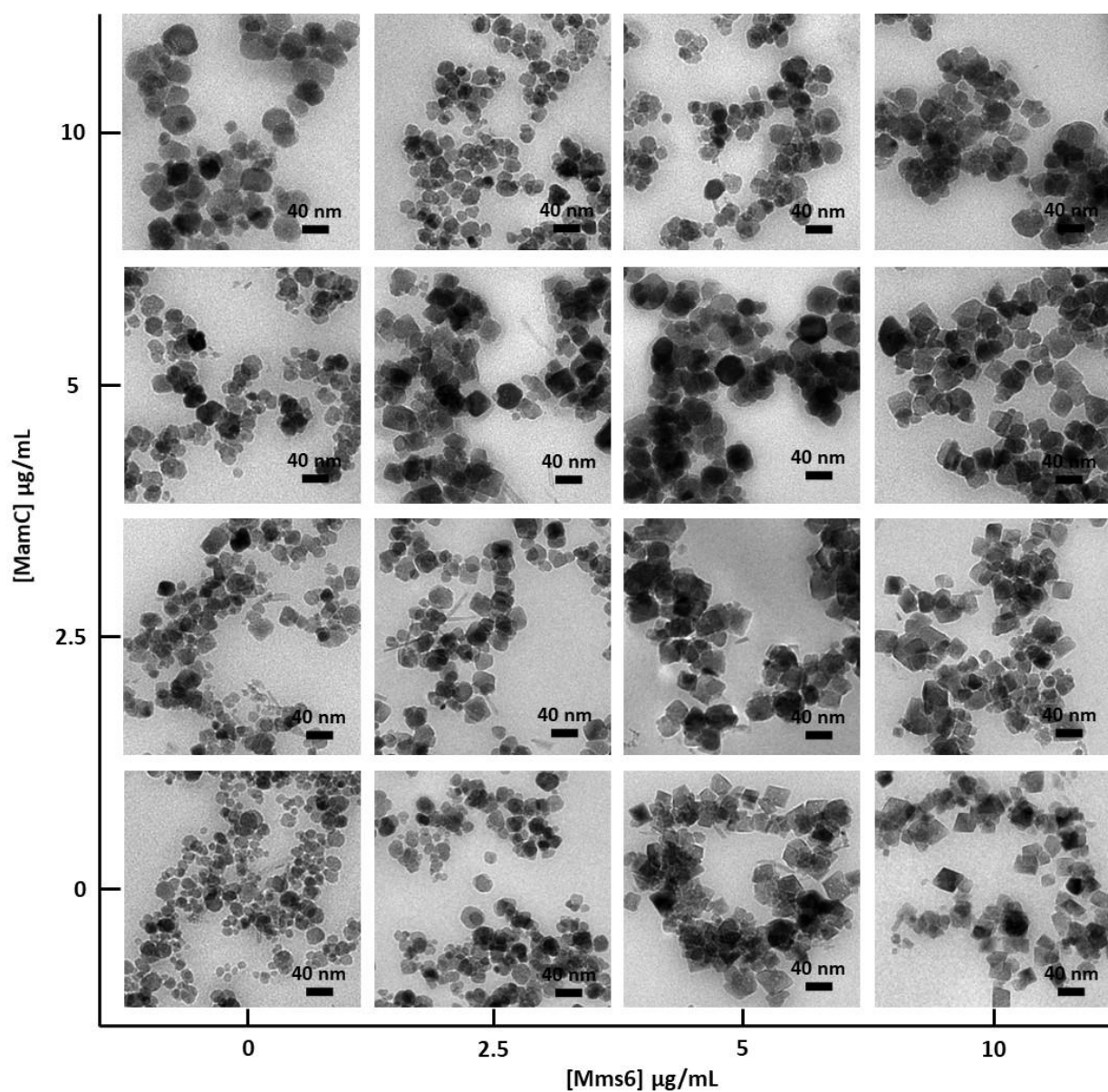
**Figure S1.** (a) Hydrophobicity spectrum of Mms6 protein from *M. marinus* MC-1. (b) SDS-PAGE of purified MamC (lane 3) and Mms6 (lane 5). *E. coli* TOP10 proteins before the purification of MamC (lane 2) and Mms6 (lane 4). Lane 1, molecular weight marker (kDa).



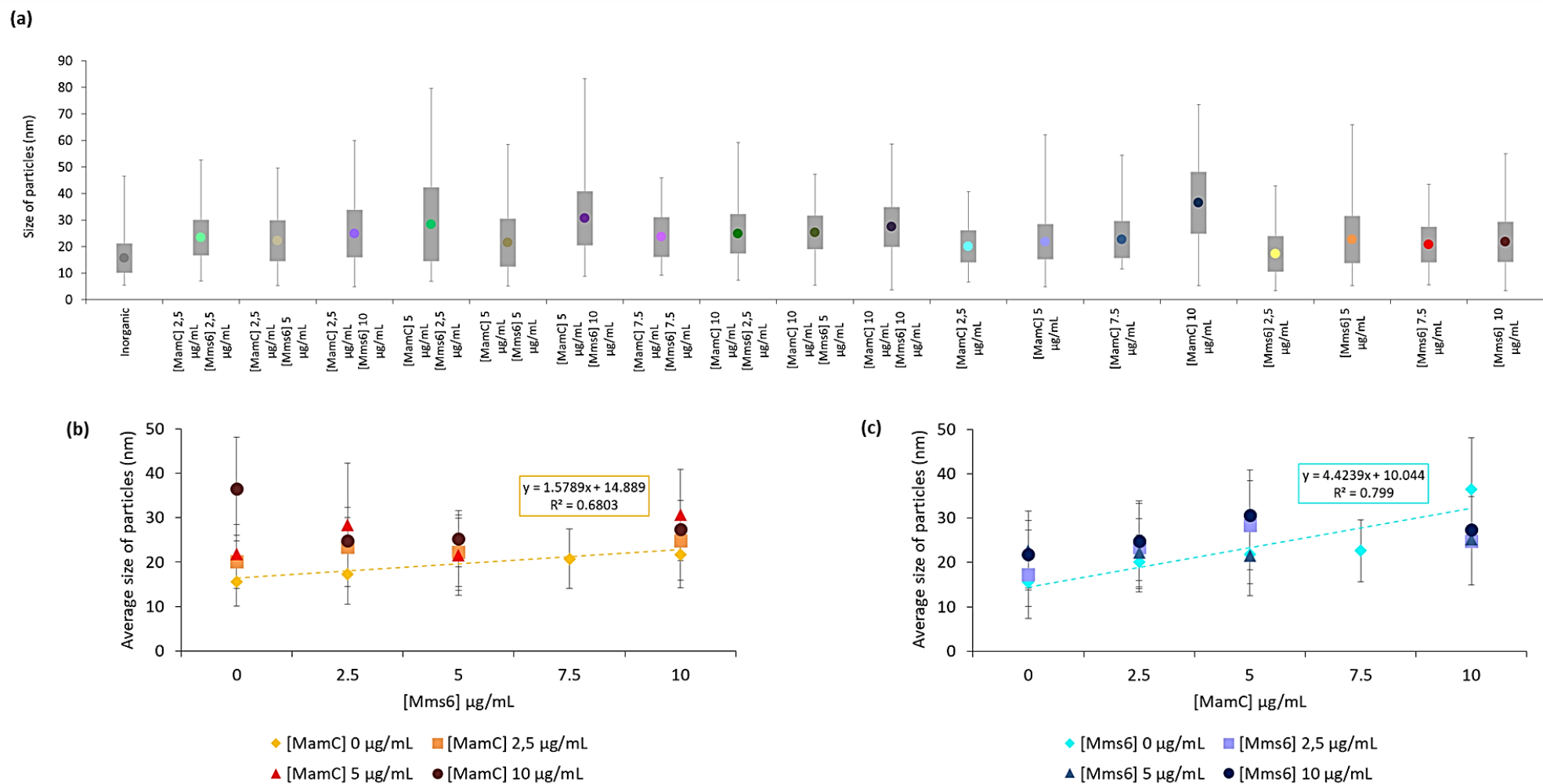
**Figure S2.** (a) Peptide mass fingerprinting (PMF) of Mms6 protein. (a1) Peptide mass and fragmentation spectra, (a2) Peptide spectra comparison result by using MASCOT 2.4.0 (MatrixScience) software<sup>54</sup> as a search engine. (b) Peptide fragmentation (PFF) by MALDI-TOF/TOF and database comparison by using MASCOT 2.4.0 (MatrixScience) software<sup>54</sup> as a search engine.

**Table S1.** Prediction of transmembrane regions (SOSUI Program, Nagoya University, Japan).

No.	N terminal	Transmembrane region	C terminal	type	length
1	145	AAGPSLGLGLGLGAWGPVLLLV	167	PRIMARY	23



**Figure S3.** TEM images of particles obtained in MamC-experiments, Mms6-experiments and Mms6-MamC-experiments.



**Figure S4.** (a) Box plot of the size of magnetites obtained in inorganic, MamC-experiments, Mms6-experiments and Mms6-MamC-experiments. Average size of the magnetite crystals obtained in the Mms6-MamC-experiments versus (b) [Mms6] and (c) [MamC].

**Table S2.** ANOVA test of the values of the size averages for all the samples. The difference between averages is significant when  $\alpha < 0.05$ .

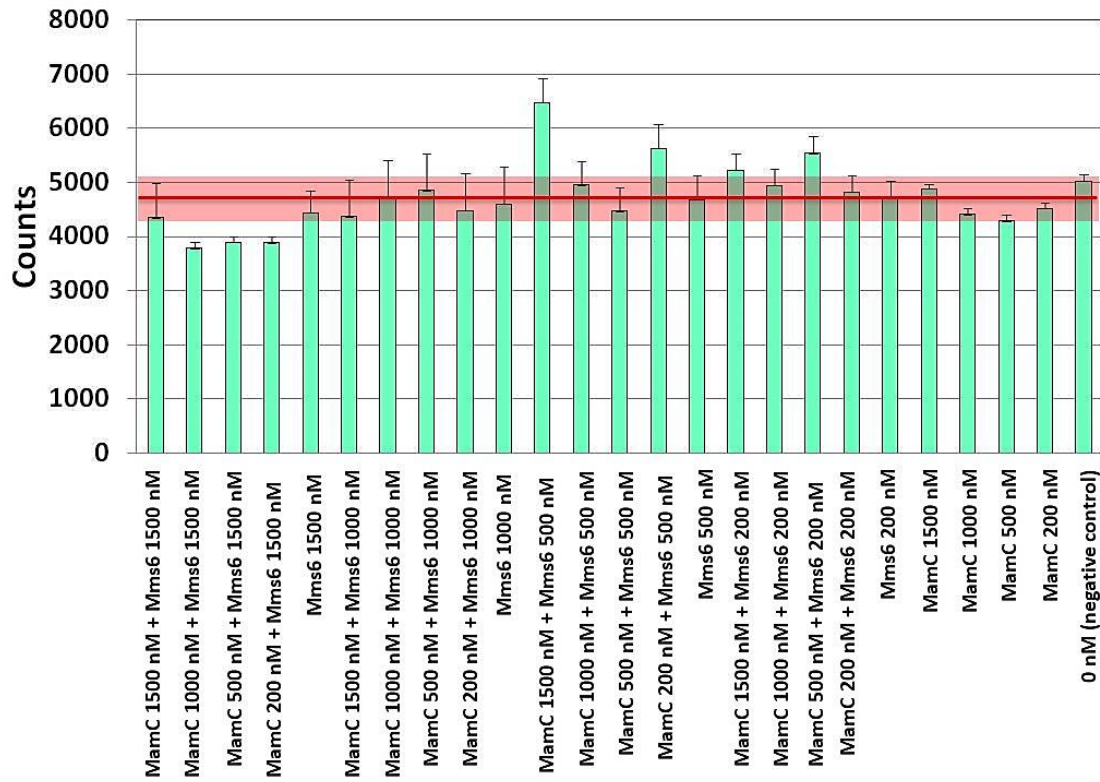
Control	[MamC] 2.5 µg/mL	[MamC] 5 µg/mL	[MamC] 7.5 µg/mL	[MamC] 10 µg/mL	[Mms6] 2.5 µg/mL	[Mms6] 5 µg/mL	[Mms6] 7.5 µg/mL	[Mms6] 10 µg/mL	[MamC] 2.5 µg/mL [Mms6] 2.5 µg/mL	[MamC] 2.5 µg/mL [Mms6] 5 µg/mL	[MamC] 2.5 µg/mL [Mms6] 10 µg/mL	[MamC] 5 µg/mL [Mms6] 2.5 µg/mL	[MamC] 5 µg/mL [Mms6] 5 µg/mL	[MamC] 7.5 µg/mL [Mms6] 7.5 µg/mL	[MamC] 10 µg/mL [Mms6] 2.5 µg/mL	[MamC] 10 µg/mL [Mms6] 5 µg/mL	[MamC] 10 µg/mL [Mms6] 10 µg/mL	
Control	3.33E-16	3.33E-16	1.66533E-15	3.33E-16	2.00E-5	3.33E-16	1.88738E-15	3.33E-16	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66533E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	
	[MamC] 2.5 µg/mL	1.48E-5	1.62139E-11	3.33E-16	6.44E-14	3.05E-12	0.97712	2.65E-5	2.55E-15	1.18E-6	1.66E-15	1.66E-15	0.0066	0.99965	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	
		[MamC] 5 µg/mL	0.37637	3.33E-16	3.33E-16	0.1838	0.77915	1	0.0027	0.9880	1.27E-13	1.66E-15	0.9993	7.64433E-4	1.66E-15	1.63E-13	1.66E-15	
			[MamC] 7.5 µg/mL	1.66533E-15	1.66533E-15	1	0.00371	0.30331	0.68081	0.27314	3.34601E-7	1.66533E-15	0.13228	1.50655E-10	1.66533E-15	4.16832E-7	2.73252E-10	
				[MamC] 10 µg/mL	3.33E-16	3.33E-16	1.66533E-15	3.33E-16	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66533E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	
					[Mms6] 2.5 µg/mL	3.33E-16	3.37859E-7	3.33E-16	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.9984E-15	1.66E-15	1.66E-15	1.66E-15	
						[Mms6] 5 µg/mL	0.05203	0.1404	0.76535	0.98429	1.04E-6	1.66E-15	0.11529	8.09948E-10	1.66E-15	1.29E-6	1.19E-9	
							[Mms6] 7.5 µg/mL	0.8176	0.00416	0.0116	3.11908E-8	1.66533E-15	0.98199	0.86255	1.66533E-15	3.67462E-8	4.55078E-10	
								[Mms6] 10 µg/mL	0.00202	0.97808	9.49E-14	1.66E-15	0.99981	0.00126	1.66E-15	1.20E-13	1.66E-15	
									[MamC] 2.5 µg/mL [Mms6] 2.5 µg/mL	0.092	0.00296	1.66E-15	8.11E-5	1.13354E-13	1.66E-15	0.00354	1.76E-5	
										[MamC] 2.5 µg/mL [Mms6] 5 µg/mL	2.24E-10	1.66E-15	0.724	2.91037E-5	1.66E-15	2.85E-10	4.7E-14	
											[MamC] 2.5 µg/mL [Mms6] 10 µg/mL	1.66E-15	1.66E-15	1.66533E-15	1.66E-15	1	0.986	
												[MamC] 5 µg/mL [Mms6] 2.5 µg/mL	1.66E-15	1.66533E-15	2.74E-7	1.66E-15	9.79E-14	
													[MamC] 5 µg/mL [Mms6] 5 µg/mL	0.05073	1.66E-15	1.77E-15		
														[MamC] 7.5 µg/mL [Mms6] 7.5 µg/mL	1.66533E-15	1.66533E-15	1.66533E-15	
															[MamC] 5 µg/mL [Mms6] 10 µg/mL	1.66E-15	1.66E-15	
																[MamC] 10 µg/mL [Mms6] 2.5 µg/mL	0.98	
																	[MamC] 10 µg/mL [Mms6] 5 µg/mL	
																		[MamC] 10 µg/mL [Mms6] 10 µg/mL



## **Methods**

### **Analysis of Mms6-MamC interaction**

The interaction between Mms6 and MamC has been investigated by using AlphaScreen assays. MamC is captured by a monoclonal mouse anti-MamC antibody (ProteoGenix, 1 mg/mL in PBS buffer added with 0.02% sodium azide), which will itself bind to anti-mouse IgG Acceptor beads (Perkin Elmer Cat. 6760606C), while Mms6 is captured by a polyclonal rabbit anti-Msm6 antibody (target sequence Cys\_YMKNRGEQADELEE, ProteoGenix, 0.84 mg/mL in PBS buffer added with 0.02% sodium azide), which will itself bind to anti-rabbit IgG Donor beads (Perkin Elmer Cat. AS105D). When Mms6 and MamC are interacting, the Donor and Acceptor beads come into proximity. Excitation of the Donor beads results in emission of light from the Acceptor beads. The signal generated is proportional to the amount of proteins that are interacting. This test was chosen to study the interaction between Mms6 and MamC because it offers advantages over other assay formats as they do not require any wash steps, have fewer protocol steps, require less sample, and provide a large dynamic range. A stock solution of Msm6 (1 mg/mL) in H<sub>2</sub>O with Triton X-100 and of MamC (1 mg/mL) in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8 were used in the experiment and diluted by adding the here referred as assay buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.1% BSA) to reach the concentrations in Figure S5. An experiment was performed to titrate each protein in a cross titration matrix on the half-area of 96-well Optiplate (Figure S5) in order to find their optimal concentration in the assay. Titration of one protein down the plate and the other protein across the plate allows a view of all the combinations and includes the important controls of no proteins and single protein. Mms6 and MamC proteins at the specific concentration were added to the well and allowed to interact for 60 minutes at 28 °C. Experiments with only MamC or Mms6 and with no proteins were used as negative controls. Then after, anti-Mms6, anti-MamC, and acceptor and donor beads were added to all the wells and let to react for 120 minutes at 23 °C. The final concentration of the anti-Mms6, anti-MamC, and acceptor and donor beads were of 1 nM, 3nM and 20 µg/mL, respectively. Finally the signal was read by using Ensign™ Perkin-Elmer.



**Figure S5.** AlphaScreen assay of the Mms6-MamC interaction indicating the concentration of each protein used and the total counts obtained for the different proteins concentration interaction.

*Este capítulo ha sido publicado en la revista indexada la JCR: Langmuir  
(<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.8b03109>)*

## **Chapter II. pH-dependent adsorption-release of doxorubicin on MamC-biomimetic magnetite nanoparticles**

Germán García Rubia<sup>1</sup>, Ana Peigneux<sup>1</sup>, Ylenia Jabalera<sup>1</sup>, Javier Puerma<sup>1</sup>, Francesca Oltolina<sup>2</sup>, Kerstin Elert<sup>3</sup>, Donato Colangelo<sup>2</sup>, Jaime Gómez Morales<sup>4</sup>, Maria Prat<sup>2</sup>, Concepcion Jimenez-Lopez<sup>1,\*</sup>

\* Corresponding author

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

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale “A. Avogadro”, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy

<sup>3</sup>Departamento de Mineralogía y Petrología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18002 Granada, Spain

<sup>4</sup>Laboratorio de Estudios Cristalográficos, IACT (CSIC-Universidad de Granada). Avda. Las Palmeras, 4, 18100 Armilla, Spain

### **Abstract**

New biomimetic magnetite nanoparticles (hereafter BMNPs) with sizes larger than most common superparamagnetic nanoparticles, were produced in the presence of the recombinant MamC protein from *Magnetococcus marinus* MC-1 and functionalized with doxorubicin (DOXO) intended as potential drug nanocarriers. Unlike inorganic magnetite nanoparticles, in BMNPs the MamC protein controls their size and morphology, providing them with magnetic properties consistent with a large magnetic moment per particle, and moreover, it provides the nanoparticles with novel surface properties. BMNPs display the isoelectric point (iep) at a pH 4.4, being strongly negatively charged at physiological pH (pH 7.4). This allows both (i) their functionalization with DOXO, which is positively charged at pH 7.4, and (ii) the stability of the DOXO-surface bond and DOXO release to be pH-dependent and governed by electrostatic interactions. DOXO adsorption follows a Langmuir-Freundlich model and the coupling of DOXO to BMNPs (binary biomimetic nanoparticles) is very stable at physiological pH (maximum release of 5% of the drug



adsorbed). Conversely, when pH decreases, these electrostatic interactions weaken and, at pH 5, DOXO is released up to ~ 35% of the amount initially adsorbed. The DOXO-BMNPs display cytotoxicity on the GTL-16 human gastric carcinoma cell line in a dose-dependent manner, reaching about ~ 70% of mortality at the maximum amount tested, while the non-loaded BMNPs are fully cytocompatible. The present data suggest that BMNPs could be useful as potential drug nanocarriers with a drug adsorption-release governed by changes in local pH values.

**Keywords:** magnetite nanoparticles; MamC; magnetotactic bacteria; nanocarriers; doxorubicin

## **Introduction**

One of the potential clinical applications of the magnetic nanoparticles (MNPs) that is foreseen is their use as drug nanocarriers, based on the fact that their movement can be controlled by an external magnetic field [1-4]. Several studies have shown that these nanoparticles exhibit low to no toxicity in humans due to their possible degradation in liver and spleen, which results in the release of  $\text{Fe}^{3+}$  ions that participate in iron metabolism [3]. This represents an advantage compared to other delivery systems including ceramics, polymers and metals, in which several drawbacks concerning their biodegradability, the toxicity of their degradation byproducts or simply the toxicity of the nanoparticles have been hindering their clinical application [5].

Although noticeable progress has been made regarding the use of MNPs in this context, concern still exists regarding their toxicity, and because of that, the doses of nanoparticles need to be the minimum possible in order to minimize the potential side effects arising during the clinical treatments. These concerns are derived from the fact that conventional synthesis of magnetic nanostructured materials often requires toxic reagents [1]. Moreover, the superparamagnetic nanoparticles resulting from these synthetic procedures are relatively small (< 30 nm) and with large size distributions, which limit the magnetic moment per particle and thus, their efficiency in responding to an external magnetic field. Finally, most of the synthetic procedures used so far to produce these nanoparticles are usually expensive, since they usually involve extreme temperatures, strict reaction atmospheres, and, in many cases, time consuming post-synthetic processing [2].

On the contrary, biological magnetite nanocrystals produced by magnetotactic bacteria offers a greener alternative. These bacteria have the ability to produce magnetite nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) by means of biologically controlled mineralization, which consists of the production of intracellular magnetic crystals surrounded by a lipid bilayer, resulting in an organelle called magnetosome [6]. Magnetosomes, far larger than most inorganic magnetites produced at room temperature, are considered to be the ideal magnetic nanoparticles, and, consequently, these are the most demanded nanoparticles in many nanotechnological applications [2]. On one hand, they present higher cytocompatibility, probably favored by the presence of a phospholipid membrane around them that could also improve functionalization and cell internalization [1, 7]. On the other, they have almost perfect crystal structures, well-defined morphologies and narrow size distributions, features far superior compared to those of synthetic MNPs [1, 2]. All these features make them single magnetic domain nanoparticles of fairly large size and thus, with the largest magnetic moment per particle [2, 8, 9]. This is important, since the low magnetization per particle of smaller chemically synthesized magnetic nanoparticles makes it difficult to effectively direct their movement with moderate external magnetic fields, thus reducing the efficiency of a directed chemotherapy [9, 10].

Moreover, the larger size enhances the heating capacity of the magnetosomes with respect to that usually obtained when using chemically synthesized nanoparticles, thus allowing a reduction in the doses of magnetic material needed to heat a biological tissue [1]. Therefore, due to their large volumes, magnetosomes have a higher hyperthermia response (ie., produce a larger amount of heat) compared to that of chemically synthesized nanoparticles when they are exposed to an alternating magnetic field (AMF). This has been shown for bacterial magnetosomes mixed in solution, which were either contained within the magnetotactic bacteria or extracted from these bacteria, and for magnetosomes arranged in chains or forming individual nanoparticles [1, 11].

Magnetosomes could reach the tumor by enhanced permeability and retention (EPR) effect because their size is  $\leq 150$  nm [12]. These authors showed a strong accumulation of magnetosomes from *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 (mean typical length value of 45 nm) inside the tumor by EPR effect that persisted long after the complete washout of the nanoparticles from the blood vasculature. Moreover, they demonstrated a specific enhancement for RGD (Arginine, Glycine, Aspartic acid)-labeled magnetosomes (active targeting) compared to the unlabeled ones (passive – EPR- effect).

Nowadays the production of this type of nanoparticles to industrial levels is not pursued due to the slow growth of the magnetotactic bacteria and the difficulties to culture them [2]. In this context, the biomimetic synthesis of magnetosome-like magnetite nanoparticles (BMNPs) mediated by magnetosome membrane-associated proteins (Mam) has emerged as an alternative to produce a magnetosome-like nanoparticle without the need of culturing magnetotactic bacteria [2]. In particular, Mms6 from *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 in more extent [8, 13, 14], and MamC from *Magnetococcus marinus* MC-1 [15] are the Mam that have been studied more thoughtfully, so far, for the production of these biomimetic nanoparticles. These proteins control magnetite nucleation and/or growth, altering the size and/or the final morphology of these crystals, which, in turn, affect their magnetic properties. In the case of MamC-mediated magnetites, this material exhibits the highest blocking temperature and slowest increase of magnetization compared to those of inorganic and/or Mms6-mediated magnetites, that pointing to a larger magnetic moment per particle of MamC-mediated biomimetic magnetite nanoparticles [15].

However, one of the drawbacks of most of the already commercialized inorganic magnetite nanoparticles is the need to coat their surface 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]. In the present study we will demonstrate that one of the advantages of using MamC-mediated BMNPs lies in the fact that MamC attaches to the BMNP surface and provides it with functional groups that allow functionalization based on electrostatic interactions. Moreover the BMNPs used in this study are larger in size (30 - 40 nm) than conventional inorganic magnetites (< 30 nm), thus allowing for a larger magnetic moment per particle while being superparamagnetic. This is important since they act as paramagnetic in the absence of an external magnetic field, thus preventing

aggregation, while increasing the magnetic response, and thus the guidance efficiency, upon the application of an external magnetic field.

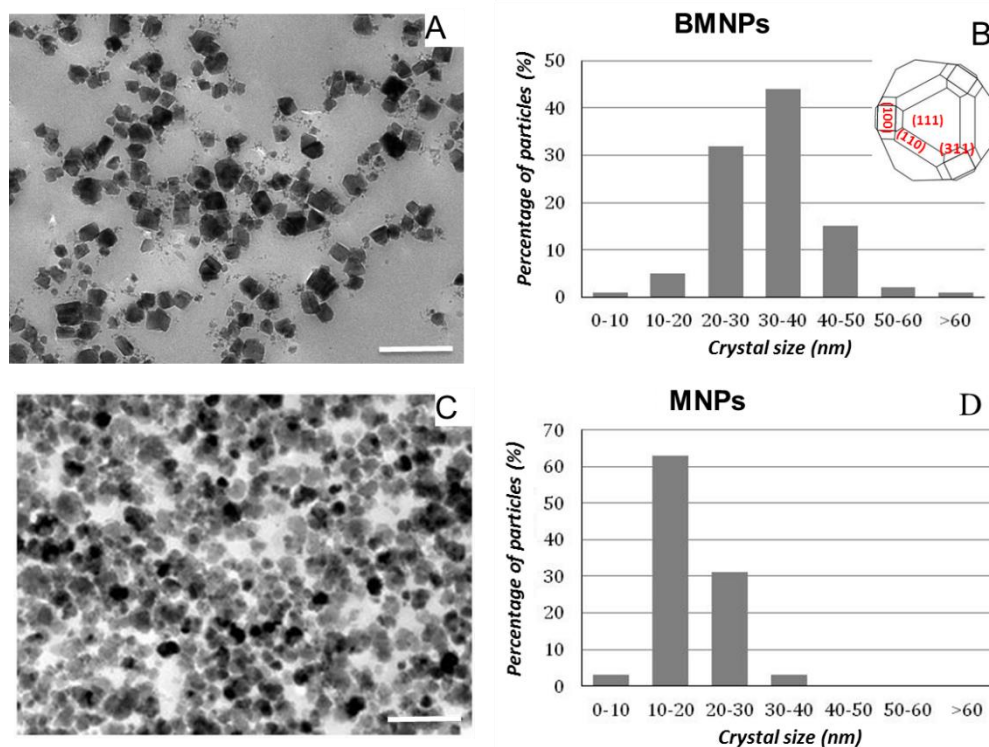
In addition, when dealing with cancer, as well as with other pathological conditions [16], the differences in the pH values between healthy and diseased tissues can be exploited to control the chemotherapeutic agent release. Indeed, the microenvironment in tumor sites usually is more acidic (pH 5.8) than in healthy tissues and blood plasma (pH 7.4) [17], and it is even more acidic in lysosomes (pH 4 - 5) and endosomes (pH 5 - 6), in which magnetite nanocarriers could also be internalized [17]. In the present paper we will also demonstrate that adsorption-desorption of the specific drug to BMNPs is activated by changes in the environmental pH values, i.e. the physiological neutral pH of healthy tissue versus the acidic pH at tumor sites.

Doxorubicin (DOXO), an anthracycline antibiotic, was selected as the model chemotherapeutic agent [17-20] because of its wide spectrum of anti-tumor activity [21]. DOXO interferes in the DNA reparation process mediated by topoisomerase II and produces reactive oxygen species that damage cellular structures [22, 23]. A major drawback associated with DOXO chemotherapy involves its significant severe side effects, concerning in particular cardiac function, and hepatic toxicity [22, 24]. These nonspecific side effects could be dramatically reduced by the use of cytocompatible drug nanocarriers and therefore the use of MamC-mediated BMNPs opens new perspectives in the clinical practice.

In this context, the present paper is the first work to explore the functionalization of MamC-mediated BMNPs with a chemotherapeutic agent, and how the release of this drug could be easily controlled by varying the pH in *in vitro* experiments.

## **Results and Discussion**

XRD analyses (not shown) reveal that magnetite comprises 100% of the solid precipitated in the experiments. TEM micrographs (Figure 1) show that most BMNPs exhibited isometric crystals with well-developed faces and a size ranging from 20 to 50 nm, with an average crystal size of  $33 \pm 11$  nm. Inorganic magnetites, in turn, display poorly defined morphologies and a crystal size ranging from 10 to 30 nm, with an average crystal size of  $15 \pm 6$  nm (Figure 1).



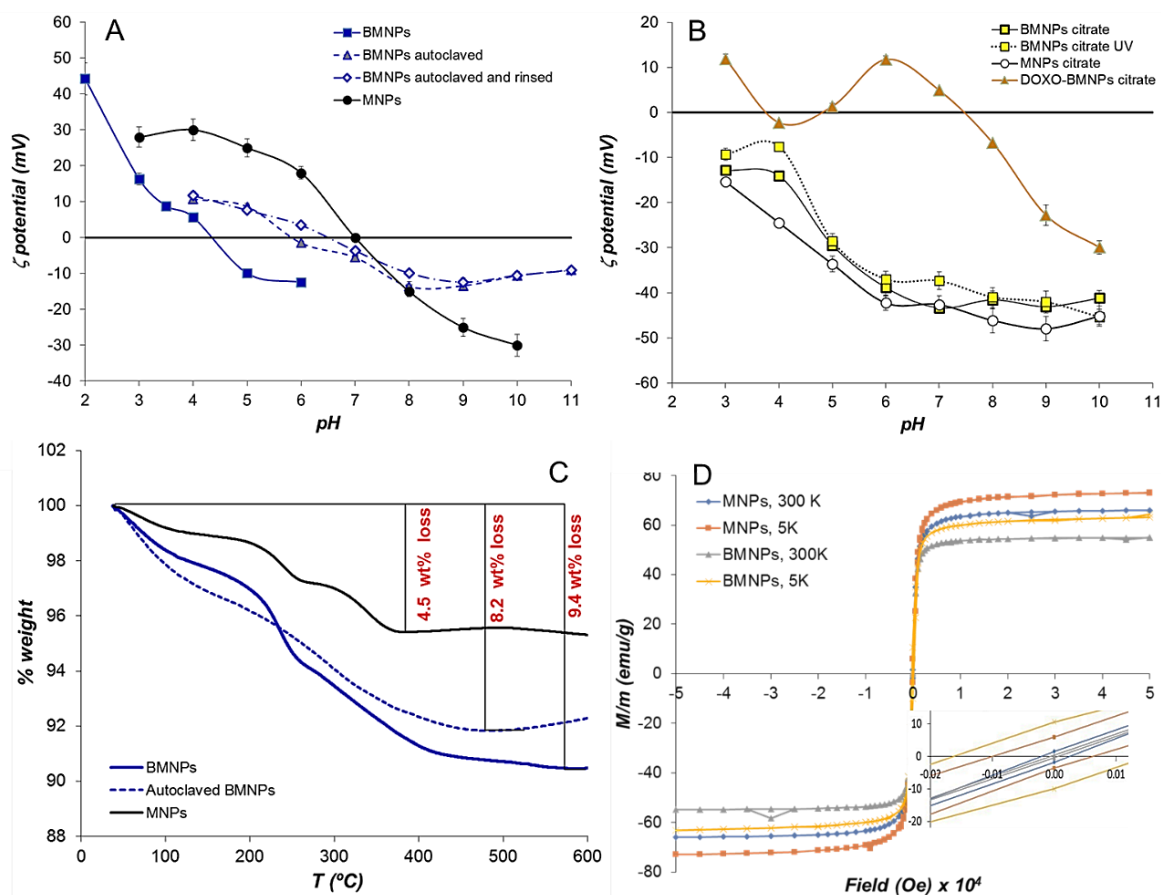
**Figure 1.** Magnetite crystals synthesized in presence of MamC (10  $\mu\text{g/mL}$ ) (BMNPs): (A) TEM images, (B) crystal size distribution. Insert: Modellization of BMNPs from HRTEM data by using SHAPE v7.3 Magnetite crystals synthesized in absence of any protein (inorganic magnetite: MNPs): (C) TEM images, (D) crystal size distribution. Scale bars in Figure 1A and 1C is 100 nm.

The specific surface area (SSA) determined by BET is  $97 \pm 2 \text{ m}^2/\text{g}$ . This value is higher than the geometric surface area determined for 40 nm size magnetite (density  $\sim 5 \text{ g/cm}^3$ ) which is  $30 \text{ m}^2/\text{g}$ , and higher than the geometric surface area for particles displaying the octahedral morphology when considering the size distribution for BMNPs of Figure 1 ( $\sim 48 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Several reasons can account for this difference between calculated and measured SSA by BET method. On one hand, it is necessary to consider that these biomimetic nanoparticles are covered by MamC in such an amount that the surface charge of the magnetite is that of the protein, as it will be detailed below. Therefore, the attached MamC contributes to the SSA of the BMNPs. Also, surface roughness originated in surface terminated crystals by spirals, terraces or kinked zones is an important contribution to the SSA. On the other hand, the crystals tend to aggregate and pack forming mesoporous structures, especially the smaller particles. Specific surface area BET of mesoporous magnetite nanoparticles reported in the literature show values as high as  $\sim 90 \text{ m}^2/\text{g}$  [36],  $286.9 \text{ m}^2/\text{g}$  for 98 nm size  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

nanoparticles [37], 53.7 m<sup>2</sup>/g for ~14 nm biogenic magnetite particles [38], 172 m<sup>2</sup>/g for 6.9 nm Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles [39], from 99 m<sup>2</sup>/g (unmodified magnetite) to 400 m<sup>2</sup>/g when increasing the SiO<sub>2</sub> content in SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites [40]. Therefore, our value of 97 m<sup>2</sup>/g is within the range of SSA determined for magnetite in other studies.

The plots of  $\zeta$ -potential versus pH (Figure 2) reveal significant differences among the values measured in aqueous suspensions of either uncoated nanoparticles (Figure 2A) or coated with citrate (Figure 2B). Citrate-coated nanoparticles are negatively charged within the studied pH range, which is consistent with the exposure of the carboxylic groups present in the citrate. All MNPs (MNPs, BMNPs, BMNPs autoclaved or BMNPs autoclaved and rinsed) that were not coated with citrate are positively charged at low pH values and negatively charged at high pH values. The isoelectric point (iep) for these particles, determined from the  $\zeta$ -potential calculations is 7.0 for MNPs, 4.4 for BMNPs, 5.8 for BMNPs autoclaved and of 6.5 for BMNPs autoclaved and rinsed. These findings suggest that MamC is strongly attached to (or maybe incorporated into) the crystals because even after a careful rinsing with the aim of removing the protein from the crystal, the surface charge of the biomimetic nanoparticles was never that of the pure inorganic magnetites. This observation is further confirmed by TGA analyses (Figure 2C). The total weight per cent (wt%) loss of BMNPs is 9.4, while that for MNPs is 4.5, indicating that BMNPs are composed of 95.1 wt% of magnetite and 4.9 wt% of MamC. The amount of MamC in the BMNPs autoclaved is slightly lower (3.7 wt%). Therefore, MamC seems to have an important role in controlling not only the nanoparticle size distribution but also their surface properties. These results are in agreement with the saturation magnetization ( $M_s$ ) data (Figure 2D). As it can be seen in the inset, both MNPs and BMNPs present remanent magnetization at 5 K in the absence of external field, but not at 300 K, which confirms that both particles are superparamagnetic and have a blocking temperature < 300 K. These data are in agreement with the blocking temperatures reported in Valverde-Tercedor [15]. These authors concluded that the magnetization measurements of BMNPs vs those of MNPs indicate that the first type of nanoparticles are larger and, thus, have a larger magnetic moment per particle. According to our data,  $M_s$  for BMNPs is 55 emu/g, while that for MNPs is 66 emu/g (Figure 2D). The difference in saturation magnetization among BMNPs and MNPs is not so high considering the dilution effect of the coating and the reduction in the  $M_s$  value of the BMNPs could be caused by the incorporation of MamC. In fact, considering the TGA weight loss of BMNPs 9.4 and

MNPs 4.5% the corrected values of Ms for BMNPs and MNPs should be respectively  $55/(1-0.094) = 61$  emu/g and  $66/(1-0.045) = 69$  emu/g, which indicates that they are comparable.



**Figure 2.**  $\zeta$ -potential of: (A) MNPs, BMNPs, autoclaved BMNPs and autoclaved BMNPs and then rinsed with the goal of removing MamC. These particles were not coated with citrate; (B) MNPs, BMNPs, BMNPs treated with UV, DOXO-BMNPs coated with citrate. (C) Termogravimetric analyses of MNPs, BMNPs and autoclaved BMNPs. (D) Hysteresis cycle of BMNPs and MNPs at 5 K and 300 K. Inset: detail of the cycle in the absence of external magnetic field. In some data points the error bar is smaller than the symbol.

The iep for BMNPs (4.4) is very close to that for MamC (iep 4.47) [15], which suggests that MamC attaches (at least, partially) to the magnetite surface during crystal growth and changes their surface properties with respect to those produced by inorganic synthesis in the absence of any protein, in which the iep observed is  $\sim 7$ . This is consistent with the interaction model between MamC and magnetite proposed by other authors [41, 42] and with the isothermal titration calorimetry data obtained in previous

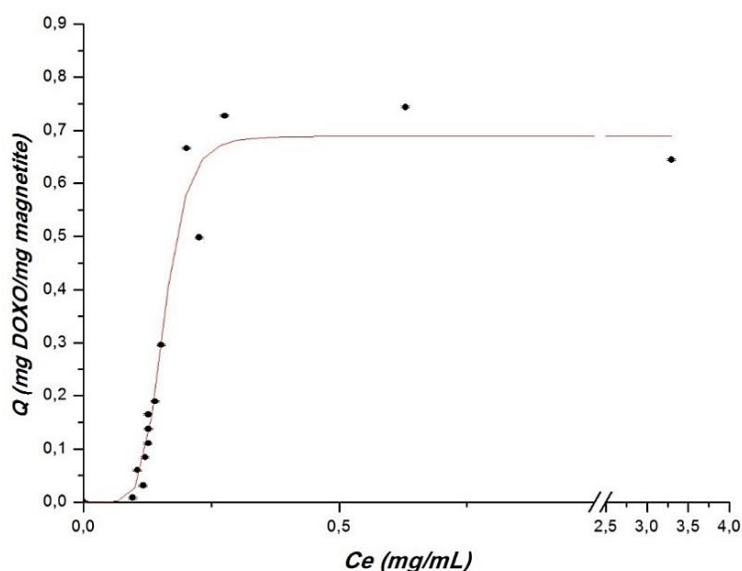
work [41] that showed a strong interaction between MamC and magnetite. According to the model proposed by these authors, the unique control exerted by MamC over the nucleation and grow process of magnetite is based on the confluence of two mechanisms. Firstly, and as other acidic proteins like Mms6 [8, 12], MamC interacts with aqueous iron cations through an ionotropic effect, thus inducing magnetite nucleation in the negatively charged areas created by the concentration of acidic aminoacids which in MamC are present both in the loop between the two MamC transmembrane domains and in the C-terminal domain [15, 41, 42]. Secondly, MamC has the unique characteristic that it provides an extended surface for magnetite templated growth due to the fact that two negatively charged aminoacids in this loop are at a distance that matches that between Fe cations in the specific crystal faces in magnetite (111), (110), (100) and (311) [42]. This templated growth extensively changes the magnetite nucleation and growth process, resulting in crystals that are different from those produced inorganically. The protein sticks to these specific faces listed above, inhibiting or slowing up their growth, and thus, these faces become mostly expressed in the final morphology of the MamC-mediated magnetite, as previously demonstrated [42]. A schematic image of the final morphology of BMNPs is shown in Figure 1B (insert). MamC is probably attached to these faces and it is expected to cover, totally or partially, the surface of magnetite, providing such a crystal with new surface properties. This is particularly important when magnetite nanoparticles are intended as nanocarriers.

When the BMNPs are functionalized with DOXO and exposed to different pH values, the  $\zeta$ -potential varies considerably within the studied pH range (Figure 2B). The binary biomimetic nanoparticles are positively charged at pH values  $< \sim 4$  and from  $\sim 5$  to  $\sim 7.5$ . At pH values above 7.5, the DOXO-BMNPs display negative  $\zeta$ -potential values. This indicates that the binary biomimetic nanoparticles are not identical over the pH range, probably because, once adsorbed on the BMNPs, different amounts of DOXO remain on the BMNPs depending upon the pH.

The time required to reach the equilibrium for DOXO adsorption (no net DOXO adsorption or desorption) was found to be 4 hours (data not shown). This time is lower than the one required for citrate-coated apatite nanocrystals (10 hours) [43], although it is higher than for citrate-coated gold nanoparticles (less than 30 seconds) [19] or graphene (less than 20 minutes) [20].



The amount of adsorbed drug per amount of nanoparticles ( $Q$ ) from the adsorption isotherm (Figure 3) shows a non-linear association with the amount of non-adsorbed DOXO ( $C_e$ ), displaying a S-shaped curve with a drug loading capacity ( $Q_{max}$ ) of  $0.69 \pm 0.03$  mg DOXO/mg magnetite. This value, expressed in mg DOXO/mg adsorbent is intermediate between those estimated for citrate-coated apatite (0.41 [43]), citrate-coated carbonated-apatite (0.44 [43]) and superparamagnetic iron-doped apatite nanocrystals (0.45 [43]) and that for graphene oxide nanoparticles (1.43 [20]). However, if we normalize respect to the specific surface area of our BMNPs ( $SSA = 97 \pm 2$  m<sup>2</sup>/g) and those reported for these apatite samples (90, 93 and 44 m<sup>2</sup>/g, respectively) the loading capacity is even lower.

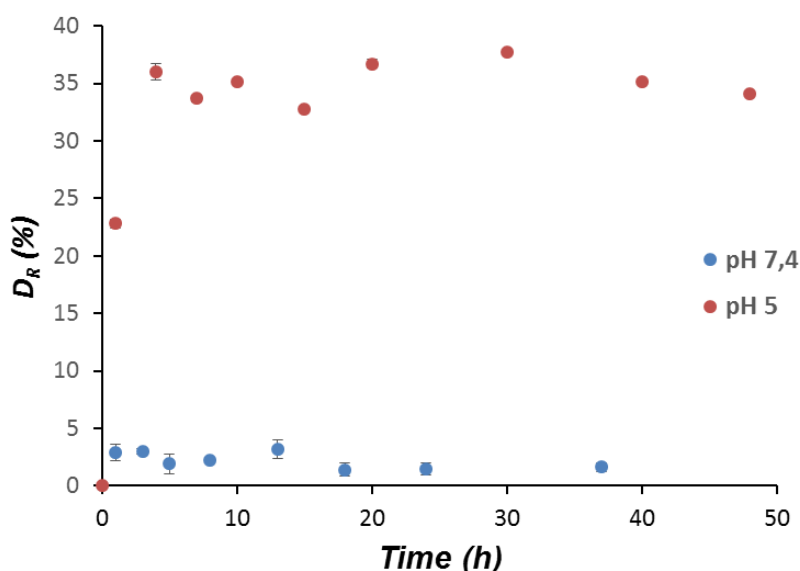


**Figure 3.** Adsorption isotherm of DOXO on BMNPs. The line represents the non-linear weighted least-squares (NWLS) fitting of the experimental data according to LF model. The vertical error bars are smaller than the symbol.

The value of  $Q$  increases slowly initially, rising then exponentially and stabilizing thereafter. The experimental data were adjusted according to the Langmuir and Langmuir-Freundlich (LF) models. However, only the LF model, which introduces the effects of energetic heterogeneity of the surface and the cooperativity between DOXO molecules fits the experimental data yielding a  $R^2 = 0.95901$ . The values of the LF affinity constant ( $K_{LF}$ ) and cooperativity coefficient ( $r$ ) parameters, calculated by means of this model (Equation 2), were of  $6.33 \pm 0.25$  mL/mg magnetite and  $6.97 \pm 1.30$ , respectively. The parameter  $K_{LF}$  is in line with the one previously reported for iron-doped apatite nanocrystals [43] of  $5.96 \pm 3.27$ ; however the value of  $r$  is

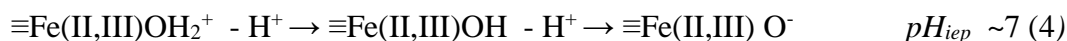
significantly higher than the  $1.7 \pm 0.4$  reported for this adsorbent. Such a high  $r$  coefficient indicates a strong positive cooperativity between DOXO molecules during the adsorption process. Thus, these parameters reveal that adsorbed molecules are not only interacting with the substrate but also between themselves as a pathway to decrease the adsorption energy.

The DOXO release at physiological pH (pH 7.4) is practically negligible, with release efficiency ( $D_R$ ) (Equation 3) values at 24 hours that do not exceed the 5% of the initially adsorbed DOXO (Figure 4). However, the release at pH 5 is quite fast at the beginning, since it only takes one hour to release a 20% of the initially adsorbed DOXO, and a maximum of ~35% of the initially adsorbed DOXO after 4 hours, which remains constant over the time. This sustained and long-lasting release in time of the chemotherapeutic drug after the first burst is beneficial in view of the expected nanomedical applications of these BMNPs.



**Figure 4.** Kinetics of DOXO release from loaded DOXO-BMNPs over time at physiological pH (pH 7.4) and at acidic pH (pH 5) at 25 °C.

$\zeta$ -potential values shown in Figure 2A and 2B are key to understand the mechanisms involved in DOXO adsorption to and desorption from MamC mediated biomimetic magnetite nanoparticles. In the purely inorganic MNPS, for instance, the hydrated surfaces remain basically uncharged at physiological pH (Figure 2) as a consequence of the dominant neutral surface species  $\equiv\text{Fe(II,III)OH}$  at this pH (Equation 4) [44]:



According to the equilibrium of the Fe-bearing species present on the surface of magnetites in aqueous solutions, at acidic pH, the magnetite surface is positively charged, as the dominant species are  $\text{Fe(II,III)OH}_2^+$ . As the pH value increases,  $\text{Fe(II,III)OH}$  becomes dominant, and, at even higher pH values, the dominant species are  $\text{Fe(II,III)O}^-$ , being, in these conditions, the surface of magnetite negatively charged. Since the iep of magnetite is  $\sim 7$ , the MNPs are neutral at physiological pH (Figure 2A), and, therefore, the functionalization of these MNPs could be attained only by means of providing new functional groups (ie, covering with citrate or other acids, that are able to change the  $\zeta$ -potential (and thus, the iep) of magnetite in aqueous solution [45] or by linking the molecule to the MNPs surface either by covalent or hydrogen bond, which would make it difficult the release of the coupled molecule at the desired site.

By contrast, BMNPs display an iep of 4.4, and since  $\zeta$ -potential and TGA analyses show that MamC is attached to the BMNPs, the changes in the  $\zeta$ -potential values of BMNPs with respect to those of MNPs should be attributed to the presence of MamC. Both the MamC loop and C-terminal display iep values of 4.31 and 4.25, respectively (calculated by using Expsy ProtParam tool). Therefore, it seems plausible to hypothesize that both protein domains are exposed at the surface of the BMNPs. In fact, some authors [41, 42] demonstrated that MamC loop attaches to the magnetite surface and that MamC forms mainly monomers and dimers in solution, probably through the hydrophobic (transmembrane) domains. According to these observations, it could be hypothesized that both a mixture of populations of monomers, and dimers are attached to the magnetite surface, mainly through the loop, thus exposing the C-terminal (monomers) and the MamC loop of the attached dimer to the outer layer. Therefore, the iep of the BMNPs becomes that of the exposed domains, ie. MamC loop (4.31) and C-terminal (4.25). The iep of these domains is determined by the predominant negatively charged aminoacids [acidic amino acids (Asp and Glu), and the lower number of positively charged amino acids (Lys and Arg)] present in these regions. In particular, MamC loop, (32 amino acids) contains 5 acidic and 2 basic amino acids. Similarly, the C-terminal of MamC (43 amino acids) contains 10 acidic and 3 basic amino acids. The pKa corresponding to the carboxylic group (-COOH) of the acidic amino acids is 3.86 for the Asp and 4.25 for the Glu, while that corresponding to the amino group (-NH<sub>2</sub>) of the basic aminoacids is 10.79 for Lys and 12.48 for Arg. At physiological pH, the

number of functional groups in the negative form (-COO<sup>-</sup>) is higher than that of the groups in the positive form (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) and, therefore, the BMNPs display a negative  $\zeta$ -potential value. This is important since it allows the functionalization of the BMNPs with molecules that display positively charged functional groups at these pH values by simple electrostatic interactions.

In this context, within the concentration ranges used in this work, DOXO forms dimers with antiparallel conformation in which their amino groups are directed to opposite directions [46]. Most of these amino groups, with a *pKa* 8.2 [18] are protonated (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) at pH 7.4, thus leading the DOXO dimers to display a net positive charge. Since, at the same pH, BMNPs display a net negative charge, the DOXO adsorption on BMNPs will be driven by electrostatic interactions between the protein acidic aminoacids located either at the C-terminal or at the loop. In the MamC-free magnetite faces (which are a minority) the DOXO adsorption could potentially also take place, but most probably through a covalent bond, forming esters, or by hydrogen bond. The pH-responsive release of DOXO molecules from these faces will hardly occur.

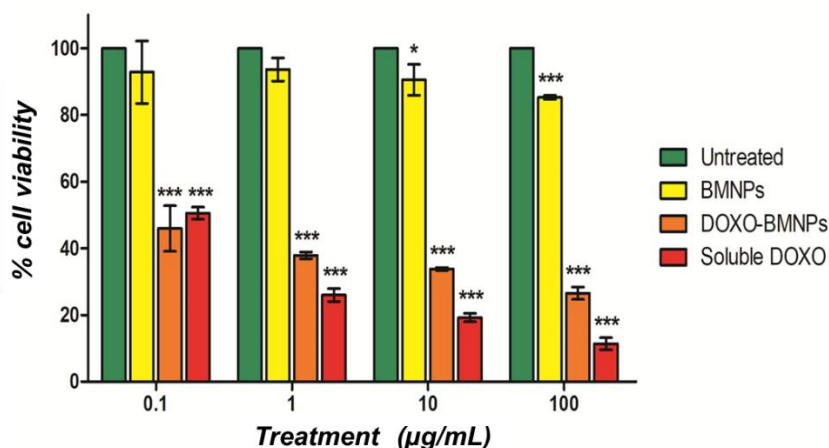
Since distinct magnetite crystal faces with different ionic configurations (and, thus, different net surface charges) are expressed in the final morphology of BMNPs [Figure 1A and B (detail)], different concentrations of MamC and distinct electrostatic interactions between the particle and DOXO are expected along the surface of the nanoparticle, resulting in a non-homogenous DOXO distribution along the crystal surface. In fact, the adsorption isotherm and its fitting to the Langmuir-Freundlich model strongly suggest that the surface of the magnetite is not energetically homogeneous.

On the other hand, electrostatic interactions may not be the only ones involved, as suggested by the *r* value of the Langmuir-Freundlich model, which indicates a positive cooperativity between the DOXO molecules during their adsorption. This phenomenon results in the reduction of the adsorption energy of non-occupied sites surrounded by occupied sites, also in accordance with the S-shaped of the adsorption isotherm. By consequence, the adsorption of DOXO molecules favors the adsorption of more DOXO molecules until the  $Q_{max}$  is reached. This model of electrostatic interactions and even the positive cooperative effect was also found in DOXO adsorption on citrate-coated apatite nanocrystals [18].

DOXO release at physiological pH (pH 7.4) was practically negligible ( $D_R < 5\%$ ) while this release exceeded 35% at pH 5, the pH mimicking the conditions in the

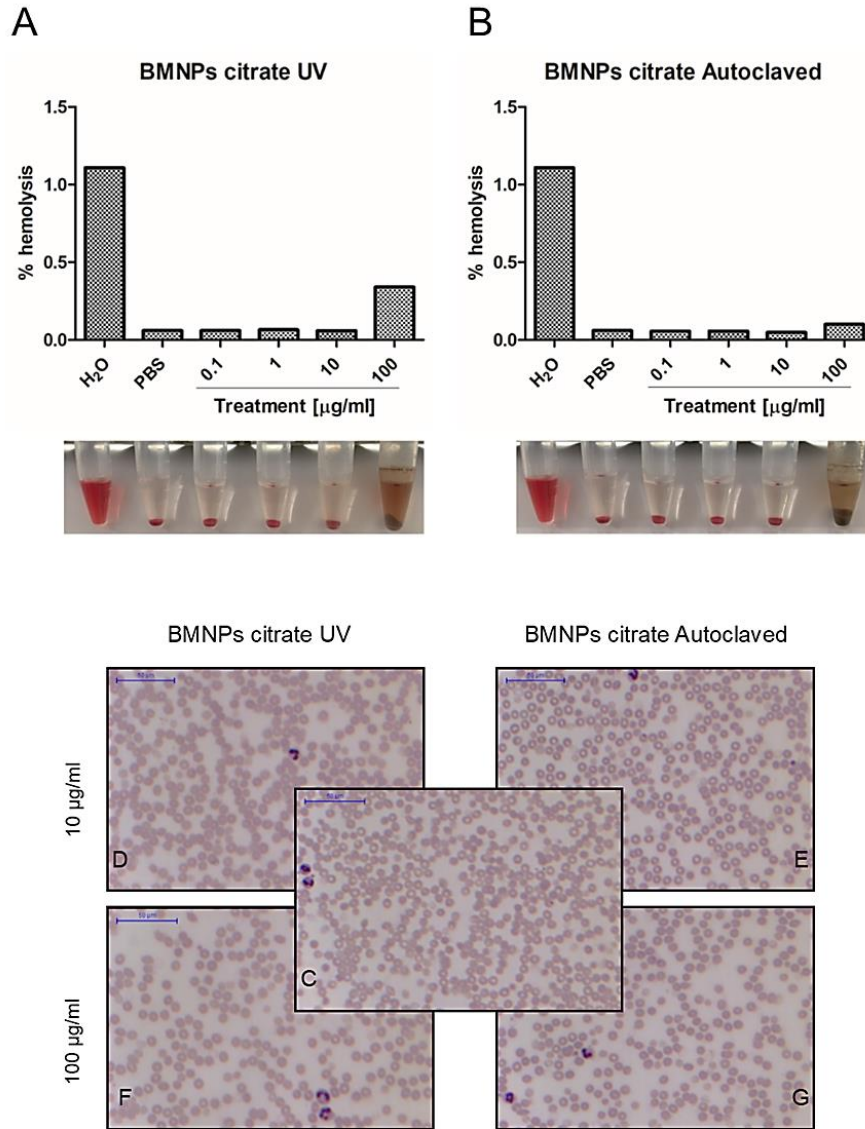
endosome-lysosome compartment [47] (Figure 4). On the basis of the electrostatic interaction model we propose that, when the pH value of the microenvironment decreases and approximates the pH value at which the particle reaches its iep, the electrostatic interaction between DOXO and the  $-\text{COO}^-$  weakens and the electrostatic repulsions between adsorbed adjacent DOXO molecules become stronger. As a result, DOXO is desorbed from the nanoparticle surface, starting from the outer layers of adsorbed molecules, which are probably those with the weakest electrostatic bonds. The calculated value of 35% of drug release at pH 5 is comparable to that obtained by other authors using iron oxide nanoparticles at pH 4.5 [45]. However, the stability of DOXO-BMNPs at pH 7.4 (maximum release of 5%) is greater than that of the iron oxide nanoparticles described above [45] (~ 17% release in just one hour). This is important for clinical practice in which no release of drug should occur in the blood stream until the target site is reached.

The cytocompatibility of non-loaded BMNPs-citrate was analyzed by measuring the survival of GTL-16 cells incubated for 3 days with different concentrations of nanoparticles in a MTT assay. They were found to be not significantly cytotoxic, since they induced a reduction in cell viability of only 15% at the highest concentration used (Figure 5). Similar cytocompatibility was observed also on other cell lines, such as the murine 3T3-NIH, m17.ASC, and the human Huh7 hepatocellular carcinoma cells (data not shown). By contrast, when the same amounts of BMNPs uploaded with DOXO were tested in this assay, they reduced cell survival in a dose dependent manner up to more than 70% at the highest dose tested of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of DOXO. In the same experiments, soluble DOXO was found to be more toxic than BMNPs-uploaded DOXO. Similar data have already been reported for other types of NPs, such as hydroxyapatite NPs [35] and can be accounted by the fact that in this condition DOXO could be internalized at a lower rate. Therefore, another further important property of the BMNPs described herein is their good cytocompatibility when incubated *in vitro* with a human gastric carcinoma cell line, but at the same time the possibility to become an efficient carrier for therapeutic molecules such as DOXO, which was shown to be able to kill these cells.



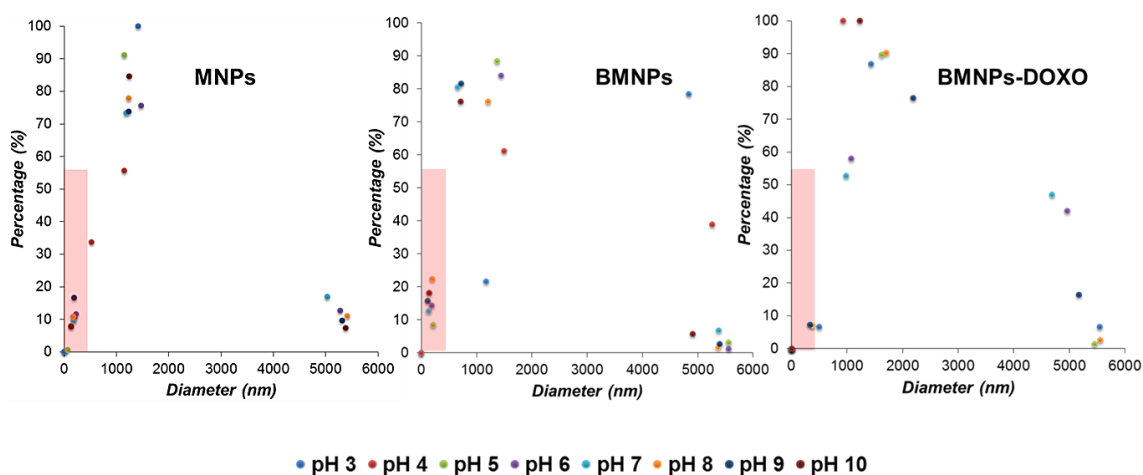
**Figure 5.** Cytocompatibility of the non-loaded BMNPs and cytotoxic activity of the DOXO-BMNPs on GTL-16 cell line. Cells were incubated with the same amounts of DOXO, either soluble or bound to MNPs and with comparable amounts of non-loaded BMNPs for 72 h and then cell viability was evaluated in a MTT assay. DOXO-BMNPs ratio was 0.70 mg/1 mg. Untreated cells were taken as reference value (100%) of viability. ANOVA one-way reveal statistical significance referred to untreated cells (\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ). Data are the average  $\pm$  standard error of the average (SEM) of three experiments performed in triplicates.

Since drug-loaded nanocarriers are generally administered by intravenous injection, their hemocompatibility was assessed by incubating them with red blood cells suspensions. BMNPs-citrate, either untreated or sterilized either under UV or by autoclave, were all found to be non-toxic in a wide concentration range in the hemolytic *ex vivo* test. Indeed, only at the highest dose tested of 100  $\mu\text{g/mL}$  could they induce the release of about 28% of haemoglobin in the case of UV treated BMNPs and of an insignificant 2% of haemoglobin in the case of autoclaved BMNPs (Figure 6A and B). Hemocompatibility was tested also by performing smear experiments on two series of whole blood samples, incubated with BMNPs-citrate, either untreated (Figure 6C) or incubated with two concentrations (10 and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) BMNPs sterilized either under UV (Figure 6D and F) or by autoclave (Figure 6E and G). In all these cases cells did not display signs of suffering or aggregation. We can thus conclude that BMNPs-citrate are hemocompatible, since they caused only a slight but acceptable RBC damage and only at the highest concentrations. No other significant differences in cytocompatibility or  $\square\square$ -potential were observed because of the treatments with UV.



**Figure 6.** Hemolytic response of human red blood cells (RBC) incubated with the serial dilutions of BMNPs, sterilized by UV (A) or by autoclave (B), PBS or distilled water for 24 h at room temperature. Top panels, Percentage of hemolysis in comparison with the positive (distilled water) and negative (PBS) controls, assessed by the absorbance of supernatant at 540 nm wavelength. Results are shown as means  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Bottom panels, representative images of RBC mixtures with PBS, BMNPs serial dilutions and distilled water after 24h incubation followed by centrifugation. Results in line with were observed also with untreated BMNPs. Pictures of the blood smears prepared from EDTA-anticoagulated blood incubated in PBS (C), with BMNPs, sterilized by UV (D, F) or by autoclave (E, G), 10  $\mu$ g/mL (D, E) or 100  $\mu$ g/mL. Scale bars in Figures is 50  $\mu$ m.

Hydrodynamic radius measurements show that there are different populations with different hydrodynamic size. Most of the nanoparticles are aggregated with a size  $> 1000$  nm (Figure 7) and, therefore, they could not undergo EPR effect. However there is still a population with a size  $\leq 150$  nm (dots within the colored area in the Figure) that could reach tumor site by EPR effect [48]. Nevertheless, EPR effect by itself might not be enough in this case to ensure a correct targeting of the tumor site and other ways of cell targeting such as additional coupling of the BMNPs with monoclonal antibodies combined with active guidance of the BMNPs to the target site by means of the application of an external magnetic field should be explored in the future to increase the efficiency of the targeting. Colloidal stability of these nanoparticles, nevertheless, should be also improved in the future.



**Figure 7.** Hydrodynamic size of the inorganic magnetic nanoparticles (MNP), biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs) and DOXO-BMNPs. The percentage of nanoparticles of a certain size for the different pH values measured is plotted. Colored area marks the size range of hydrodynamic radius  $\leq 150$  nm.

As a summary, there are a number of findings that make BMNPs unique and good candidates as potential drug nanocarriers for targeted drug delivery, although colloidal stability still needs to be improved. The advantages of the biomimetic nanoparticles of the present study are: (1) non-loaded BMNPs are cytocompatible, but they become cytotoxic when coupled with DOXO, (2) they exhibit a large magnetic moment per particle, (3) DOXO adsorption and release can be controlled efficiently by changes in pH, like those that naturally occur when entering from the blood stream to the tumor tissues, (4) MamC provides the surface of the BMNPs with functional groups



that allow coupling with other molecules, and (5) the DOXO-BMNPs nanoassembly is quite stable at physiological pH values.

## **Experimental Section**

### **Expression and purification of MamC**

The expression and purification of MamC as recombinant protein, and the synthesis of MamC-mediated magnetite nanoparticles were carried out according to the procedure described previously [15]. MamC was expressed in *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Spain), after transformation with the plasmid pTrcHis-TOPO (Invitrogen, Spain) carrying the MamC protein coding gene (Mmc1\_2265) coupled to a hexahistidine tag coding sequence at its 5' terminus. Protein expression was induced with isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) and protein purification was carried out by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) with an immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Then, MamC proteins were refolded through dialysis and their purity was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis.

### **Synthesis of inorganic magnetite and MamC mediated BMNPs nanoparticles**

The synthesis of purely inorganic magnetite nanoparticles (MNPs) was carried out at 25 °C and 1 atm total pressure from a solution containing 3.5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3.5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.78 mM Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5.56 mM FeCl<sub>3</sub> at a pH value of 9. Similarly, the synthesis of MamC mediated BMNPs was done by mixing the same aqueous solution added with 10  $\mu$ g/mL of the recombinant MamC. All solutions were prepared from oxygen free Milli-Q water deoxygenated by following the protocol described in Valverde-Tercedor [15]. Samples were incubated for 30 days. All experiments were performed inside an anaerobic COY chamber filled with an atmosphere of N<sub>2</sub> with 4% of H<sub>2</sub> to prevent magnetite oxidation. After the incubation period, the resulting magnetite nanoparticles were washed three times with deoxygenated Milli-Q water (50 mL). A set of MNPs and BMNPs was stored in HEPES buffer (pH 7.4) inside the Coy Chamber until further analyses. Also, some of these BMNPs were autoclaved (121 °C, 15 minutes) with the goal of removing MamC (here referred as BMNPs autoclaved), and, later, some of these nanoparticles were rinsed to further eliminate MamC (here referred as BMNPs autoclaved rinsed). Another set of MNPs and BMNPs were suspended in citrate buffer (20 mg/mL) overnight with the goal of providing more functional groups that might facilitate the coupling, and then rinsed and resuspended in

HEPES buffer. These samples are here referred as MNPs-citrate and BMNPs-citrate. Aliquots of 1 mL of BMNPs-citrate nanoparticles (5 mg/mL) were exposed to UV-light for 20 min. After that, the sample was treated with ultrapure N<sub>2</sub> to prevent potential magnetite oxidation. All samples were kept inside the COY chamber at 25°C.

### **Nanoparticles characterization**

Powder X-ray diffraction (XRD) analysis was carried out 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; 3s per step). Identification of the precipitates was performed by using the X Powder software [25].

Transmission electron microscopy (TEM) analyses of nanoparticles were performed with a STEM Philips Model CM20 microscope. Magnetic nanoparticles were embedded in Embed 812 resin. Ultrathin sections (50–70 nm) were prepared using a Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and deposited onto copper grids. The size of the crystals was measured using the ImageJ 1.47 program, and size distribution curves were determined from these measurements using Origin 8. To ensure reproducibility of results, particle sizes were measured on multiple micrographs with an accumulated amount of about 1000 nanoparticles measured for each experiment.

Magnetization measurements were carried out by using a Quantum Design Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) 5T magnetic properties measurement system (MPMS). Under gentle argon flow, 1.6 mg of MNPs and 1.01 mg of BMNPs was placed in a double-walled polycarbonate capsule. Hysteresis cycles for each type of nanoparticles were run at 5 K and 300 K.

The stability of the samples was determined by means of recording the sedimentation process of the different nanoparticles (MNPs, BMNPs, BMNPs-UV, and DOXO-BMNPs). A volume of 0.5 mL 5 mg/mL of these different nanoparticles in HEPES buffer, pH 7.4, was shaken in a vortex for 1 minute and let it sediment. This was considered the time zero of the experiment. For each experiment type, the end of the sedimentation time was considered when a pellet form at the bottom of the tubing.

The measurements of the hydrodynamic radius and electrophoretic mobility of the nanoparticles were performed at 25 °C in a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, Instruments Ltd, UK) using disposable polystyrene cuvettes. The instrument uses the dynamic light scattering (DLS) technique to provide a measurement

of the particle size distribution of the nanoparticles in suspension. Additionally, it also incorporates a zeta potential analyzer that uses electrophoretic light scattering and provides  $\zeta$ -potential values, determined from electrophoretic mobility measurements, by applying the Smoluchowski's mobility equation [26].

Electrophoretic mobility was measured in inorganic magnetites and BMNPs, both uncoated and coated with citrate as well as in DOXO loaded BMNPs (hereafter DOXO-BMNPs or binary biomimetic nanoparticles). Hydrodynamic radius was measured on MNPs-citrate, BMNPs-citrate and DOXO-BMNPs. Stock suspensions of each type of the nanoparticles were prepared in 10 mL of oxygen-free NaClO<sub>4</sub> (10 mM). Aliquots of 200  $\mu$ L of each stock were inoculated in eleven flasks, each one containing oxygen-free NaClO<sub>4</sub> 10 mM, being 10 mL the final volume per flask. The pH of each one of the flasks was adjusted by adding oxygen-free HCl (0.1 M) or oxygen-free NaOH (0.1 M) to different pH values ranging from 2 to 11 depending on the sample. Samples were sonicated for 2 minutes before the measurements. Nine replicas were performed per each measurement.

Thermogravimetric analyses (TGA) were run on ~10 mg of solid, by heating the sample in an alumina cell under N<sub>2</sub> atmosphere, at a rate of 20 °C min<sup>-1</sup> up to a final temperature of 950 °C.

Nitrogen sorption isotherms of powdered samples were obtained at 77 K on a TriStar 3000 equipment (Micromeritics). About 50 mg of sample was degassed at 100 °C for 4 h prior to analysis using a sample degas system (VacPrep 061, Micromeritics). The surface area of the samples was determined using the BET method [27].

### **DOXO adsorption and release**

Doxorubicin hydrochloride (DOXO, C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>•HCl) was purchased from Sigma Aldrich. The molecular weight of the molecule without HCl is 543.52 g/mol. The kinetics of DOXO adsorption on BMNPs was carried out to determine the time needed to reach equilibrium. For these analyses, aliquots of the suspension of the BMNPs-citrate (5 mg) were added with 1 mL of DOXO (2 mM) in HEPES buffer (10 mM, 1 mL, pH 7.4). Mixtures were incubated at 25 °C for different time intervals, up to 48 h, under continuous mixing at 150 rpm in dark to prevent DOXO photodegradation [28]. Then DOXO-BMNPs, here referred as binary biomimetic nanoparticles, were removed from the solution containing the non-adsorbed DOXO molecules by supercentrifugation

at 10,000 rpm for 5 minutes. The pellets were washed twice with 1 mL of HEPES buffer and all supernatants were measured by UV-Vis spectroscopy at a wavelength of 480 nm. The amount of non-adsorbed DOXO ( $C_e$ ) and the amount of adsorbed DOXO per mass unit of adsorbent ( $Q$ ) was calculated from these measurements. The molar absorptivity of DOXO in HEPES buffer at 480 nm was determined as  $9123.3 \text{ L mol}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9989$ ) from the slope of a standard calibration straight line. More than three replica were performed per experiment. The standard deviation of the absorbance measurements was used to calculate the error in the DOXO concentration in the supernatant ( $[DOXO]_{sn}$ ).

The adsorption isotherms were obtained by mixing 5 mg of BMNPs-citrate, with 1 mL of different concentrations of DOXO, up to 7.4 mM, in HEPES buffer. More than 15 independent experiments were performed at equal or different initial concentrations of DOXO in the supernatant to build the adsorption isotherm. Experiments were replicated to ensure reproducibility. Mixtures were incubated at 25 °C for 4 h (time required to reach equilibrium, according to the adsorption kinetic). The data were fitted to the models of Langmuir and Langmuir-Freundlich by using Origin 8. The Langmuir adsorption model [29] considers that the surface is energetically homogeneous and the maximum adsorption surface occurs in a monolayer, without considering the possible interaction among the adsorbed drug molecules [29, 30]. The Langmuir model is defined by the Equation (1), where  $Q$  is the amount of adsorbed drug per amount of nanoparticles,  $K_L$  is the Langmuir affinity constant,  $Q_{max}$  is the drug loading capacity and  $C_e$  is the equilibrium concentration of drug in the supernatant [29].

$$Q = \frac{Q_{max}(K_L C_e)}{1 + (K_L C_e)} \quad (1)$$

Alternatively, the LF model considers that the adsorption energy is heterogeneous, and cooperativity effects are also taken into account. This model is described by Equation (2), where  $K_{LF}$  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 [31].

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

Since the concentration of DOXO in the equilibrium ( $C_e$ ) is dependent on the error of  $[DOXO]_{sn}$ , being that associated to the error on the measurements of the absorbance, the calculations of the errors in  $C_e$  and  $Q_{max}$  were done by applying the propagation error theory.

Drug release was analyzed at pH 7.4 and pH 5.0. The DOXO-BMNPs were suspended in HEPES (10 mM, 1 mL, pH 7.4) or acetate buffer (10 mM, 1 mL, pH 5.0), both solutions containing NaCl 0.2 M. Suspensions were incubated at 37 °C, 150 rpm for different time intervals up to 48 h. Samples were centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes and supernatants were analyzed by UV-vis spectroscopy. The release efficiency ( $D_R$ ) was defined by the Equation (3), as the ratio between the amount of released molecules at a fixed time  $t$  ( $Q(t)$ ) and the  $Q_{max}$  [20].

$$D_R = \frac{Q(t)}{Q_{max}} \times 100 \quad (3)$$

### **Hemocompatibility test**

Hemocompatibility was assessed *ex vivo*, as previously described with some modifications [32, 33, 34]. Briefly, 0.5 mL of human blood was obtained by intravenous puncture from an informed volunteer and centrifuged (10 min, 2000 rpm). Supernatants were discarded and the red blood cells (RBC) were resuspended in PBS and washed twice with PBS to remove traces of plasma. RBCs were then resuspended in PBS, at a concentration of  $4 \times 10^9$  cells/ mL. Serial dilutions (0.1-100  $\mu$ g/mL) BMNPs-citrate (either treated under UV or autoclaved) were prepared and a volume of 0.5 mL of the specific dilution was mixed with 25  $\mu$ L of RBC suspension. The mixtures were incubated at 25 °C, under continuous agitation for 10 min or 24 h and then centrifuged (5 min, 2000 rpm). The absorbance of the solution was measured at 540 nm wavelength, and the values were compared with the positive (distilled water) and negative (PBS) controls. For blood smears preparation, after incubation of cells with BMNPs, the latter were withdrawn by a magnet, cells washed once and smears were prepared and stained using the May-Grünwald Giemsa (MGG, Biolyon, Dardilly, France) technique. Samples were analyzed by optical microscopy (Nikon ECLIPSE Ci) and photos were taken with a digital camera.

### **Cytotoxicity tests of BMNPs and DOXO-BMNPs**

The GTL-16 cell line, derived from a poorly differentiated human gastric carcinoma, was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50 U/mL penicillin, and 50  $\mu$ g streptomycin. Cells were transplanted when they were at 80-90% confluency to 1/3 - 1/4. This cell line was used previously to test other nanoparticles as drug carriers because it is easily manageable and, moreover, it can be considered a tumor cell model as it overexpresses the tumor marker Met/HGFR, which is targetable by a monoclonal antibody used as probe [35]. The cytotoxicities of the non-loaded BMNPs or of the DOXO-BMNPs were evaluated on this cell line, as already described [18, 35]. Approximately  $12 \times 10^3$  cells/well were incubated in 96-well plates for 24 h. Then different equimolar amounts of DOXO, either soluble or adsorbed to the BMNPs (DOXO-BMNPs) as well as of non-loaded BMNPs-citrate, were added. After 3 days incubation, cell viability was evaluated by the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Briefly, 20  $\mu$ L of MTT solution (5 mg/mL in PBS solution) was added to each well and the plate was incubated at 37 °C for 2 h. Afterwards, the supernatants were carefully aspirated and 125  $\mu$ L of 0.2 N HCl in isopropanol was added to dissolve the formazan crystals formed. Finally, the optical density was measured in a multiwell reader (2030 Multilabel Reader Victor TM X4, PerkinElmer) at 570 nm. Viability of parallel cultures of untreated cells was taken as 100% viability and values obtained from treated cells were referred to this value. Experiments were performed 3 times using 3 replicates for each sample.

### **Conclusions**

The potential role of BMNPs produced in the presence of MamC as drug nanocarriers has been assessed for the first time. The BMNPs produced in the present study are pH-sensitive nanocarriers in which DOXO adsorption is mostly driven by electrostatic interactions between positively charged DOXO amino groups and negatively charged acidic residues of the MamC that is attached to the surface of the crystal. By contrast, desorption of DOXO from the DOXO-BMNPs nanoassembly is achieved by weakening this bond as pH decreases and approaches to the iep of the BMNPs (iep 4.4). The adsorption process follows a Langmuir-Freundlich model, which shows that the surface of the magnetite is energetically heterogeneous and displays

positive cooperativity. The BMNPs coupled with DOXO (DOXO-BMNPs) is stable at physiological pH with maximum releases of 5% of the initial DOXO adsorbed while the desorption process is efficient, since about the 35% of the adsorbed drug was released in just 4 hours at pH 5. Moreover, these DOXO-BMNPs nanoassemblies are cytotoxic for the GTL-16 carcinoma cell line, in which they induced more than 70% of mortality. This toxicity was dependent on the DOXO adsorbed to the BMNPs, since not functionalized nanoparticles were highly cytocompatible and hemocompatible when in presence of red blood cells. All together these data indicate that BMNPs are unique magnetite nanoparticles with novel properties acquired thanks to their interaction with the protein MamC and, therefore, their potential as nanocarriers should be further explored in future studies

## **Acknowledgements**

Thanks go to M<sup>a</sup> Antonia Fernandez Vivas and Rafael Lopez-Moreno for technical assistance in the laboratory and data analysis, Angel Delgado Mora for assistance in electrophoretic mobility measurements and to the CIC personnel of the University of Granada for technical assistance in the TEM. Thanks go to Nicolás López Baeza for some of the electrophoretic mobility measurements. CJL wants to thank projects CGL2013-46612 and CGL2016-76723 from the Ministerio de Economía y Competitividad from SPAIN and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) for financial support and Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 of the University of Granada. This research is original and had a financial support also from the Università del Piemonte Orientale “A. Avogadro”, Italy. We also wish to thank the Senior Editor of the Journal, Dr. Zhan Chen, and three anonymous reviewers for their suggestions that greatly improved the present manuscript

## **References**

- [1] Alphantery, E.; Faure, S.; Raison, L.; Duguet, E.; Howse, P. A.; Bazylinski, D. A. Heat production by bacterial magnetosomes exposed to an oscillating magnetic field. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 18–22.
- [2] Prozorov, T.; Bazylinski, D.A.; Mallapragada, S. K.; Prozorov, R. Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: Topical review. *Materials Science and Engineering R* **2013**, *74*, 133–172.

- [3] Mou, X.; Ali, Z.; Li, S.; He, N. *J. Applications of magnetic nanoparticles in targeted drug delivery system . Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 54-62.
- [4] Estelrich, J.; Escribano, E.; Queralt, J.; Busquets, M. A. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 8070-8101.
- [5] Doane, T. L.; Burda, C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2885-2911.
- [6] Bazylinski, D. A.; Frankel, R. B. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 217-230.
- [7] Sun, J.; Tang, T.; Duan, J.; Xu, P.-X.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Wu, L.; Li, Y. Biocompatibility of Bacterial Magnetosomes: Acute Toxicity, Immunotoxicity and Cytotoxicity. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 271–283.
- [8] 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.
- [9] Kolhatkar, A.G.; Jamison, A. C.; Litvinov, D.; Willson, R. C. and Lee, T.R. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* **2013**, *14*(8), 15977–16009.
- [10] Zhang, F.; Zhao, L.; Wang, S.; Yang, J.; Lu, G.; Luo, N.; Gao, X.; Ma, G.; Xie, H.Y.; Wei W. Construction of a biomimetic magnetosome and its Application as a SiRNA carrier for high-performance anticancer therapy. *Advanced Functional Materials* **2017**, *28* (1), 1703326.
- [11] Timko, M.; Dzarova, A.; Kovac, J.; Skumiel, A.; Jozefczak, A.; Hornowski, T.; Gojzewski, H.; Zavisova, V.; Koneracka, M.; Sprincova, A.; Strbak, O.; Kopcansky, P.; Tomasovicova, N. Magnetic properties and heating effect in bacterial magnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mat.* **2009**, *321*, 1521–1524.
- [12] Boucher, M.; Geffroy, F.; Prévéral, S.; Bellanger, L.; Selingue, E.; Adryanczyk-Perrier, G.; Péan, M.; Lefèvre C.T.; Pignol, D.; Ginet, N.; Mériaux, S. Genetically tailored magnetosomes used as MRI probe for molecular imaging of brain tumor. *Biomaterials* **2017**, *121*, 167-178.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.



- [16] Bellocq, A.; Suberville, S.; Philippe, C.; Bertrand, F.; Perez, J.; Fouqueray, B.; Cherqui, G.; Baud, L. Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5086-5092.
- [17] Guo, M.; Yan, Y.; Zhang, H.; Yan, H.; Cao, Y.; Liu, K.; Wan, S.; Huang, J.; Yue, W.; Gao, J.; Kwon, I. C. Magnetic and pH-responsive nanocarriers with multilayer core-shell architecture for anticancer drug delivery. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 5104-5112.
- [18] Rodríguez-Ruiz, I.; Delgado-López, J. M.; Durán-Olivencia, M. A.; Iafisco, Tampieri, M.A.; Colangelo, D.; Prat, M.; Gómez-Morales, J. pH-responsive delivery of doxorubicin from citrate-apatite nanocrystals with tailored carbonate content. *Langmuir* **2013**, *29*, 8213-8221.
- [19] Curry, D.; Cameron, A.; MacDonald, B.; Nganou, C.; Scheller, H.; Marsh, J.; Beale, S.; Lu, M.; Shan, Z.; Kaliaperumal, R.; Xu, H.; Servos, M.; Bennett, C.; MacQuarrie, S.; Oakes, K. D.; Mkandawire, M.; Zhang, X. Adsorption of doxorubicin on citrate-capped gold nanoparticles: insights into engineering potent chemotherapeutic delivery systems. *Nanoscale* **2015**, *7*, 19611-19619.
- [20] Wu, S.; Zhao, X.; Li, Y.; Du, Q.; Sun, J.; Wang, Y.; Wang, X.; Xia, Y.; Wang, Z.; Xia, L. Adsorption properties of doxorubicin hydrochloride onto graphene oxide: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Materials* **2013**, *6*, 2026-2042.
- [21] Beretta, G. L.; Zunino, F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. *Top Curr Chem.* **2008**; *283*, 1-19.
- [22] Thorn, C. F.; Oshiro, C.; Marsh, S.; Hernandez-Boussard, T.; McLeod, H.; Klein, T. E.; Altman, R. B. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* **2011**, *21*, 440-446.
- [23] Kremer, L. C. M.; van Dalen, E. C.; Offringa, M.; Voûte, P. A. Frequency and risk factors of anthracycline-induced clinical heart failure in children: a systematic review. *Ann. Oncol.* **2002**, *13*, 503-512.
- [24] Longhi, A.; Ferrari, S.; Bacci, G.; Specchia, S. Long-term follow-up of patients with doxorubicin-induced cardiac toxicity after chemotherapy for osteosarcoma. *Anticancer. Drugs* **2007**, *18*, 737-744.
- [25] Martin-Ramos, J. D. Using X Powder: A Software Package for Powder X-ray Diffraction Analysis, D.L. GR 1001/04, 2004.
- [26] Von Smoluchowski, M. In *Handbuch der Elektrizität und des Magnetismus*; Greatz, L., Ed.; Barth, Leipzig, Germany, 1921; Vol. 2, p 366
- [27] Brunauer, S.P.; Emmett, H.; Teller, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309-319.
- [28] Beijnen, J. H. Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* **1986**, *32*, 123-131.

- [29] Langmuir, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40*, 1361-1403.
- [30] Rill, C.; Kolar, Z. I.; Kickelbick, G.; Wolterbeek, H. T.; Peters, J. A. Kinetics and thermodynamics of adsorption on hydroxyapatite of the [160Tb]terbium complexes of the bone-targeting ligands DOTP and BPPED. *Langmuir* **2009**, *25*, 2294-2301.
- [31] Turiel, E.; Perez-Conde, C.; Martin-Esteban, A. Assessment of the cross-reactivity and binding sites characterization of a propazine-imprinted polymer using the Langmuir-Freundlich isotherm. *Analyst*. **2003**, *128*, 137-141.
- [32] Fornaguera, C.; Calderó, G.; Mitjans, M.; Vinardell, M. P.; Solans, C.; Vauthier, C. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. *Nanoscale* **2015**, *7*, 6045-58.
- [33] Tombácz, E.; Farkas, K.; Foldesi, I.; Szekeres, M.; Illés, E.; Tóth, I.Y.; Nesztor, D.; Szabó, T. Polyelectrolyte coating on superparamagnetic iron oxide nanoparticles as interface between magnetic core and biorelevant media. *Interface Focus* **2016**, *6*, 20160068.
- [34] Szekeres, M.; Tóth, I.; Illés, E.; Hajdú, A.; Zupkó, I.; Farkas, K.; Oszlanczi, G.; Tiszlavicz, L.; Tombácz, E. Chemical and colloidal stability of carboxylated core-shell magnetite nanoparticles designed for biomedical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 14550–14574.
- [35] 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.
- [36] Jain, S.; Shah, J.; Dhakate, S. R.; Gupta, G.; Sharma, C.; Kotnala, R. K. Environment-Friendly Mesoporous Magnetite Nanoparticles-Based Hydroelectric Cell. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122(11)*, 5908–5916.
- [37] Ma, J.; Wang, L.; Wu, Y.; Dong, X.; Ma, Q.; Qiao, C.; Zhang, Q.; Zhang, J. Facile synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with a high specific surface area. *Materials Transactions* **2014**, *55 (12)*, 1900-1902.
- [38] Sundman, A.; Byrne, J. M.; Bauer, I.; Menguy N.; Kappler, A. Interactions between magnetite and humic substances: redox reactions and dissolution processes. *Geochem. Trans.* **2017**, *18(6)*, 12 p;
- [39] Sarno, M.; Ponticorvo, E.; Cirillo, C. High surface area monodispersed Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles alone and on physical exfoliated graphite for improved supercapacitors. *J. Phys. Chem. Solids* **2016**, *99*, 138–147.
- [40] Semko, L. S.; Khutornoi, S. V.; Abramov, N. V.; Gorbik, P. P. Synthesis, structure, and properties of large surface area Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> Nanocomposites. *Inorg. Mater.* **2012**, *48 (4)*, 374–381.
- [41] 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-biomineralizing magnetosome-associated protein MamC. *J. Struct. Biol.* **2016**, *194*, 244-252.

[42] 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. 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.

[43] 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.

[44] 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.

[45] Kievit, F. M.; Wang, F. Y.; Fang, C.; Mok, H.; Wang, K.; Silber, J. R.; Ellenbogen, R. G.; Zhang, M. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer *in vitro*. *J. Control. Release* **2011**, *152*, 76-83.

[46] Agrawal, P.; Barthwal, S. K.; Barthwal, R. Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1437-1451.

[47] Geisow, M. J.; Evans, W. H. pH in the endosome. Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis. *Exp. Cell Res.* **1984**, *150*, 36-46.

[48] 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.

### **Chapter III. Functionalized biomimetic magnetic nanoparticles as effective nanocarriers for targeted chemotherapy**

Ana Peigneux<sup>1†</sup>, Francesca Oltolina<sup>2†</sup>, Donato Colangelo<sup>2</sup>, Guillermo R. Iglesias<sup>3</sup>, Angel V. Delgado<sup>3</sup>, Maria Prat<sup>2,4\*</sup>, Concepcion Jimenez-Lopez<sup>1\*</sup>

\* Corresponding authors

†Both authors have equally contributed

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

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale A. Avogadro, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy

<sup>3</sup> Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, s/n, 18071 Granada, Spain

#### **Abstract**

Novel MamC-mediated biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs) are proposed as valuable carriers for targeted chemotherapy because of the size ( $36 \pm 12$  nm) and of surface properties conferred by MamC coating. They are superparamagnetic at room and body temperatures, have a large magnetic moment per particle, mediate hyperthermia, are cytocompatible, and, having a negative surface charge at physiological *pH*, can be efficiently coupled with DOXOrubicin (DOXO) and a monoclonal antibody (mAb) directed against the human Met/HGF receptor (overexpressed in many cancers) displaying coupling stability, while releasing DOXO at acidic *pH*. This release can be enhanced by hyperthermia. The DOXO-mAb-BMNPs selectively recognize Met, bind efficiently to Met<sup>+</sup> tumor cells, and discharge DOXO within their nuclei more efficiently than DOXO-BMNPs, exerting cytotoxicity. These data represent proof of concept for future *in vivo* experiments in which the controlled dual targeting (mAb-mediated and magnetic) approach and combined (chemotherapy and hyperthermia) therapy will be studied.

**Keywords:** magnetic nanoparticles; tumour targeting; monoclonal antibodies; cytotoxicity; Doxorubicin.

## **Introduction**

Cancer is still a highly challenging disease that requires improved therapeutic strategies to replace or partner the current treatments to increase efficiency and specificity. Nanomedicine, and in particular nanoparticles (NPs), because of their large surface/volume ratio, may represent one of the possible alternatives, since they are efficient multifunctional devices for a targeted chemotherapy.<sup>[1,2]</sup> Moreover, they can also be used in theranostics, as they can simultaneously be used (either by themselves or functionalized) for diagnostics.<sup>[1,3-5]</sup> Magnetic nanoparticles (MNPs), especially magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) are one of the most demanded NPs because of their magnetic properties, which allow, on one hand, their guidance toward the target by external magnetic fields (continuous gradient magnetic field, GMF)<sup>[5-7]</sup> and, on the other, to mediate hyperthermia (locally increasing the temperature by the application of an AMF), thus inducing the apoptosis of tumor cells, which are more sensitive than normal healthy cells.<sup>[8-10]</sup>

MNPs are generally produced by two different strategies: i) co-precipitation of iron salts in basic aqueous media possibly stabilized by biocompatible surfactants/polymer; ii) thermal decomposition of organometallic precursors in high-boiling nonpolar organic solvents at elevated temperatures ( $\sim 200$ – $360^\circ\text{C}$ ), which allows a great control of the size of the MNPs, their monodispersity and uniformity.<sup>[11]</sup> However, these methods have some drawbacks, associated to the use of high temperature, organic solvents, poor solubility in water and relatively small size (they are generally around 10-20 nm).

One of the most important requirement for the clinical applications of MNPs, besides biocompatibility,<sup>[12]</sup> is that, while being superparamagnetic at the working temperature (i.e. room and body temperature), they should respond as efficiently as possible to the external magnetic field applied for their targeting.<sup>[6,8]</sup> 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.<sup>[6]</sup> Since most of the commercialized superparamagnetic nanoparticles (SPIONs) are small ( $< 30$  nm), increasing SPION size would also increase their magnetic moment, thus enhancing

the efficiency of the magnetic guidance.<sup>[13]</sup> 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.<sup>[6,8]</sup>

Many of the drawbacks affecting synthetic MNPs discussed so far are overcome in biomimetic MNPs (BMNPs).<sup>[6]</sup> These are produced by taking inspiration from nature, where by means of specific enzymes (Magnetosome membrane Associated Proteins, MAPs) magnetotactic bacteria produce intracellular MNPs of about 30 nm, called magnetosomes.<sup>[14]</sup> The extremely low yields of MNPs from magnetotactic bacteria cultures prevent their use in biomedicine. However, 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 simple addition of the recombinant MamC protein from *Magnetococcus marinus* MC-1.<sup>[15,16]</sup> These BMNPs: i) 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); ii) 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;<sup>[15]</sup> iii) contain up to 4.5 wt% of MamC that gives them novel surface properties and provides functional groups that allow functionalization; iv) 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.<sup>[17]</sup> Thus, at physiological *pHs* they bind to positively charged molecules (such as DOXO) 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 v) are fully cytocompatible and hemocompatible, but when they are coupled with DOXO they display dose-dependent cytotoxicity.<sup>[17]</sup>

As for other NPs, the anti-tumor activity of drug-loaded BMNPs can be improved, by adding specificity upon functionalization with probes recognizing cancer biomarkers, thus mediating targeted chemotherapy. In this scenario ligands such as monoclonal antibodies (mAbs) or their fragments and growth factors, which specifically bind to biomarkers overexpressed on tumor cells<sup>[18,19]</sup> are grafted on the BMNPs. Most of these biomarkers are surface receptors for growth factors such as folic acid,

transferrin and tyrosine kinase receptors.<sup>[18–20]</sup> In particular, Met is the tyrosine kinase receptor of Hepatocyte Growth Factor (HGF receptor) that is overexpressed on many types of cancer (see [www.vai.org/met](http://www.vai.org/met)). This molecule is involved both in carcinogenesis<sup>[21,22]</sup> and in metastatic processes.<sup>[23]</sup>

In this paper, the targeted chemotherapy efficiency of novel BMNPs, mediated by MamC from *Magnetococcus marinus* MC-1 is evaluated for the first time. These BMNPs were functionalized both with mAbs targeting the Met/HGF receptor (from now on called Met) and with the chemotherapeutic drug DOXO. Binary (mAb-BMNPs and DOXO-BMNPs) and ternary (DOXO-mAb-BMNPs) nanoassemblies were produced and characterized. The interaction with the gastric carcinoma cell line GTL-16 (Met<sup>+</sup>) and the hepatocarcinoma cell line Huh7 (Met<sup>-</sup>) and the *in vitro* antitumor cell activity of these nanocarriers were investigated. In addition, magnetic hyperthermia tests were performed with ternary nanoassemblies in order to evaluate their suitability as magnetic hyperthermia agents for the field strengths and frequencies physiologically admissible.

## **Results and discussion**

### **Preparation and characterization of BMNPs nanoassemblies**

BMNPs produced in presence of MamC were composed of 100% magnetite and displayed well-developed crystal faces with rhombic, rectangular, and square two-dimensional morphologies (Figure 1A). Particle size distribution averaged  $36 \pm 12$  nm (Figure 1B). These BMNPs were functionalized with DOXO and with the monoclonal antibody (mAb) DO-24, an IgG 2a/k mAb produced against the ectodomain of the human Met. Thus, so-called binary nanoassemblies [i.e. BMNPs coupled with DOXO (DOXO-BMNPs) or with the mAb (mAb-BMNPs)] and ternary nanoassemblies (DOXO-mAb-BMNPs) were obtained. The adsorption of DOXO and DO-24 mAb on the BMNPs at 25 °C reached a plateau after 4-8 h of incubation (Figure 1D). At this time, ~100% of the initial DOXO (0.2 mg DOXO/mg BMNP) and ~32% of the initial mAb (0.08 mg mAb/mg BMNP) in solution were adsorbed on BMNPs, respectively. When DOXO was coupled to the mAb-BMNPs to form the ternary nanoassemblies, ~45% of the initial DOXO in solution was adsorbed at the plateau. These data show that the coupling of these molecules to the BMNPs can be easily achieved, possibly mediated by the MamC protein, which provides functional groups at the crystal surface.

This enables the direct functionalization of the BMNPs, avoiding the further addition of other coating molecules.

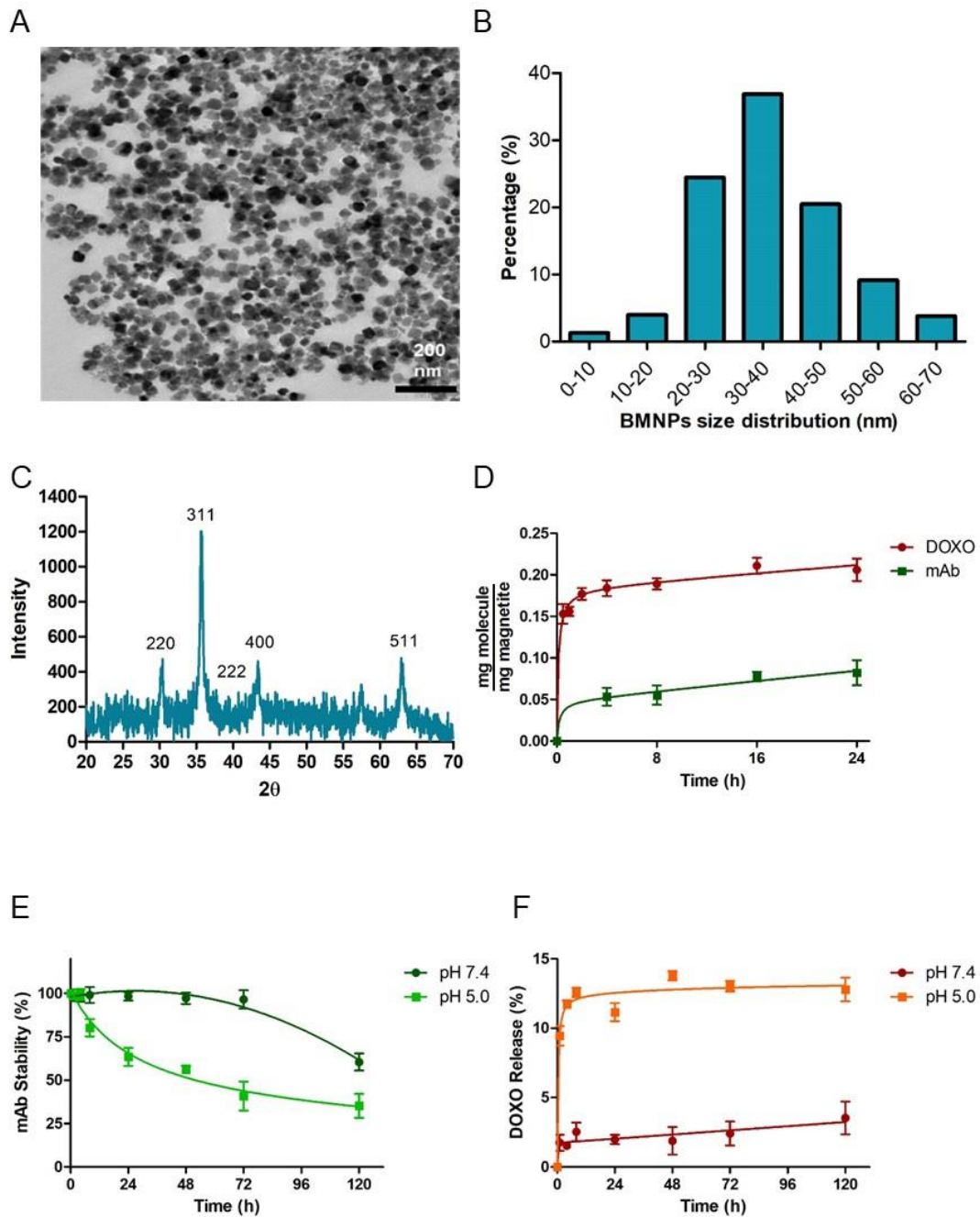
The  $\zeta$  potential values of the different nanoassemblies and BMNPs, indicate that these nanoparticles were all negatively charged at  $pH$  7.4 (Figure 2A). BMNPs display the highest negative surface potential ( $\zeta \sim -33.8$  mV), followed by mAb-BMNPs ( $\zeta \sim -22.8$  mV), DOXO-mAb-BMNPs ( $\zeta \sim -16$  mV), and DOXO-BMNPs ( $\zeta \sim -13$  mV). The output is strikingly different from that at  $pH$  5 (Figure 2B). In this case, only BMNPs remain negatively charged ( $\zeta \sim -17.5$  mV). Both ternary nanoassemblies and DOXO-BMNPs are neutral, while mAb-BMNPs acquire a faintly positive charge ( $\zeta \sim +3.9$  mV). The negative surface charge of the BMNPs at physiological  $pH$  should promote reciprocal repulsion. Their coupling with the molecules, which reduces their negative charge, favors the interaction of the nanoassemblies with cells by decreasing the former repulsion between the nanoparticles and the cell membrane, which is also negatively charged.

The stability of the bound moieties was tested by incubating the nanoassemblies at 37 °C for different times up to 5 days at  $pH$  7.4 (physiological conditions, simulating the blood stream), or at  $pH$  5.0, (mimicking the acidic environment of endosomes/lysosomes) under continuous stirring. At  $pH$  7.4 most of the adsorbed mAb was bound up to the third day and only 40% was released after 5 days incubation (Figure 1E). Less than 3% of the adsorbed DOXO was released from DOXO-BMNPs at  $pH$  7.4 over time (Figure 1F), while  $\sim 14\%$  of the adsorbed molecule was released after 1h at  $pH$  5.0, after which the release was stabilized. At acidic  $pH$  the antibody was stably bound for the first hours, starting to be released (about 20%) after 8 h, with about 35% still bound after 5 days (Figure 1E). No significant differences in the stability or release of the functionalizing moieties from ternary nanoassemblies was observed with respect to the binary ones (Figure S1 A-B).

The stability of the nanoassemblies at physiological  $pH$  and the  $pH$ -dependent DOXO release are based on the surface charge of the BMNPs inferred by MamC, which allows functionalization through electrostatic interactions and DOXO release when these interactions are weakened. In fact, BMNPs are negatively charged at  $pH$  7.4 because of the covering/incorporation of MamC (*iep* 4.47<sup>[15]</sup>) to the magnetite crystals (up to 4.9%<sup>[17]</sup>). Such a covering allows the BMNPs to bind to the positively charged DOXO ( $pK_{a2} = 8.46$ ;<sup>[24]</sup> at  $pH$  7.4), which in aqueous solutions forms dimers exposing –



$\text{NH}_3^+$  groups in opposite directions.<sup>[24,25]</sup> This is consistent with the less negative  $\zeta$ -potential values of the nanoassemblies DOXO-BMNPs and DOXO-mAb-BMNPs (Figure 2A).



**Figure 1.** (A) Transmission electron microscopy images of biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs). (B) Size distribution of BMNPs. (C) X-Ray Diffraction (XRD) of BMNPs. (D) Kinetics of the adsorption of DOXO and DO-24 mAb to the BMNPs in hermetically closed bottles at 25 °C under continuous mixing at 200 rpm. (E) Stability of the DO-24 mAb coupled to mAb-BMNPs at different *pH* values. (F) Release of the DOXO adsorbed on DOXO-BMNPs at different *pH* values.

Coupling of DO-24 mAb (*iep* 6.8 -Prat, personal observation-) to BMNPs at *pH* 7.4 is also possible by electrostatic interactions, although of weaker affinity compared to DOXO. Indeed a lower adsorption of the mAb compared to that of DOXO (Figure 3A) and a lower shift to less negative values on the  $\zeta$ -potential data (Figure 2A) were observed. Similar data were reported also for citrate-coated hydroxyapatite nanoparticles, which are negatively surface charged.<sup>[26]</sup> Differences in the adsorption between DOXO and mAb are not only related to surface charge, but also to the steric hindrance of the mAb (mAb mass is approximately 275 fold that of DOXO), which has also an effect on which of its domains interact with the NP surface. We hypothesize that the mAb preferentially binds to the BMNPs through its Fc domain, exposing the Fab fragments. This hypothesis is in agreement with the theoretical work of Sidorov et al., (2007).<sup>[27]</sup>

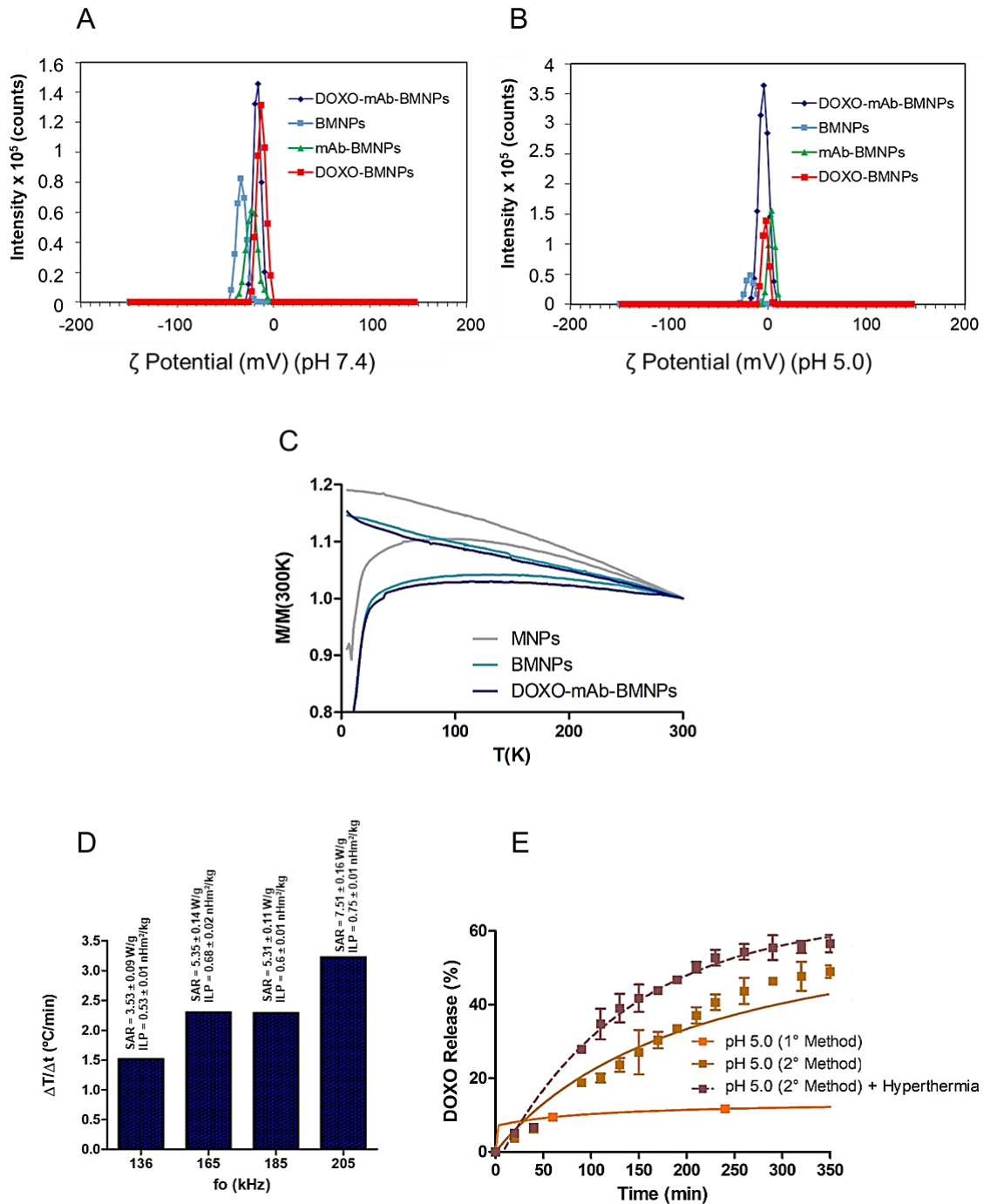
Since at *pH* 5 the surface of the BMNPs is less negative than at *pH* 7.4 (Figure 2A and B) for being closer to their *iep*, the release of the adsorbed DOXO is favoured (Figure 1E) and occurs until the charge of the nanoassembly becomes neutral. At this *pH* the mAb-BMNPs nanoassembly remains slightly positively charged, since mAb is positively charged at *pH* 5 (*iep* DO-24 = 6.8) and it desorbs from the nanoparticle more slowly than DOXO (Figure 1E), which indeed favours the interaction of the nanoassemblies with the negatively charged cell surface.

Another important parameter to consider is whether the coupling alters the magnetic properties of the BMNPs. DOXO-mAb-BMNPs show similar ZFC-FC curves at 500 Oe as BMNPs (Figure 2C). Both nanoparticles present a slower increase of magnetization compared to that of inorganic magnetites produced in the absence of MamC (MNPs). This is consistent with BMNPs having a bigger size, as shown at TEM analysis, high crystallinity and a larger magnetic moment per particle, and is further confirmed by the higher  $T_B$  value of BMNPs (126.68 K), ternary nanoassemblies (132.66 K) compared to that of MNPs (102.74 K). Indeed, larger magnetic moment per particle allows an enhanced response to an external magnetic field and this represents an advantage of the BMNPs compared to other commercial nanoparticles of smaller sizes, as largely reported in the literature.<sup>[6]</sup> Moreover, while the size of the particles falls within the range of single magnetic domain,<sup>[6,13,28]</sup> the blocking temperature of the particles ( $T_B < 300\text{K}$  in all cases) indicates that they are paramagnetic at room and body temperature and, therefore, at these temperatures, they do not display a net

magnetization in the absence of an external magnetic field, which is important to prevent agglomeration.<sup>[6]</sup>

When the ternary DOXO-mAb-BMNPs nanoassemblies are under the influence of an AMF ( $H_0 = 7.0 \text{ kA m}^{-1}$ ,  $B_0 = 8.8 \text{ mT}$ ) they increase the temperature of the suspension, being such increase dependent of the frequency and amplitude of the field (1.52 °C/min to 3.23 °C/min for frequencies ranging 135-205 kHz: Figure 2D). Therefore, in less than 3 min the ternary nanoassemblies could rise the temperature to reach the target value of ~45°C, temperature at which tumor cells have their metabolism altered and ultimately undergo apoptosis.<sup>[29]</sup> The application of this AMF also has an additional important effect, i.e. the triggering of DOXO release (Figure 2E). Indeed, DOXO release % increases over time (Figure 2E) and maximum % increase reached about 15% at 2 h, when compared to that occurring only by the effect of acidic *pHs*. Hyperthermia accelerates the kinetics of DOXO release up to 150 minutes. After that, even if the DOXO release % is always greater if hyperthermia is applied, the % value of release decreases. As discussed above, DOXO release at acidic pH values is triggered because the electrostatic interaction that kept the molecule bound to the BMNPs weakens, since the BMNPs are approaching their iep (4.4). At pH 5.0, BMNPs are still slightly negatively charged and, therefore, able to keep DOXO bound to their surfaces. The rotation of the BMNPs and the temperature increase induced by the AMF probably helps the release of further DOXO molecules. Indeed, it is well acknowledged that if the surface at which the molecule is bound is heated (in this case, as a result of magnetic hyperthermia), the energy transferred to the adsorbed species promotes its desorption. Hyperthermia has been reported to trigger the release also of other drugs.<sup>[30]</sup>

Two different protocols were used to analyse the release of DOXO, one for the experiments reported in Figure 1F and one for the experiments reported in Figure 2E, in which AMF was applied. Indeed in the former case independent samples were prepared individually for each time interval (method 1 in Materials), as described in <sup>[31,32]</sup>, while in latter case the same samples were used for the different points by taking away the supernatants and refilling with the same volume each time (method 2 in Materials), as described in. <sup>[33,34]</sup> As it can be observed in Figure 2E, higher values of DOXO release % were obtained when method 2 was used. Such a difference is due to the pharmacokinetics of DOXO and the rate at which this molecule reaches equilibrium with the bulk medium.

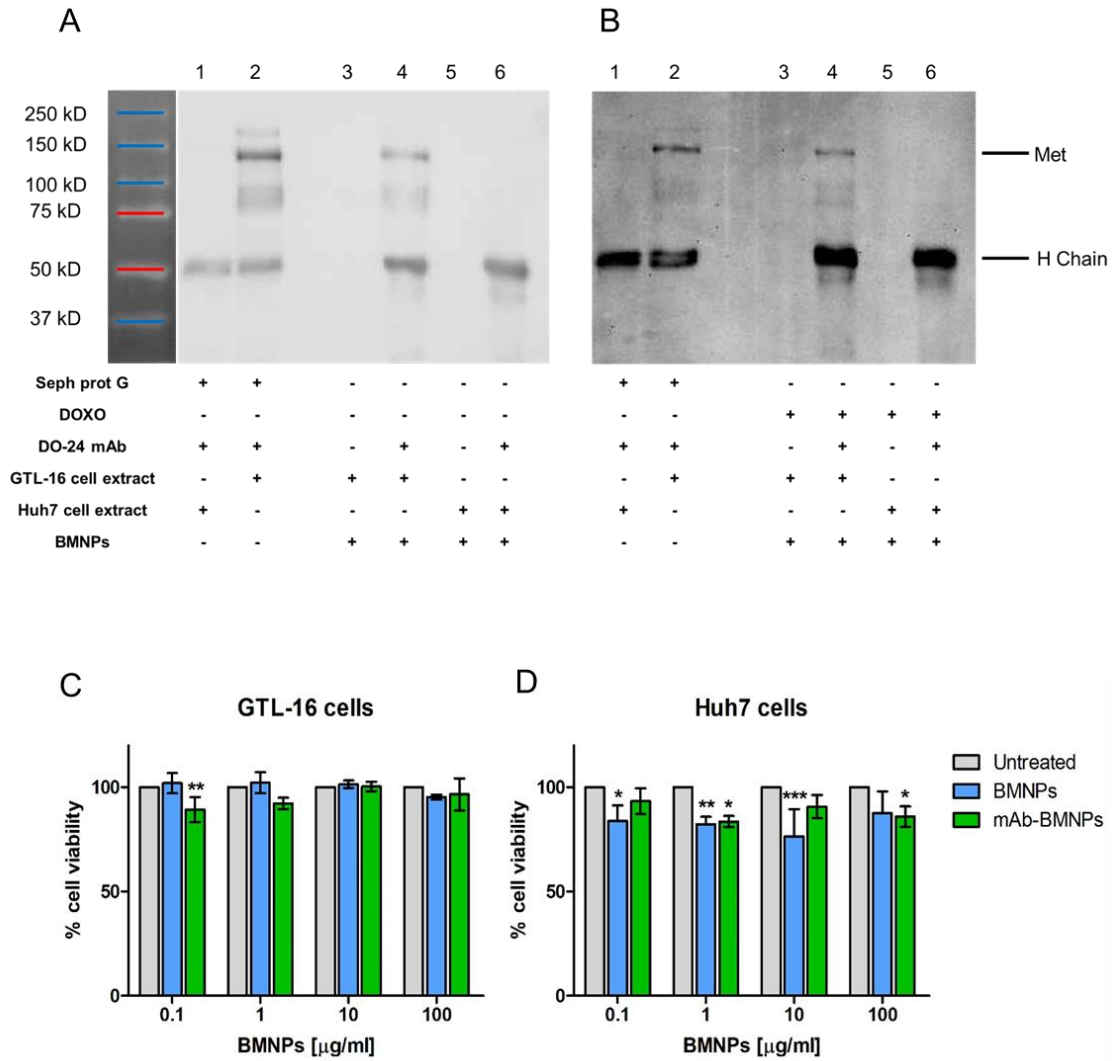


**Figure 2.**  $\zeta$ -potential of the different BMNPs. Not functionalized (BMNPs), binary (mAb-BMNPs and DOXO-BMNPs) and ternary (DOXO-mAb-BMNPs) nanoassemblies surface charges measured at  $pH$  7.4 (A) and at  $pH$  5 (B). (C) ZFC-W and FC-C of inorganic magnetites (MNPs), BMNPs and ternary nanoassemblies (DOXO-mAb-BMNPs). (D) Rate of temperature increase of the ternary nanoassemblies under the influence of an alternating magnetic field as a function of the field frequency. SAR and ILP values are also noted in the Figure. (E) DOXO release % as a function of time measured by applying the method 1 (one individual sample was prepared for each time period) and method 2 (an aliquot was taken from the sample at an

specific time period and then the sample was refilled), both in the absence of an alternating magnetic field (AMF) and in the presence of an AMF.

Immunoprecipitation experiments were performed to control that the mAb linked to the BMNPs maintained its activity by incubating them with detergent extracts prepared from cells expressing Met (GTL-16) or not (Huh7). Only nanoassemblies carrying mAb (mAb-BMNPs and DOXO-mAb-BMNPs) were able to recognize the Met antigen solubilized from GTL-16 cells (Figure 3A and B, lane 4 vs lane 3) as a 145 kDa band, corresponding to the receptor  $\beta$  chain. This band was absent in immunoprecipitates obtained by incubating these nanoassemblies with extracts from the Met- Huh7 cells (Figure 3A and B, lane 6). These data indicate that mAb activity and specificity are maintained after coupling on the BMNPs, and, moreover, that the additional functionalization with DOXO after mAb coupling does not interfere with the immunocompetence of the mAb. Since the mAbs adsorbed on BMNPs recognize the cognate antigen, they should be bound exposing externally their Fab domains, possibly in an end-on orientation, dictated also by the steric hindrance of the Fab domain relative to the Fc domain.<sup>[26]</sup> These findings are in line with similar publications.<sup>[35]</sup>

Finally, the BMNPs and binary mAb-BMNPs were tested for their cytocompatibility on GTL-16 and Huh7 cells, measuring cell viability in a MTT assay. When both types of BMNPs were incubated with these cells at concentrations ranging from 0.1 to 100  $\mu\text{g/mL}$ , they did not exert significant toxicity on both cell types, since in all cases >95% GTL-16 cells, and >80% Huh7 cells survived (Figure 3C and 3D), demonstrating the high cytocompatibility of the BMNPs and of the binary mAb-BMNPs nanoassemblies. The cytocompatibility of these BMNPs was also tested in an Annexin V/propidium iodide assay, which can distinguish between apoptotic and necrotic cells. In this case necrotic cells were never above 18% of the total, while apoptotic cells were always lower than 0.5%, and hydrogen peroxide, which was used as control, induced toxicity (apoptosis + necrosis) in more than 80% of the cells (Figure S2). These data confirm the ones obtained in the MTT assay, i.e. the high cytocompatibility of the BMNPs. We also assayed for the production of reactive oxygen species (ROS), which is indicative of oxidative stress, and also in this case BMNPs had no significant effect, while cells treated with hydrogen peroxide displayed the presence of ROS predominantly in the nuclei (Figure S3).



**Figure 3.** Immunocompetence and specificity of (A) the binary nanoassemblies (mAb-BMNPs) and of (B) the ternary nanoassemblies (DOXO-mAb-BMNPs) analyzed in immunoprecipitation and SDS-PAGE/western blot. The Met biomarker (the band with apparent molecular weight of 145 kDa) is immunoprecipitated only by mAb-loaded BMNPs from GTL-16 (Met<sup>+</sup>) cells, but from Huh7 (Met<sup>-</sup>) cells. Also, a band with apparent molecular weight of 50 kDa, corresponding to the mAb heavy chain is detectable. Cytocompatibility of the mAb-functionalized or not functionalized BMNPs on GTL-16 (C) and Huh7 cells (D) assessed in MTT assay.

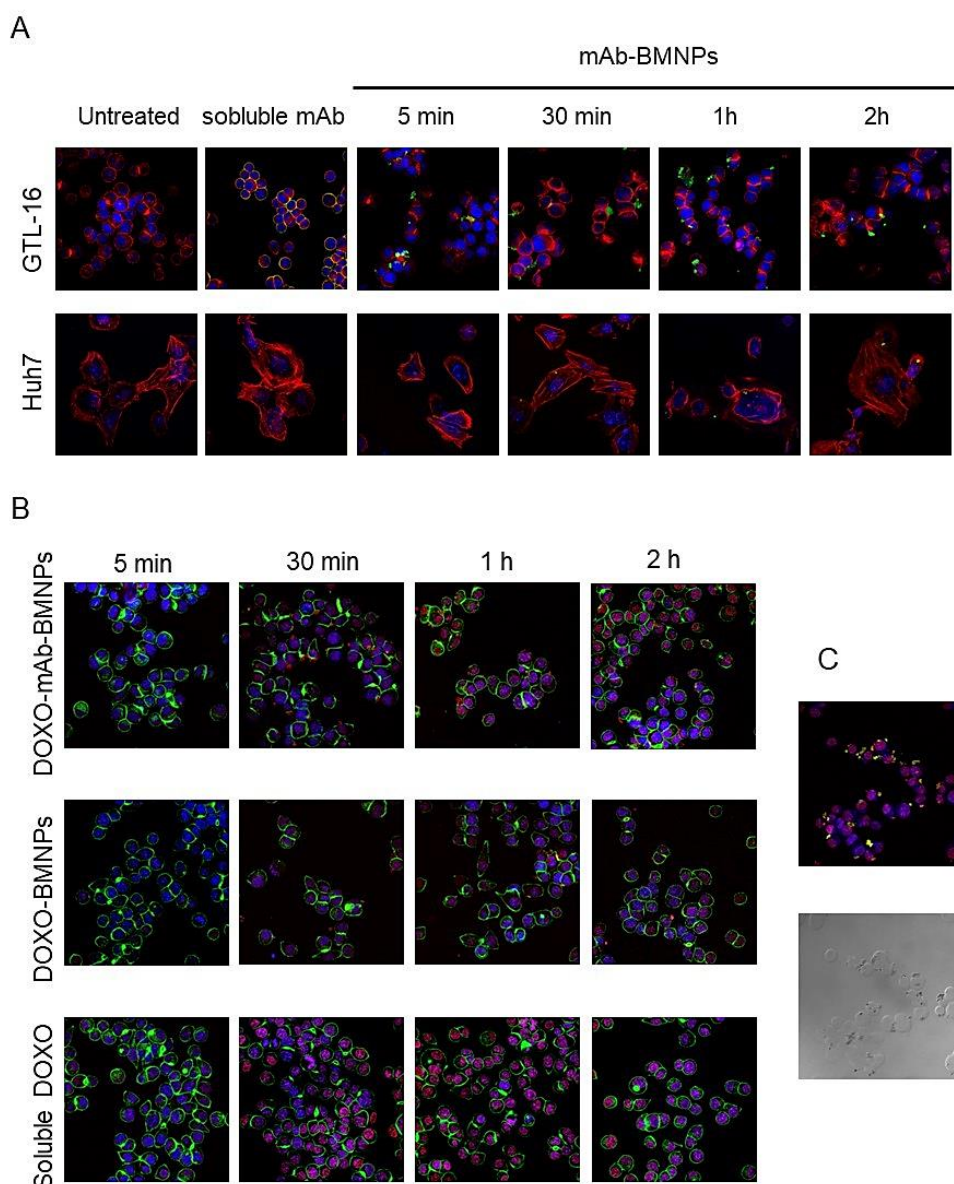


### Cellular interactions of functionalized BMNPs

The specificity of the interaction of mAb-functionalized BMNPs with cells was first evaluated by confocal microscopy, by incubating them with cells either expressing the Met marker or not for increasing times up to 2 h and staining with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-labelled anti-mouse Ig. These BMNPs were detectable at 5 minutes only at the surface of Met<sup>+</sup> GTL-16 cells, (Figure 4A, top row), but not in Met<sup>-</sup> Huh7 cells (Figure 4A, bottom row). mAb-BMNPs nanoassemblies remained at the cell surface, while soluble DO-24 was internalized within GTL-16 cells (colocalized with the cytoskeletal actin, as evidenced by the yellow color in the merged image). In the control experiments, nanoassemblies functionalized with an IgG2a/k antibody (directed against an unrelated antigen) did not bind to cells (not shown). The above results were confirmed when mAb-BMNPs were traced with Prussian blue staining (Figure S2). All together, these data show that, under these conditions, the specificity of the mAb-mediated interaction is preserved up to 1 h and suggest that only after 2 h incubation some aspecific interaction of BMNPs occurs. These findings are in line with previously reported results<sup>[36]</sup> and show that these nanoassemblies can mediate active targeting. The decrease of specificity with time agrees with previously reported results, showing that NPs of different composition can interact and possibly be internalized within cells, even in the absence of a receptor specifically recognized by a cognate ligand present on the NPs.<sup>[24,37,38]</sup> The fact that these experiments were carried out under static conditions could partially explain the loss of selectivity of mAb-BMNPs. A higher level of specificity at longer times should be expected *in vivo*, where cells expressing higher levels of receptor, such as tumor cells, should recruit them at their surface more efficiently. Such a dynamic scenario, similarly to the one found in the bloodstream, should contribute to a higher level of specificity. All together, these data strongly suggest that cells expressing the Met receptor can be specifically targeted by BMNPs functionalized with the DO-24 mAb.

Then, the carrying/releasing activity of DOXO-mAb-BMNPs was evaluated in confocal analysis experiments on GTL-16 cells. After 30 min incubation, the red signal (DOXO) was localized within the cells, mainly at the level of nuclei, and the signal increased after 1 and 2 h incubation. In the case of binary nanoassemblies devoid of the mAb significantly lower levels of DOXO could be visualized at either time (Figure 4B, top vs medium row). In these experiments BMNPs were visualized in differential interference contrast (DIC) microscopy (Figure 4C), since the green signal marks the

cytoskeletal actin (Figure 4B). The cellular uptake of DOXO loaded on DOXO-mAb-BMNPs nanoassemblies by cells was not as efficient as that of soluble DOXO (Figure 4B, bottom vs top row), possibly because in the former case DOXO had first to be released from BMNPs, which are not internalized within cells. These experiments show that BMNPs can act as effective nanocarriers in targeting tumor cells, locally delivering the chemotherapeutic molecule even though they are not internalized by cells.

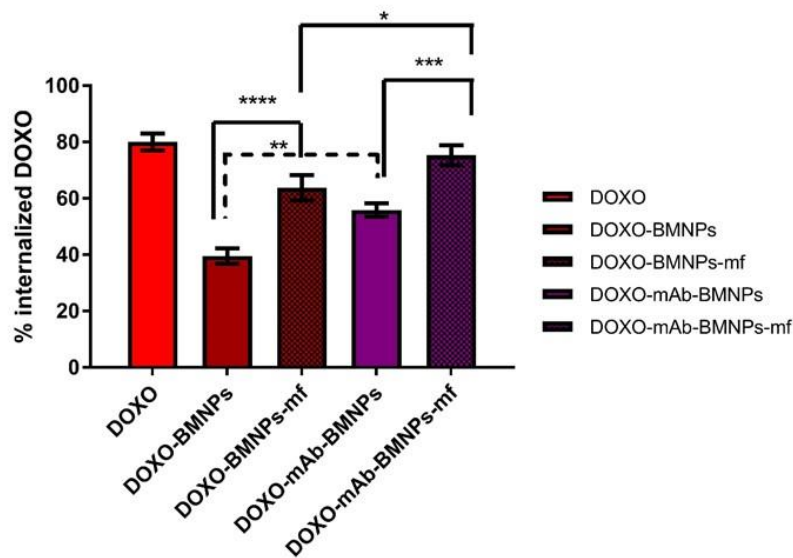


**Figure 4.** Interaction of mAb functionalized BMNPs with cells and their targeted carrier activity analyzed by confocal microscopy. (A) mAb functionalized BMNPs were incubated for different times with Met<sup>+</sup> GTL-16 cells and Met<sup>-</sup> Huh7 cells, as well as with soluble mAb as control. The green signal due to the mAb loaded on BMNPs –revealed by secondary FITC-labeled antibodies- is detected only in treated GTL-16 cells; the red signal corresponds to cytoskeletal



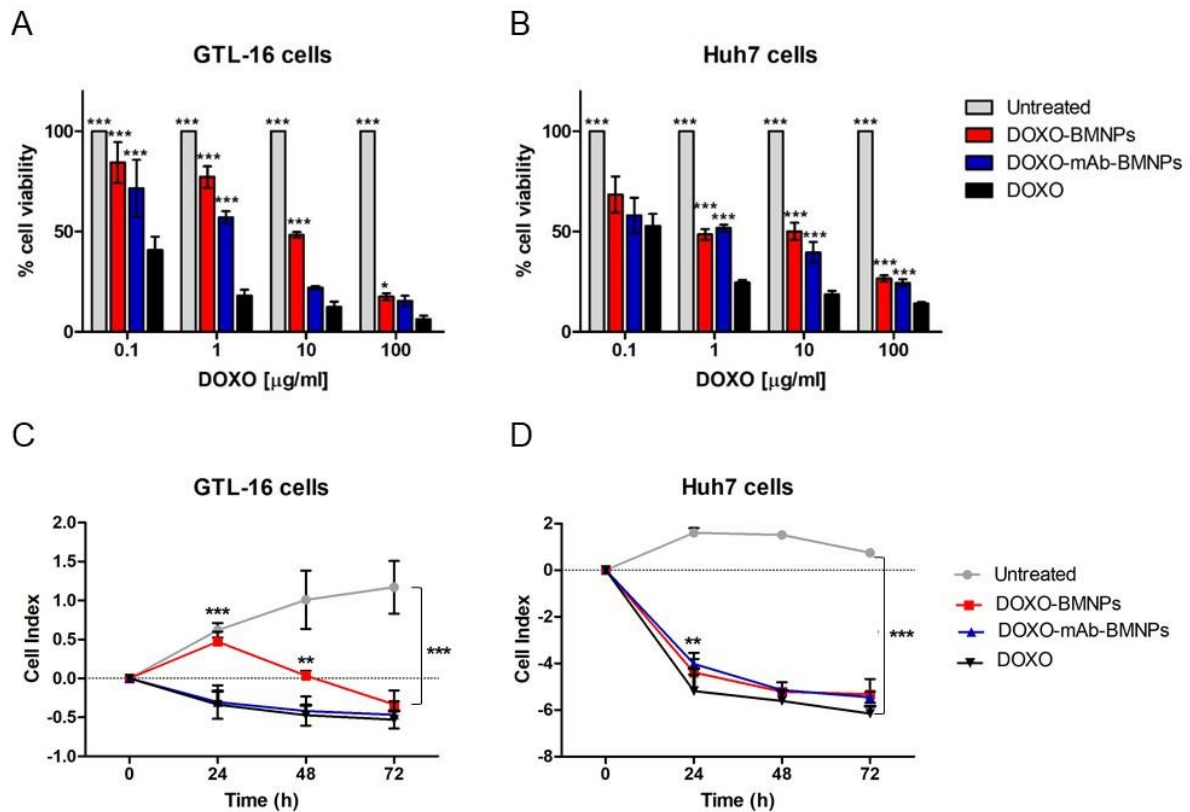
actin (TRITC-phalloidin). **(B)** Internalization of DOXO loaded on BMNPs functionalized or not with the DO-24 mAb in GTL-16 cells, and of soluble DOXO, as reference, after different times of incubation analyzed by confocal microscopy. DOXO is stained red; cytoskeletal actin is stained green (FITC-phalloidin) and nuclei are stained in blue (TO-PRO). The presence of mAb enhances DOXO internalization. **(C)** Internalization of DOXO loaded on DOXO-mAb-BMNPs after 1 h incubation. DOXO is stained red, while DO-24 mAb on BMNPs is revealed by FITC-labeled secondary antibodies. Differential interference contrast (DIC) visualizes BMNPs. Magnification 630x.

Flow cytometry analysis were carried out to quantify the amount of DOXO internalized in GLT-16 cells, after 15 min incubation with DOXO-functionalized BMNPs. Some experiments were further exposed to a magnetic field (15 min) to determine the effect on DOXO internalization of the combination of ligand and magnetic targeting. In line with the previous experiments, the internalization of DOXO loaded on BMNPs was lower than that of soluble DOXO. The functionalization with the mAb increased the amount of internalized DOXO and the apposition of a magnet increased this amount even further (Figure 5). These results show that magnetic targeting is more efficient than ligand-mediated targeting.



**Figure 5.** Internalization of DOXO loaded on binary or ternary nanoassemblies in GTL-16 cells in presence or absence of a magnetic field, quantified in cytofluorimetry. Cells were incubated for 15 min at 37 °C with BMNPs, then layered on a magnetic plate (i.e. mf = magnetic field) or not for further 15 min. DOXO internalization was increased by the presence of mAb on BMNPs and further significantly enhanced by the magnetic plate treatment. Statistical differences between the treatments were considered significant when p values were  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

The toxic activity of binary and ternary DOXO-loaded BMNPs was then assessed in a MTT assay after 3 days incubation on GTL-16 and Huh7 cells. Dose-dependent cytotoxicity was observed in all cases, and, again, soluble DOXO exerted a higher toxicity than DOXO loaded on BMNPs (Figure 6A) also in agreement with other studies.<sup>[26,34]</sup> When comparing the two DOXO loaded BMNPs, the presence of the mAb increased their toxicity on GTL-16 cells, but had no significant effect on Huh7 cells (Figure 6B). In particular, the more significant difference was observed at the dose of 10 µg/mL of DOXO, at which DOXO-mAb-BMNPs were significantly more toxic compared to DOXO-BMNPs (22% vs 48.34% GTL-16 cells viability), their toxicity approaching more the one exerted by soluble DOXO. The difference between BMNPs loaded or not with mAb was not that high in Huh7 cells (50% vs 40% cell viability for DOXO-BMNPs and DOXO-mAb-BMNPs, respectively).



**Figure 6.** Cytotoxicity of the differentially functionalized nanoassemblies on GTL-16 (Met<sup>+</sup>) (A) and Huh7 (Met<sup>-</sup>) cells (B) measured in MTT assay. Real time cytotoxicity analysis by xCelligence instrument of the different functionalized nanoparticles on GTL-16 (C) and Huh7 cells (D).

Real-time experiments, which allow measuring cytotoxic response kinetics show that, on GTL-16 cells, DOXO-mAb-BMNPs were significantly more toxic than DOXO-BMNPs, being as efficient as soluble DOXO up to 48 h (Figure 6C). At the third day (corresponding to the incubation time of the MTT experiments), the three treatments with DOXO were equivalent, which is in accordance with what observed in MTT experiments. On Huh7 cells, no significant differences were observed between the toxicity exerted by DOXO-BMNPs and DOXO-mAb-BMNPs (Figure 6D), confirming the ligand-dependent selective activity of nanoparticles. These data show that this drug delivery system mediated by the proposed targeting method could be as effective as that produced by soluble DOXO, but with the advantage that it is restricted to cells recognized and targeted by mAb and it is not widespread to cells not expressing the tumor associated marker under study.

The *in vitro* model is a simplified system, in which only two partners (tumor cells and nanoparticles, possibly modified to improve their specific anti-tumor activity) are present and thus it is an easier scenario relative to the real *in vivo* situation. In the latter case nanoparticles encounter a highly complex environment with many players, generally interfering with the interaction of the two involved partners. Indeed, upon systemic administration, nanoparticles must overcome multiple physical, chemical, and physiological barriers before they can reach the tumor.<sup>[39]</sup> At the systemic level, circulating nanoparticles can be uptaken by cells of the reticulo-endothelial system (RES), responsible of the innate immune responses.<sup>[40]</sup> Nanoparticles can also adsorb proteins and other plasma molecules and form a so-called bio-corona on their surface, which could prevent their interaction with the target cells or facilitate their opsonisation.<sup>[41]</sup> The fact that all the experiments with cells reported here were performed in the presence of saturating amounts of fetal calf serum suggest that some drawbacks could be overcome. Also the tumor microenvironment can constitute a barrier to nanoparticle penetration, because of the abnormal vasculature, the high interstitial pressure, the dense extracellular matrix, the pressure derived from tightly packed tumor cells, and such a situation cannot be forecast in advance, since it can be different in different tumor types.<sup>[39]</sup>

In this complex world, the data presented herein anyway show that *in vitro* the chemotherapeutic delivery to tumor cells is facilitated by BMNPs functionalized with a targeting ligand, and this will be the basis for future *in vivo* studies.

## Experimental section

### Synthesis of the MamC mediated BMNPs

The BMNPs used in this study were also used in a previous one.<sup>[17]</sup> Briefly, MamC cloning, expression and purification was carried out as described by Valverde-Tercedor et al., (2015).<sup>[15]</sup> After its production in *Escherichia coli* TOP10 cells, the protein was purified under denaturing conditions (6 M urea) by using a HiTrap chelating HP column (GE Healthcare) in an ÄKTA Prime Plus FPLC System (GE Healthcare) and then dialyzed to completely remove urea to allow a gradual folding of MamC.

Biomimetic magnetite nanoparticles (BMNPs) were obtained by precipitation from the following deoxygenated master solution: MamC (10 µg/mL), Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (2.78 mM), 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), pH 9, for 30 days, 25°C, 1 atm total pressure inside an anaerobic COY chamber to avoid potential oxidation.<sup>[15]</sup> Precipitates were concentrated with a magnet, washed with Milli-Q oxygen-free water three times, suspended in HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) buffered saline solution (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl) and sterilized. Powder X-ray diffraction (XRD) analysis was carried out with an Xpert Pro X-ray diffractometer (PANalytical) using the Cu K $\alpha$  radiation, 20 to 60° in 2 $\theta$  (0.01°/step; 3s per step). Precipitates were identified by X Powder software.<sup>[42]</sup> Transmission electron microscopy (TEM) analyses of the BMNPs were performed with a STEM Philips Model CM20 microscope, after embedding in Embed 812 resin and ultrathin sections (50–70 nm) preparation with Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Crystal size was measured on ~1000 nanoparticles per experiment using ImageJ 1.47. As the BMNPs used in the present study belonged to the same batch that those characterized in García Rubia et al. (2018),<sup>[17]</sup> basic mineral characterization is included in the present manuscript while further characterization ( $\square$ -potential, thermogravimetric analyses, specific surface area by BET (Brunauer, Emmett and Teller) and hysteresis cycle at 5K and 300K) can be found in<sup>[17]</sup>, and HRTEM (High-resolution transmission electron microscopy) analyses in,<sup>[43]</sup> and are not included here. According to these results, the BMNPs used in the present study are superparamagnetic magnetic nanoparticles at 300K, composed of  $\square$ 95 wt% of magnetite and  $\square$ 5 wt% of MamC, with an isoelectric point of 4.4 and specific surface area of 90 m<sup>2</sup>/g.

### **Functionalization of the BMNPs**

BMNPs were functionalized with DOXO (DOXO-BMNPs) and with the purified DO-24 mAb (mAb-BMNPs) to form “binary nanoassemblies”. Five mg of BMNPs were mixed with either 1 mg/mL of DOXO or mAb suspended in HEPES buffer, *pH* 7.4 for time intervals up to 24 hours, inside hermetically closed bottles to avoid magnetite oxidation at 25 °C, at 200 rpm. Ternary nanoassemblies (DOXO-mAb-BMNPs) were produced with the same protocol producing first mAb-BMNPs and then adding DOXO.<sup>[26]</sup>

At the end of the incubations, particles were collected with a magnet, and washed three times with HEPES buffer. Supernatants and the washings were mixed and the amounts of DOXO and mAb measured by UV-Vis spectroscopy ( $\lambda = 490$  and 280 nm, respectively) were detracted by the amount initially incubated and similarly measured, to know the amounts of bound ligands.

### **Stability/release and mAb immunocompetence of the functionalized nanoassemblies**

The stability of the nanoassemblies was determined by analyzing the release of DOXO or mAb at *pH* 7.4 (HEPES buffer) and at *pH* 5 (0.1 M sodium citrate-citric acid solution) after incubation at 37 °C, 200 rpm, for different times (0, 1, 3, 5 and 7 days). One individual sample was prepared for each time interval, and at least three replica of the same sample were prepared (here referred as method 1). This protocol was taken from.<sup>[31,32]</sup> At the specified time, the nanoassemblies were separated from the supernatants by using a magnet. DOXO concentration in the supernatant was determined as stated above. The stability of the adsorbed mAb was determined directly on BMNPs by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)/Western blot as detailed in<sup>[26]</sup> and analyzed by using a Versadoc instrument (Biorad, USA).

The immunocompetence of the mAbs coupled on nanoassemblies was assessed by incubating them overnight (4 °C) with clarified detergent extracts prepared from GTL-16 (Met<sup>+</sup>) cells, and Huh7 (Met<sup>-</sup>) cells, followed by SDS-PAGE and western blot analysis of the molecules bound on the nanoassemblies with the anti-Met DL-21 mAb, as already described.<sup>[26]</sup> BMNPs and DOXO-BMNPs were also tested as negative controls.

### **$\zeta$ -potential**

Stock suspensions of each sample were prepared in 15 mL of oxygen-free NaClO<sub>4</sub> (10 mM). Aliquots of 200 $\mu$ L from each stock were inoculated in eight flasks containing oxygen-free NaClO<sub>4</sub> to a final volume of 10 mL/flask. The *pH* was adjusted to *pH* values of 5 and 7.4. Samples were sonicated for 2 minutes and the electrophoretic mobility was immediately measured (nine replicas per sample).  $\zeta$ -potential values were then calculated by using Malvern Zetasizer software (Malvern Instruments, UK).

### **Magnetic measurements and hyperthermia**

Zero-field cooling (ZFC-W) and field cooling (FC-C) measurements were carried out with a superconducting quantum interference device (SQUID) 5 T magnetometer (Quantum Design MPMS XL, USA). Samples loaded under argon flow were immediately cooled in a zero applied field to 5 K, 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 nanoassemblies, the M(T) curves were normalized by the mass (g) analysed and by their magnetization value at 300 K. Blocking temperature ( $T_B$ ) was calculated as the maximum magnetization values of the ZFC curves.<sup>[6]</sup>

The hyperthermia tests were carried out on 0.5 mL of the ternary nanoassembly suspensions (30 mg/mL) using an AC current generator (frequency range 136 kHz- 205 kHz, maximum field strength  $H_0 = 13 \text{ Ka m}^{-1}$ ). The current was passed through a double 5 turn copper tube coil (diameter: 20 mm, length: 50 mm) cooled at 20 °C. The temperature of the samples was measured every 3 seconds by an Optocom Fotemp-4H thermometer (Germany) with a TS3 optical fiber sensor. From the initial slope of the temperature variation with time ( $dT dt^{-1}$ ), the specific absorption rate SAR ( $\text{W g}^{-1}$ )<sup>[44,45]</sup> and the intrinsic loss power (ILP,  $\text{nHm}^2 \text{kg}^{-1}$ )<sup>[46]</sup> were calculated.

The effect of hyperthermia on the DOXO release from the DOXO-loaded nanoassemblies was analyzed by applying the AC magnetic field to suspensions of the nanoassemblies prepared at *pH* 5 (identical samples kept in a thermostatic bath at 37 °C were used as control), and measuring DOXO release at different time intervals up to 58 hours. All experiments were run in triplicate. At specific time point, the nanoassemblies were separated from the supernatants by using a magnet and the tube was refilled with fresh buffer to continue the following time points (method 2). This protocol was taken

from.<sup>[33,34]</sup> The magnetic field strength was controlled manually to ensure a constant temperature of  $43.0 \pm 0.5$  °C.

### **Cell cultures**

The GTL-16 cell line, which was derived from a poorly differentiated human gastric carcinoma which express Met,<sup>[47]</sup> and the Huh7 cell line (kindly provided by Dr H. Nakabayashi, Hokkaido University School of Medicine, Japan),<sup>[48]</sup> which was derived from a well differentiated hepatocellular carcinoma and which is negative for Met, were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS), 50 U/mL penicillin, and 50 µg streptomycin. Cells were splitted when at 80-90 % confluency.

### **Cytocompatibility and cytotoxicity of the BMNPs**

Cells (approximately  $12 \times 10^3$  GTL-16/well or  $6 \times 10^3$  Huh7/well) were incubated in 96-well plates for 24 h; then different amounts of the BMNPs and nanoassemblies were added, as well as equimolar amounts of soluble DOXO. Cells were then incubated for 3 days, after which their viability was evaluated by the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) colorimetric assay, as already described.<sup>[36]</sup> Briefly, MTT solution (5 mg/mL in Phosphate Buffered Saline (PBS) solution) was added to the plate, incubated at 37 °C for 2 h and supernatants were aspirated. HCl (0.2 N) in isopropanol was added to dissolve the formazan crystals and the optical density was measured in a multiwell reader (2030 Multilabel Reader Victor™ X4, PerkinElmer, USA) at 570 nm. 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 3-5 times, three replicas per each sample.

### **Cellular interactions of the BMNPs**

Cells ( $\sim 24 \times 10^3$  GTL-16/well or  $12 \times 10^3$  Huh7/well) were seeded on glass coverslips and, after 24h, soluble DO-24 mAb (positive control), soluble DOXO and suspensions of the different BMNPs (presaturated in 0.4% BSA at 37°C for 2 h) were added. After incubation at 37 °C for different times (from 5 min to 1 h), coverslips were washed with PBS, fixed with paraformaldehyde (PFA, 2% wt in PBS), washed and permeabilized with Tris-Buffered Saline (TBS), 5% Bovine Serum Albumin (BSA), 0.1% Triton-X100 and 5% got serum, and stained as described.<sup>[36]</sup> Cytoskeletal actin



was stained with TRITC-phalloidin (1/200, Sigma-Aldrich, excitation at 543 nm; emission at 560-620 nm), or FITC-phalloidin (Sigma-Aldrich, excitation at 488 nm; emission at 500-535 nm), mAbs with FITC-labelled rabbit-anti-mouse IgG (1/100, Abcam excitation at 488 nm; emission at 500-535 nm) and nuclei with TO-PRO-3 (1/70, Life Technologies; excitation at 633 nm; emission at 650-750 nm). DOXO was detected after excitation at 476 nm and emission at 575-630 nm. Fluorescence was detected with a Leica TCS SP2 AOBS Spectral Confocal Scanner microscope (63x). ImageJ software was used for analysis.

For flow cytometry experiments, GTL-16 cells ( $\sim 10^5$  cells/well) were incubated in 6-well plates for 24 h. Then 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of soluble DOXO, and binary (DOXO-MNPs) or ternary (DOXO-mAb-MNPs) nanoassemblies suspensions equalized for the same amount of DOXO, were added and incubated for 15 min at 37 °C. Half of the replicates were layered on a magnetic plate (OZ Biosciences) for further 15 min at 37 °C. After removal from the plate, cells were extensively washed with PBS, recovered by trypsinization, centrifuged, fixed in 1% PFA in PBS and 2% FBS, and analyzed in a 2018 Attune NxT Flow Cytometer (ThermoFisher).

### **Real time cytotoxicity (xCelligence)**

Cells ( $\sim 12 \times 10^3$  GTL-16/well or  $6 \times 10^3$  Huh7/well) were seeded on multi-well plates for 24 h and the impedance was monitored (time 0). A concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of free DOXO, DOXO-BMNPs, and ternary nanoassemblies were then added to the cells and the impedance was measured over time up to 72 hours. Untreated cells were used as control experiment.

### **Statistical analysis**

One-way ANOVA statistical analyses were performed with Bonferroni's post-test for grouped analyses using GraphPad Prism version 4.03 (San Diego, CA). Statistical differences between the treatments were considered significant when p values were  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).



## **Conclusions**

DOXO-mAb-BMNPs could potentially be used for targeted chemotherapy since they are superparamagnetic nanocarriers that exhibit a large magnetic moment per particle, mediate hyperthermia and behave as a “smart” delivery system of the loaded drug. Indeed, they are stable at physiological *pH* values, while they release DOXO at acidic *pH* (tumor microenvironment), being such a release *pH*-dependent and increased by hyperthermia. Moreover, these mAb-functionalized nanoassemblies selectively recognize Met receptor (overexpressed in many tumors) and bind to tumor cells, releasing DOXO which then accumulates in the cell nuclei, exerting its cytotoxic activity. These data represent a proof of concept for future *in vivo* experiments in which the controlled dual targeting (mAb-mediated and magnetic) approach and combined (chemotherapy and hyperthermia) therapy will be studied.

## **Acknowledgments**

CJL wants to thank projects CGL2013-46612 and CGL2016-76723 (MINECO, Spain and FEDER) for financial support and Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 (University of Granada, Spain). AVD thanks project PE2012-FQM0694 (Junta de Andalucía, Spain). Thanks go to the CIC personnel of the University of Granada for technical assistance in the TEM. MP thanks a financial support from the Università del Piemonte Orientale A. Avogadro, Italy.

## **References**

- [1] N. R. Datta, S. Krishnan, D. E. Speiser, E. Neufeld, N. Kuster, S. Bodis, H. Hofmann, *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *50*, 217.
- [2] S. Sau, H. O. Alsaab, K. Bhise, R. Alzhrani, G. Nabil, A. K. Iyer, *J. Control Release* **2018**, *274*, 24.
- [3] S. D. Jo, S. H. Ku, Y. Y. Won, S. H. Kim, I. C. Kwon, *Theranostics* **2016**, *6*, 1362.
- [4] M. R. Lisy, A. Hartung, C. Lang, D. Schüler, W. Richter, J. R. Reichenbach, W. A. Kaiser, I. Hilger, *Invest. Radiol.* **2007**, *42*, 235.
- [5] V. I. Shubayev, T. R. Pisanic, S. Jin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 467.
- [6] T. Prozorov, D. A. Bazylinski, S. K. Mallapragada, R. Prozorov, *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* **2013**, *74*, 133.
- [7] V. V. Mody, A. Cox, S. Shah, A. Singh, W. Bevins, H. Parihar, *Appl. Nanosci.* **2014**, *4*, 385.

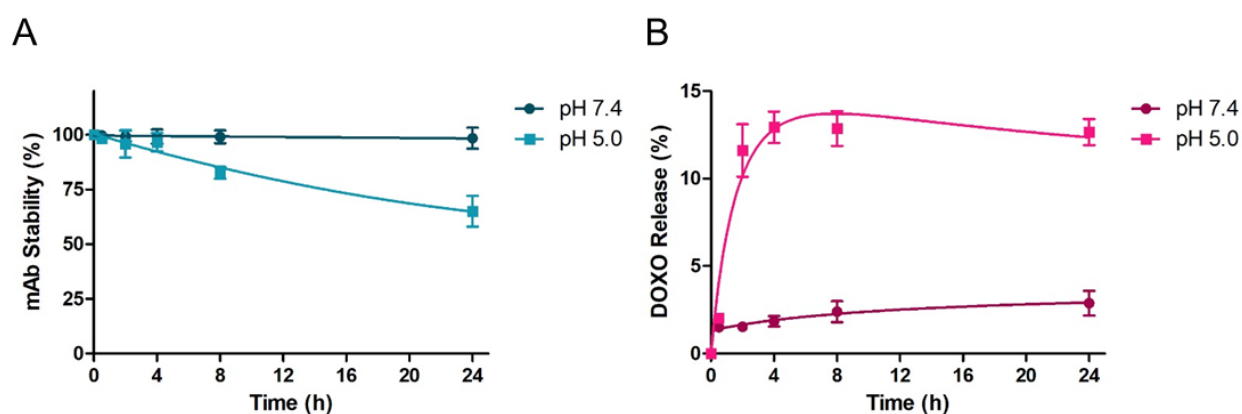
- [8] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R167.
- [9] E. Alphanđéry, S. Faure, O. Seksek, F. Guyot, I. Chebbi, *ACS Nano* **2011**, *5*, 6279.
- [10] P. I. Soares, I. M. Ferreira, R. A. Igreja, C. M. Novo, J. P. Borges, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2012**, *7*, 64.
- [11] K. El-Boubbou, *Nanomedicine (Lond)* **2018**, *13*, 929.
- [12] J. Dobson, *Nanomedicine (Lond)* **2006**, *1*, 31.
- [13] Q. Li, C. W. Kartikowati, S. Horie, T. Ogi, T. Iwaki, K. Okuyama, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9894.
- [14] D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 217.
- [15] 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, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5109.
- [16] H. Nudelman, C. Valverde-Tercedor, S. Kolusheva, T. Perez Gonzalez, M. Widdrat, N. Grimberg, H. Levi, O. Nelkenbaum, G. Davidov, D. Faivre, C. Jimenez-Lopez, R. Zarivach, *J. Struct. Biol.* **2016**, *194*, 244.
- [17] G. García Rubia, A. Peigneux, Y. Jabalera, J. Puerma, F. Oltolina, K. Elert, D. Colangelo, J. Gómez Morales, M. Prat, C. Jimenez-Lopez, *Langmuir* **2018**, *34*, 13713.
- [18] T. M. Allen, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 750.
- [19] S. Pietronave, M. Iafisco, D. Locarno, L. Rimondini, M. Prat, *J. Appl. Biomater. Biomech.* **2009**, *7*, 77.
- [20] K. E. Kaczor-Urbanowicz, C. Martin Carreras-Presas, K. Aro, M. Tu, F. Garcia-Godoy, D. T. Wong, *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2017**, *242*, 459.
- [21] E. Gherardi, W. Birchmeier, C. Birchmeier, G. Vande Woude, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 89.
- [22] L. Trusolino, A. Bertotti, P. M. Comoglio, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 834.
- [23] G. Cortesina, T. Martone, E. Galeazzi, M. Olivero, A. De Stefani, M. Bussi, G. Valente, P. M. Comoglio, M. F. Di Renzo, *Int. J. Cancer* **2000**, *89*, 286.
- [24] I. Rodríguez-Ruiz, J. M. Delgado-López, M. A. Durán-Olivencia, M. Iafisco, A. Tampieri, D. Colangelo, M. Prat, J. Gómez-Morales, *Langmuir* **2013**, *29*, 8213.
- [25] P. Agrawal, S. K. Barthwal, R. Barthwal, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1437.
- [26] M. Iafisco, J. M. Delgado-Lopez, E. M. Varoni, A. Tampieri, L. Rimondini, J. Gomez-Morales, M. Prat, *Small* **2013**, *9*, 3834.
- [27] I. A. Sidorov, P. Prabakaran, D. S. Dimitrov, *J. Comput. Theor. Nanosci.* **2007**, *4*, 1103.

- [28] V. Reichel, A. Kovács, M. Kumari, É. Bereczk-Tompa, E. Schneck, P. Diehle, M. Pósfai, A. M. Hirt, M. Duchamp, R. E. Dunin-Borkowski, D. Faivre, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45484.
- [29] K. Ahmed, Y. Tabuchi, T. Kondo, *Apoptosis* **2015**, *20*, 1411.
- [30] G. R. Iglesias, F. Reyes-Ortega, B. L. Checa Fernandez, Á. V. Delgado, *Polymers* **2018**, *10*, 269.
- [31] W. Zhang, X. Zheng, S. Shen, X. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2015**, *466*, 278.
- [32] C. L. Yang, J. P. Chen, K. C. Wei, J. Y. Chen, C. W. Huang, Z. X. Liao, *Nanomaterials (Basel)* **2017**, *7*, E85.
- [33] E. Cazares-Cortes, A. Espinosa, J.-M. Guigner, A. Michel, N. Griffete, C. Wilhelm, C. Ménager, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9*, 25775.
- [34] M. Hematyar, M. Soleimani, A. Es-Haghi, A. Rezaei Mokarram, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, S1226.
- [35] M. Shi, K. Ho, A. Keating, M. S. Shoichet, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 1689.
- [36] F. Oltolina, L. Gregoletto, D. Colangelo, J. Gómez-Morales, J. M. Delgado-López, M. Prat, *Langmuir* **2015**, *31*, 1766.
- [37] N. S. Remya, S. Syama, V. Gayathri, H. K. Varma, P. V. Mohanan, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *117*, 389.
- [38] X. Zhao, S. Ng, B. C. Heng, J. Guo, L. Ma, T. T. Tan, K. W. Ng, S. C. Loo, *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 1037.
- [39] A. Nicolas-Boluda, A. K. A. Silva, S. Fournel, F. Gazeau, *Biomaterials* **2018**, *150*, 87.
- [40] M. Overchuk, G. Zheng, *Biomaterials* **2018**, *156*, 217.
- [41] D. Boraschi, P. Italiani, R. Palomba, P. Decuzzi, A. Duschl, B. Fadeel, S. M. Moghimi, *Semin. Immunol.* **2017**, *34*, 33.
- [42] J. D. Martin-Ramos, D.L.GR-1001/04, Spain **2004**, pp. 105.
- [43] 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, *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 1620.
- [44] I. M. Obaidat, B. Issa, Y. Haik, *Nanomaterials (Basel)* **2015**, *5*, 63.
- [45] R. R. Wildeboer, P. Southern, Q. A. Pankhurst, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2014**, *47*, 495003.
- [46] D. Ortega, Q. A. Pankhurst, *Nanoscience* **2012**, *60*.

## Supporting information

## Stability/release of the ligands on DOXO-mAb-BMNPs nanoassemblies

The stability of the complexes was determined by analyzing the release of mAb or DOXO at *pH* 7.4 (10 mM HEPES buffer, 150 mM NaCl) and at *pH* 5 (0.1 M sodium citrate-citric acid buffer) after incubation at 37 °C, 200 rpm, for different times up to 24 h. At the specified time, nanoparticles were separated from the supernatants by a magnet. The stability of the adsorbed mAb was determined directly on the nanoparticles by SDS-PAGE/Western blot as detailed in Iafisco et al., (2013)<sup>[1]</sup> and analyzed by using a Versadoc instrument (Biorad, USA). DOXO concentration in the supernatant was determined by measuring the absorbance at  $\lambda = 490$  by UV-Vis spectroscopy.

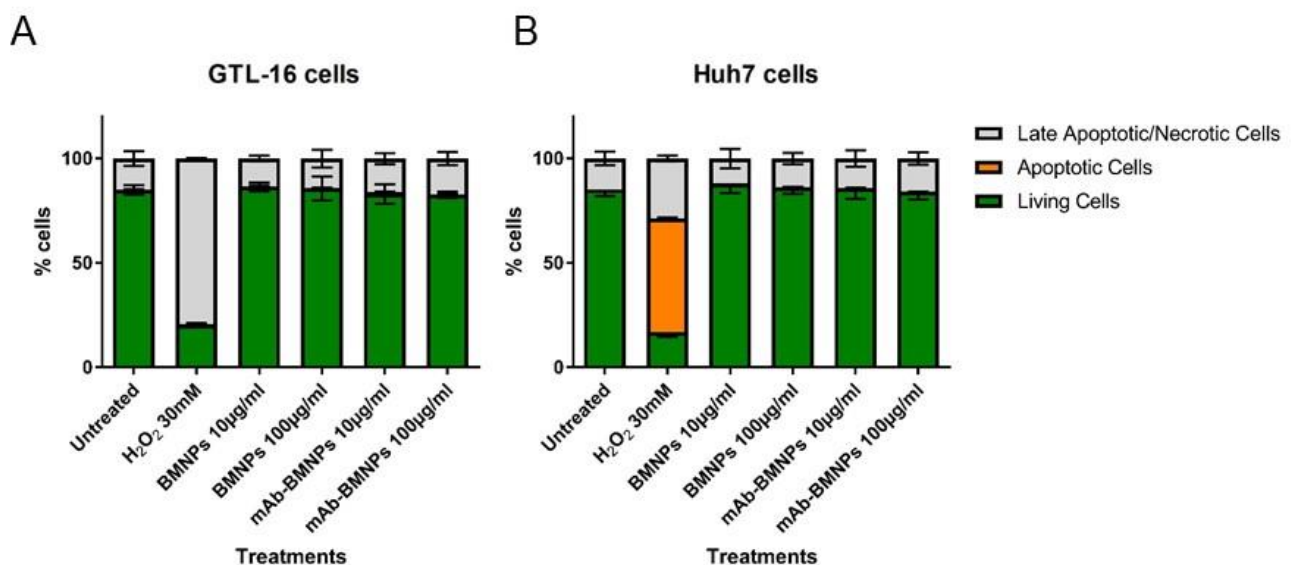


**Figure S1.** (A) Stability of the DO-24 mAb coupled to DOXO-mAb-BMNPs at different *pH* values. (B) Release of the DOXO adsorbed on DOXO-mAb-BMNPs at different *pH* values.

At physiological *pH* the mAb on the ternary DOXO-mAb-BMNPs nanoassemblies remained stably bound until the latest time interval tested (24h), while at acidic *pH* about 60% was still bound on BMNPs at 24h (Figure S1A), showing data overlapping with the ones obtained in case of the binary mAb-BMNPs nanoassemblies. At acidic *pH*, DOXO release from ternary BMNPs was fairly quick, reaching the maximum after 4 h (Figure S1B), while this release at physiologic *pH* was minimal, in line with what was observed in the case of the binary DOXO-BMNPs nanoassemblies. It can thus be concluded that the ternary nanoassemblies show a similar behaviour than that of the binary nanoassemblies in terms of stability at physiological *pH* and ability to quickly release DOXO, but not the mAb at acidic *pH*. These kinetics are compatible with the targeting role of the mAb and the toxic activity of the discharged DOXO.

**Annexin V/propidium iodide test**

The GTL-16 cell line, which was derived from a poorly differentiated human gastric carcinoma which express Met,<sup>[1]</sup> and the Huh7 cell line (kindly provided by Dr H. Nakabayashi, Hokkaido University School of Medicine, Japan),<sup>[2]</sup> which was derived from a well differentiated hepatocellular carcinoma and which is negative for Met, were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50 U/mL penicillin, and 50 µg streptomycin. Cells were splitted when at 80-90% confluency. Cells (approximately 300 × 10<sup>3</sup> GTL-16/well or 150 × 10<sup>3</sup> Huh7/well) were seeded in 6-well plates, incubated for 24 h, then different amounts of mAb- BMNPs or not functionalized BMNPs (10 or 100 µg/mL) were added, and cells were incubated for 72 h. Hydrogen peroxide (30 mM) was used as positive control. Cells and supernatants were then recovered, centrifuged, and incubated for 15 min at room temperature with 2 µl of annexin V-FITC (Enzo Lifesciences, 100 nM) and 5 µl of propidium iodide (PI, 50 µg/mL) dissolved in 93 µl of buffer (in mM: 10 HEPES-NaOH, pH 7.4, 140 NaCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>) in the dark. At least 10,000 cells were analysed in a FACScan flow cytometer equipped with an argon laser. The experiments were performed in triplicate and repeated twice. Data are given as means ± SD. Couples of conditions were compared with Student's t-test. The level of significance was p < 0.05. Fig. S2 reports that the two types of BMNPs had no toxic effect on the two types of cells when they were compared to untreated cells, while in case of hydrogen peroxide treatment about 80% of the cells were induced to apoptosis/necrosis.

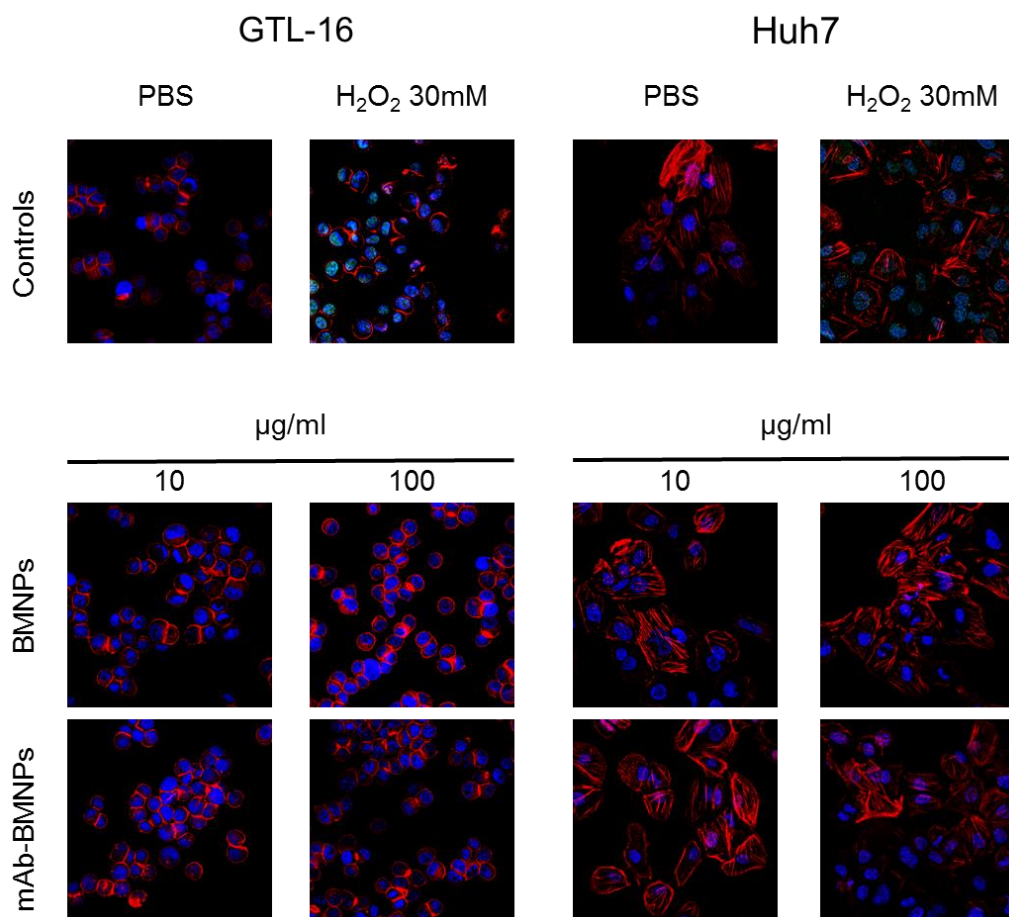


**Figure S2. Cytocompatibility of BMNPs functionalized with mAb or not.** Viability of GTL-16 cells (A) and of Huh7 cells (B) was assessed in an annexin V-propidium assay. No statistically significant differences between the different treatments vs untreated cells were observed, except for the control treated with hydrogen peroxide.

It can thus be concluded that also with this assay BMNPs, both not functionalized or functionalized with the mAb, are fully cytocompatible.

### **Production of Reactive Oxygen species (ROS)**

Cells (approximately  $24 \times 10^3$  GTL-16/well or  $12 \times 10^3$  Huh7/well) were seeded on glass coverslips and incubated in 24-well plates for 24 h. Then different amounts of mAb- BMNPs or not functionalized BMNPs (10 or 100  $\mu\text{g/mL}$ ) were added, and cells were incubated for 2 h. Hydrogen peroxide (30 mM) was used as positive control. CellROX Green Oxidative Stress Reagent (Life Technologies; 5 $\mu\text{M}$ ) was added and cells were incubated at 37 °C for further 30 min in the dark. Coverslips were then washed with PBS, fixed with paraformaldehyde (4% in PBS), rinsed and permeabilized with Triton-X100 (0.5% in PBS) for 10 min and then stained. Cytoskeletal actin was stained with TRITC-phalloidin (1/200; excitation at 543 nm; emission at 560-620 nm), nuclei were stained with TOPRO-3 (1/50, excitation at 642 nm; emission at 650-750 nm). CellROX Green reagents, which are not fluorescent or only faintly fluorescent when they are reduced, become fluorescent (maximum excitation at 485 nm; emission at 520 nm) once they are oxidized and in this case a pale green-blue color was observed when images were merged. Nanoparticles did not induced ROS production, while hydrogen peroxide, used as positive control, could induce it. These data indicate that BMNPs did not induce oxidative stress on the two cell lines tested (Fig. S3) and thus also from this point of view they are highly cytocompatible. Fluorescence was detected with a Leica TCS SP2 AOBS Spectral Confocal Scanner microscope (630x). ImageJ software was used for analysis.



**Figure S3.** ROS evaluation in cells incubated with BMNPs functionalized with mAb or not. GTL-16 and of Huh7 cells underwent the different treatments for 2 h. Only cells treated with hydrogen peroxide, used as control, produced ROS, which were detectable as small dots in pale green-blue color. Magnification 630x.

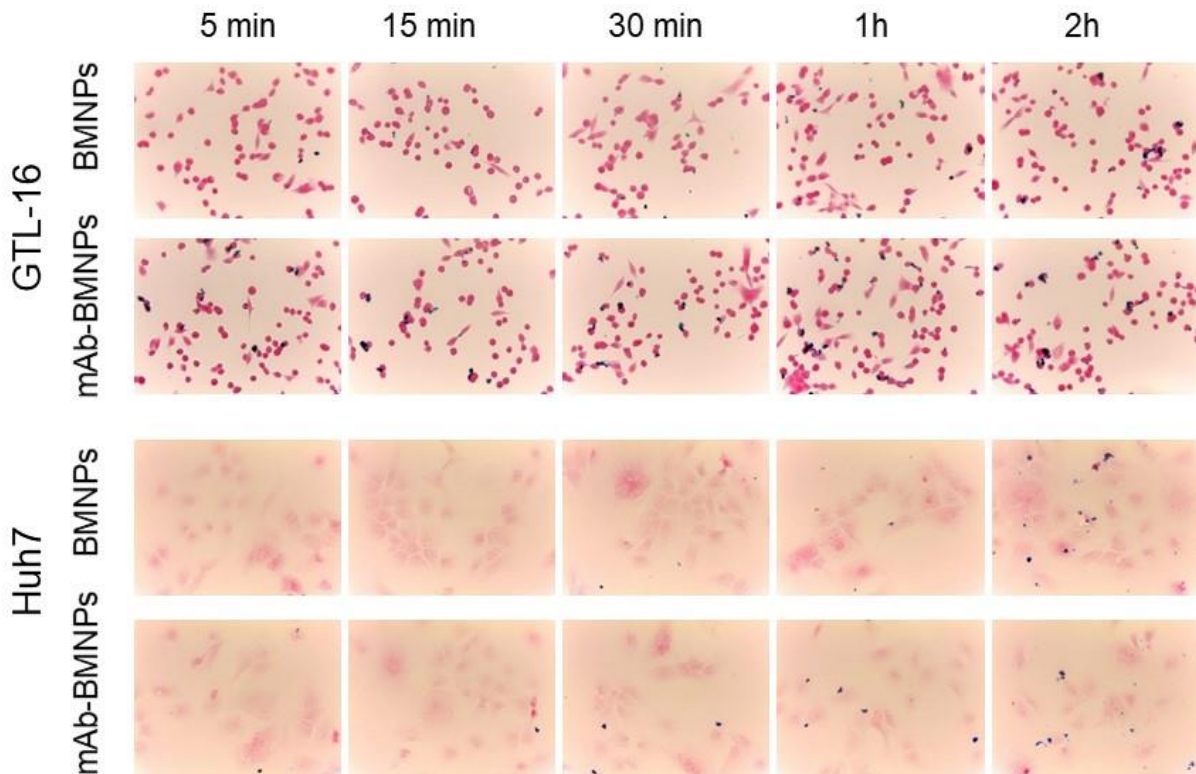
#### Specificity of interaction of mAb-BMNPs nanoassemblies with cells

For Prussian Blue (PB) staining, cells ( $\sim 24 \times 10^3$  GTL-16/well or  $12 \times 10^3$  Huh7/well) were seeded on glass coverslips in 24-well plates and, after 24 h, BMNPs and nanoassemblies ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) presaturated in 0.4% BSA at  $37^\circ\text{C}$  for 2 h, were added. After incubation at  $37^\circ\text{C}$  for different times (from 5 min to 2 h), coverslips were washed with PBS, fixed with 2% PFA, rinsed with PBS and stained with PB as described by.<sup>[3]</sup> Samples were analyzed by optical microscopy (Nikon ECLIPSE Ci).

When samples were stained with Prussian blue, the signal of the mAb-BMNPs was detected at the surface of GTL-16 cells after 5 min incubation and increased for increasing incubation times (Figure S4) while, in the case of Met-negative Huh7 cells, only fewer and more spread/dispersed nanoparticles were detectable after 1 h. BMNPs



did not interact with either cell types until 1 h incubation. After 2 h incubation, both BMNPs and mAb-BMNPs interacted with the surface of both cell types.



**Figure S4.** BMNPs and mAb-BMNPs were incubated with GTL-16 Met<sup>+</sup> cells (top rows) and Huh7 Met<sup>-</sup> cells (bottom rows) for different time intervals. BMNPs were visualized by Prussian blue staining. Magnification 400x.

## References

- [1] S. Giordano, C. Ponzetto, M. F. Di Renzo, C. S. Cooper, P. M. Comoglio, *Nature* **1989**, 339, 155.
- [2] H. Nakabayashi, K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, J. Sato, *Cancer Res.* **1982**, 42, 3858.
- [3] E. Borroni, M. Miola, S. Ferraris, G. Ricci, K. Žužek Rožman, N. Kostevšek, A. Catizone, L. Rimondini, M. Prat, E. Verné, A. Follenzi, *Acta Biomater.* **2017**, 59, 303.



## Chapter IV. Protein corona formation and its influence on biomimetic magnetite nanoparticles

Ana Peigneux<sup>1</sup>, Emanuel A. Glitscher<sup>2</sup>, Rawan Charbaji<sup>3</sup>, Christoph Weise<sup>4</sup>,  
Stefanie Wedepohl<sup>2</sup>, Marcelo Calderón<sup>2,5,6</sup>, Concepción Jimenez-Lopez<sup>1\*</sup> and Sarah  
Hedtrich<sup>3,7\*</sup>

\* Corresponding authors

<sup>1</sup>Department of Microbiology, University of Granada, Faculty of Sciences, Campus de Fuentenueva s/n, 18002 Granada, Spain.

<sup>2</sup>Freie Universität Berlin, Institute of Chemistry and Biochemistry, Chemistry, Takustr. 3, 14195 Berlin, Germany.

<sup>3</sup>Freie Universität Berlin, Institute of Pharmacy, Königin-Luise-Str. 2-4, 14195 Berlin, Germany.

<sup>4</sup>Freie Universität Berlin, Institute of Chemistry and Biochemistry, Biochemistry, Thielallee 63, 14195 Berlin, Germany.

<sup>5</sup>POLYMAT and Applied Chemistry Department, Faculty of Chemistry, University of the Basque Country UPV/EHU, Paseo Manuel de Lardizabal 3, 20018 Donostia-San Sebastián, Spain

<sup>6</sup>IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48013 Bilbao, Spain

<sup>7</sup> University of British Columbia, Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2405 Wesbrook Mall, Vancouver, BC, Canada

### Abstract

Biomimetic magnetite nanoparticles (BMNPs) synthesized in the presence of MamC, a magnetosome associated protein from *Magnetococcus marinus* MC-1, have gained interest for biomedical applications because of their unique magnetic properties. However, their behavior in biological systems like their interaction with proteins, still has to be evaluated prior to their use in clinics. In this study, doxorubicin (DOXO) as a model drug was adsorbed onto BMNPs to form nanoassemblies. These were incubated with human plasma to trigger protein corona (PC) formation. Proteins from the human plasma stably attached to either BMNPs or DOXO-BMNPs nanoassemblies. In particular, fibrinogen was detected as the main component in the PC of DOXO-BMNPs, which potentially provides advantages by, on one hand, removing the excess plasma fibrinogen that is involved in chemotherapy resistance and, on the other hand, protecting the particles from

phagocytosis, thus prolonging their circulation time. Adsorption of PC to the BMNPs did not alter their magnetic properties but improved their colloidal stability, thus reducing their toxicity in human macrophages. In addition, PC formation enhanced cellular internalization and did not interfere with DOXO activity. Overall, our data indicate that the adsorption of PC onto DOXO-BMNPs in biological environment even increases their efficiency as drug carrier systems.

**Keywords:** biomimetic nanoparticles, MamC, protein corona, cell internalization, drug delivery, doxorubicin.

## **Introduction**

In the recent years, nanoparticles (NPs) have been increasingly recognized as powerful tools for diagnostic and therapeutic purposes.<sup>1</sup> Detailed information about the interactions between these nanomaterials and biological systems is crucial to determine whether or not the nanoparticles could be used in the clinics. When NPs get in contact with biological environments (e.g. after intravenous administration), protein binding will occur resulting in the formation of a protein corona (PC). This protein-modified surface may affect particle properties (e.g. particle stability and biocompatibility) and their physiological effects including, cellular uptake, circulation lifetime, etc.<sup>2</sup> Although significant progress has been made recently towards the understanding of PC formation around different NPs,<sup>3-6</sup> additional investigations are required to translate the *in vitro* findings to the situation *in vivo*.

Several parameters such as the binding affinities of the proteins forming the PC, exposure time, and physicochemical parameters of the NPs (size, shape, surface charge, solubility and surface modification) influence the composition and thickness of the PC.<sup>7-10</sup> The binding affinities of the different proteins to the NPs also determine which proteins will be more readily adsorbed to the NPs surface. Proteins tightly bound to the NP forming the “hard” corona show higher binding affinities compared to the proteins of the “soft” corona with lower binding affinities.<sup>2</sup> Thus, during the initial phase of PC formation, the most abundant proteins are adsorbed to the surface, but over time they are replaced by proteins with higher affinities, a phenomenon referred to as the Vroman effect.<sup>11</sup> This effect can also alter the biodistribution of the NP which is an important parameter to consider prior to *in vivo* applications.<sup>2</sup>

Among the different NPs used in biomedical applications, magnetic nanoparticles (MNPs) have received increasing attention with regard to magnetic targeting for drug delivery and application as hyperthermia agents.<sup>12–20</sup> This holds especially true for superparamagnetic 30–40 nm biomimetic MNPs (BMNPs) synthesized by magnetite co-precipitation mediated by the magnetosome-associated protein MamC from *Magnetococcus marinus* MC-1.<sup>21</sup> The functional groups of MamC exposed on the particle surface confer new surface properties to the particles allowing their complexation with other molecules and drug release upon pH changes. This release is facilitated under hyperthermic conditions triggered by an AMF.<sup>22,23</sup> Prior to their use in the clinics, a more detailed understanding of the interactions with plasma proteins is crucial to predict potential secondary effects caused by systemic application of BMNPs.

Hence, the present study reports on the interaction between unloaded and doxorubicin (DOXO)-loaded BMNPs and proteins found in the human blood following incubation with human plasma for up to 24 h. The proteins adsorbed to the surface of the different nanoassemblies were identified and the impact of the PC formation on particle properties was assessed. Subsequently, we looked at the biological impact of the PC-coated BMNPs in different endothelial cells, primary macrophages and drug-resistant cancer cell lines.

## **Results and discussion**

### **Characterization of BMNP nanoassemblies**

Superparamagnetic (at 300 K) BMNPs with an isoelectric point of  $\square 4.4$ , specific surface area of  $\square 90 \text{ m}^2/\text{g}$ , blocking temperature of  $\square 145 \text{ K}$ , irreversibility temperature of  $\square 292 \text{ K}$  and containing up to 5 wt% of MamC (thus composed of  $\square 95 \text{ wt\%}$  of magnetite and  $\square 5 \text{ wt\%}$  of MamC)<sup>21,23</sup> were produced by magnetite co-precipitation with MamC. Transmission electron microscopy (TEM) images of MamC-mediated BMNPs show well-faceted crystals with polyhedral two-dimension morphologies and a particle diameter distribution ranging from 20 to 50 nm, with an average of  $36 \pm 12 \text{ nm}$  (Figure S1). Subsequently, the BMNPs were assembled with DOXO as a model drug and incubated with human plasma for 1 h and 24 h to mimic exposure to human blood and trigger protein corona (PC) formation. The DOXO loading efficiency of the BMNPs was  $\sim 80\%$  after 24 h incubation at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , being equivalent to a loading capacity of 0.16 mg DOXO per mg of BMNPs which is in line with previous studies.<sup>22,23</sup> MamC provides a template for magnetite growth, becomes attached and/or incorporated, which

ultimately provides functional groups for the attachment of other molecules. Following incubation with DOXO, the  $\zeta$ -potential of BMNPs at pH 7.4 increases from -10.83 mV (BMNPs) to 9.63 mV (DOXO-BMNPs) indicating that the carboxylic groups exposed by MamC are no longer available (Table 1), Most likely, DOXO-BMNPs complexation is based on the interaction between carboxylic groups from MamC and amino groups from DOXO. In fact, in solution DOXO forms dimers with antiparallel conformation in which their amino groups are exposed and directed to opposite directions, thus being accessible for other molecules. Most of these amino groups are protonated ( $-\text{NH}^{3+}$ ) at pH 7.4 resulting in a positive net charge.<sup>24,25</sup>

Following incubation with human blood plasma, PC-BMNPs and PC-DOXO-BMNPs showed negative electrophoretic mobility at pH 7.4, ranging from -10.12 mV to -11.02 mV for PC-BMNPs and from -6.37 mV to -6.98 mV for PC-DOXO-BMNPs depending on the incubation time (Table 1). The similarity of the  $\zeta$ -potential of BMNPs and PC-BMNPs may indicate either only few interactions between BMNPs and blood plasma proteins<sup>26</sup> due to electrostatic repulsion or interactions between the proteins and the BMNPs through the positive MamC residues so that the negative nanoassembly surface is maintained. For PC-DOXO-BMNPs, the  $\zeta$ -potential were -10.1 and -11.0 mV after 1 and 24 h incubation in plasma, respectively, at pH 7.4 which differs significantly from BMNPs (-10.83 mV) and DOXO-BMNPs (+9.63 mV). Here, the change towards negative  $\zeta$ -potential values occurs on the DOXO-BMNPs after complexation to the proteins indicating electrostatic interactions between the positively charged amine groups of DOXO and the negatively charged plasma proteins.

	BMNPs	PC-BMNPs 1h	PC-BMNPs 24h	DOXO-BMNPs	PC-DOXO-BMNPs 1h	PC-DOXO-BMNPs 24h
$\zeta$ potential (mV) (pH 7.4)	-10.8	-10.1	-11.0	9.6	-6.4	-7.0

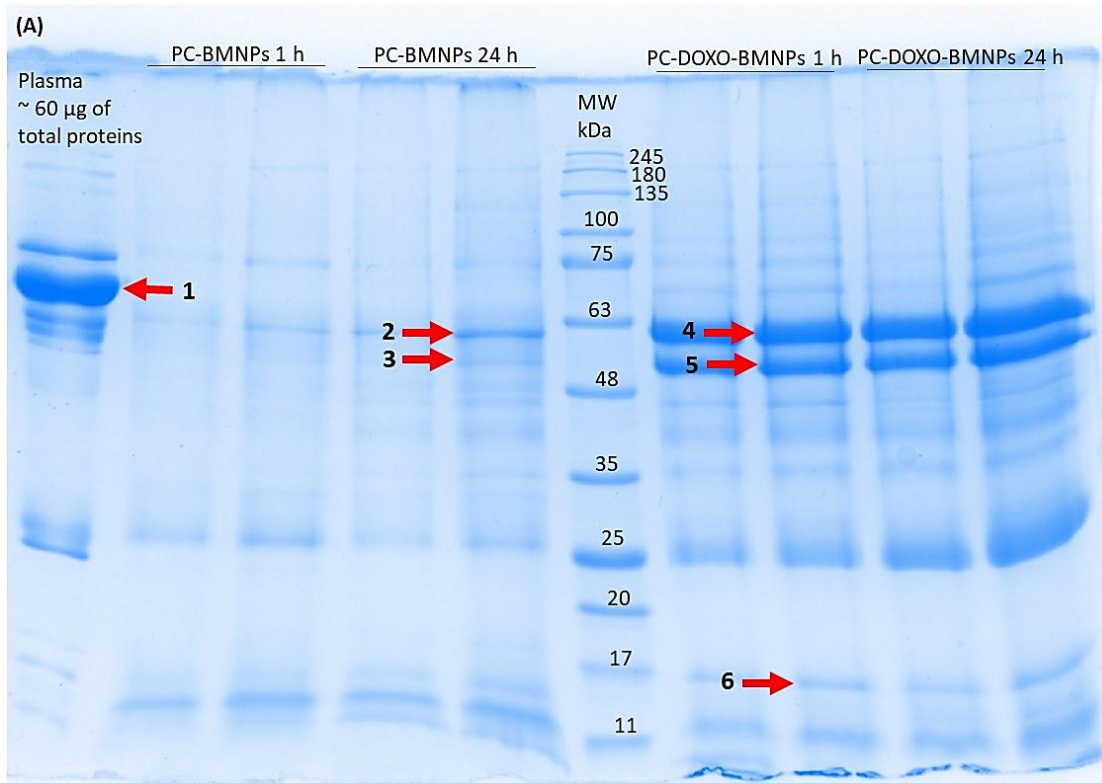
**Table 1.**  $\zeta$ -potential measurements of biomimetic magnetite nanoparticles (BMNPs) or doxorubicin (DOXO) functionalized BMNPs before and after 1 or 24 h incubation with human plasma.

SDS-PAGE analysis showed characteristic protein bands for PC-BMNPs and PC-DOXO-BMNPs (Figure 1A) clearly indicating a PC formation. The higher amounts of proteins attached to DOXO-BMNPs compared to BMNPs, as indicated by the band intensities, is also in accordance with the  $\zeta$ -potential, as stronger electrostatic interactions are expected between plasma proteins (most of them negatively charged)<sup>26</sup> and the positively charged DOXO-BMNPs. Interestingly, the protein patterns were the same after 1 h and 24 h incubation. This may be of advantage for systemic applications since this may help to predict biodistribution.

Aiming to qualitatively characterize the proteins of the BMNP PC, the corona proteins separated by SDS-PAGE were in-gel digested with trypsin and peptide mass fingerprints were recorded using MALDI-TOF-MS (Figure 1B). Interestingly, no albumin was found adsorbed to any of the BMNP nanoassemblies, as albumin shows higher affinity for hydrophobic surfaces.<sup>27</sup> Another interesting finding is that an enrichment of fibrinogen- $\beta$  and - $\gamma$  was found in PC-DOXO-BMNPs and PC-BMNPs. Fibrinogen is another highly abundant plasma protein that preferentially adsorbs to hydrophilic nanoparticles.<sup>28,29</sup> This adsorption may have different physiological implications. Elevated levels of plasma fibrinogen are involved in cell resistance to chemotherapy and enhancing tumor growth in different type of tumors.<sup>30-32</sup> This opens the possibility to further investigate if preferential binding of fibrinogen to the DOXO-BMNPs would reduce chemotherapy resistance *in vivo*. On the other hand, fibrinogen acts as an opsonin triggering nanoparticles recognition by the cells of the reticuloendothelial system.<sup>33</sup> Adsorbed at high concentrations, however, fibrinogen forms a multilayer matrix,<sup>34,35</sup> which dramatically decreases the cellular association.<sup>36,37</sup> Therefore, fibrinogen may protect the particles from phagocytosis and prolong their

circulation

time.



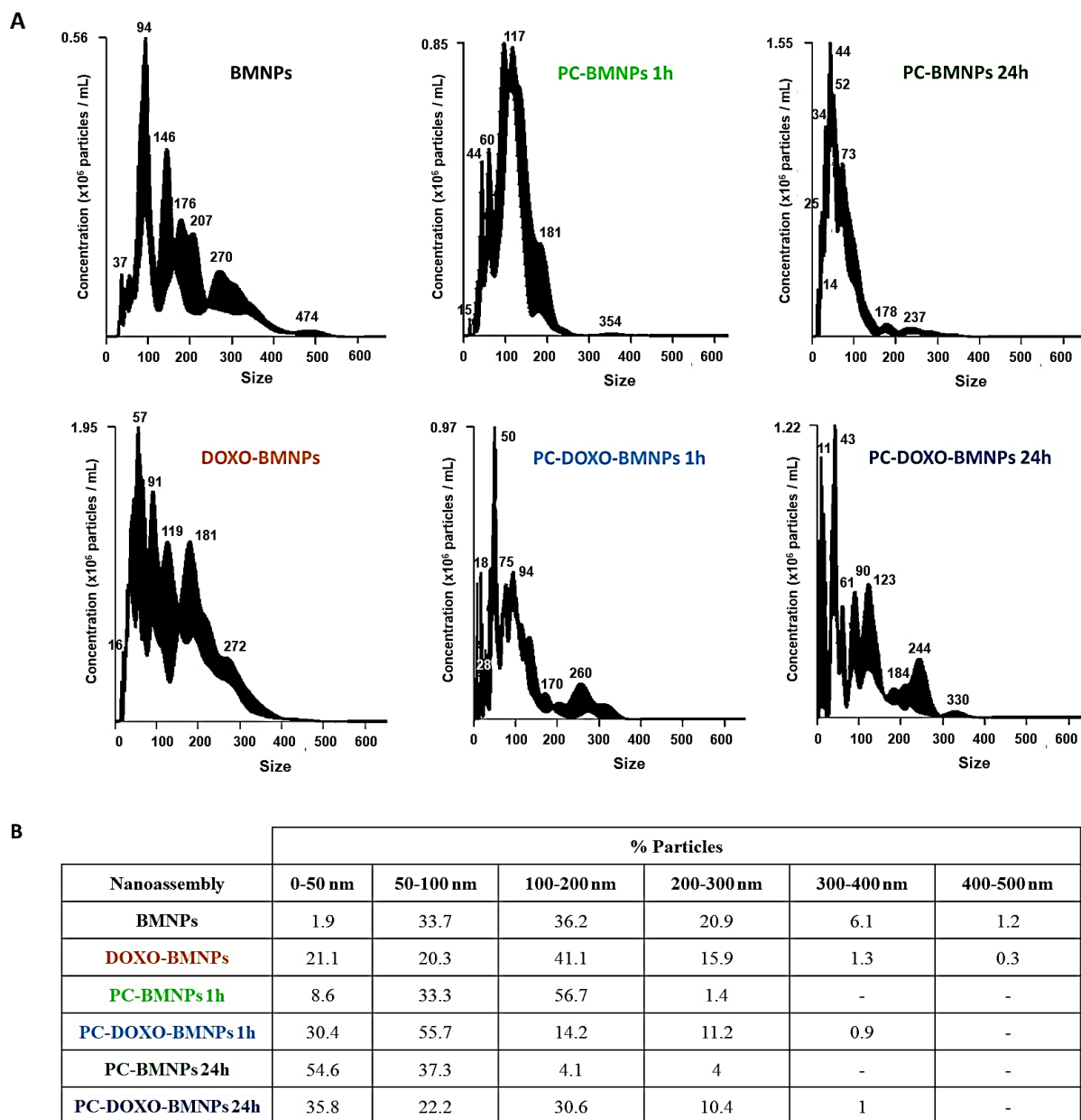
(B)

Band #	SwissProt Accession	Protein	Mascot Score	Peptide matches	Sequence coverage (%)	Expect value
1	ALBU_HUMAN	Albumin (66 kDa)	245	30	43	6.4e-21
2	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta (57 kDa)	112	20	40	1.3e-07
3	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma (52 kDa)	88	11	27	2.9e-05
4	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta (57 kDa)	171	26	44	1.6e-13
5	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma (52 kDa)	150	17	50	2.9e-11
6	TTHY_HUMAN	Transthyretin (16 kDa)	59	5	48	2.6e-02

**Figure 1.** (A) Protein binding profiles of biomimetic magnetite nanoparticles (BMNPs). Protein constituents of full human plasma and BMNPs with and without doxorubicin (DOXO) coupled, followed by 1 or 24 h incubation with human plasma (PC-(DOXO)-BMNPs 1 or 24 h). Proteins were separated by one-dimensional SDS-PAGE and visualized by Coomassie Brilliant Blue staining. (B) Protein constituents of biomimetic magnetite nanoparticles (BMNPs) bearing protein corona, as determined by trypsin peptide mass fingerprints recorded using MALDI-TOF-MS.

The charge of the BMNPs and nanoassemblies is advantageous in terms of their colloidal stability. However, BMNPs aggregation still occurs which is a drawback for their potential application.<sup>22,23</sup> Notably, NTA analysis showed that complexation of the nanoparticles with DOXO and plasma proteins ultimately improves BMNP stability indicated by decreased amounts of agglomerates compared to pristine BMNPs (Figure 2). MamC is a highly hydrophobic protein that interacts with other MamC molecules through hydrophobic domains to gain stability.<sup>38</sup> This, however, also promotes BMNP aggregation. Hence, when MamC is bound to other molecules, these hydrophobic interactions are sterically hindered which may favor the colloidal stability.

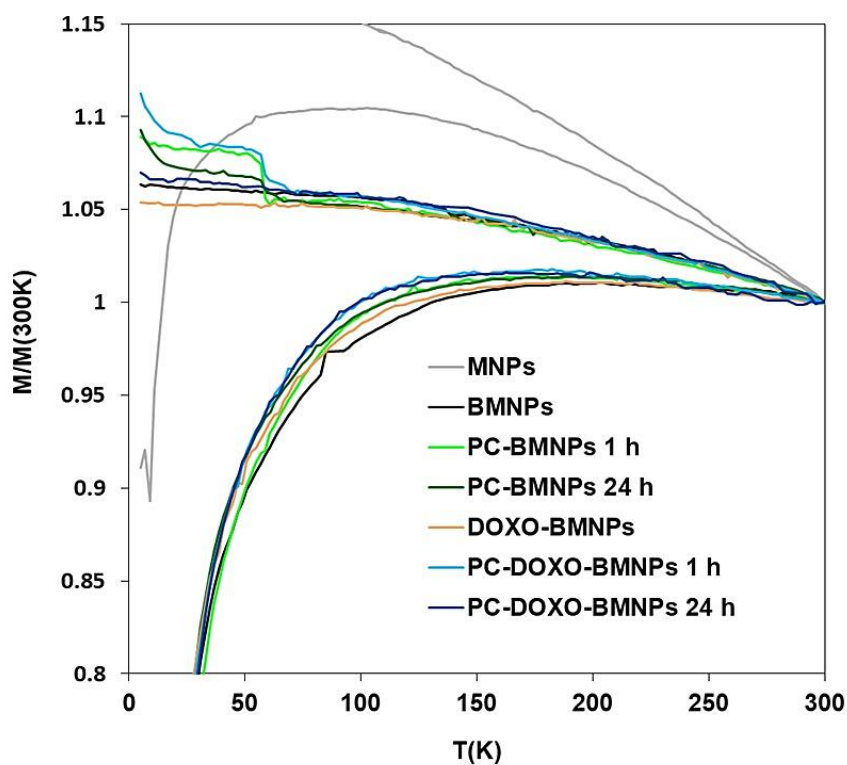
This hypothesis is also substantiated by the size distribution which is narrower for the PC-BMNPs nanoassemblies (Figure 2) compared to BMNPs. This holds true especially for those incubated with plasma for 24 h where 91.9% of the particles are  $\leq$  100 nm, with 54% of the particles being  $\leq$  50 nm (Figure 2B), which is the size of single BMNPs (average size of BMNPs:  $36 \pm 12$  nm according to TEM analysis). These findings are consistent with previous studies demonstrating improved colloidal stability for multiple types of nanoparticles, including magnetic particles.<sup>39-43</sup> However, less significant effects on the colloidal stability were observed for DOXO-loaded BMNPs (PC-DOXO-BMNPs:  $105.8 \pm 70.5$  nm for 1 h incubation and  $104 \pm 43$  nm for 24 h) (Figure 2). This may result from increased interparticle flocculation due to greater adsorption of mainly negatively charged proteins to the positively charged DOXO-loaded BMNPs.<sup>44</sup> Nevertheless, 30% and 36% of PC-DOXO-BMNPs incubated in plasma for 1 and 24 h, respectively, are  $\leq$  50 nm, which is a clear improvement compared to the BMNPs (1.9%) (Figure 2B).



**Figure 2.** (A) Size distribution and (B) percentage of particle size ranges for the biomimetic magnetite nanoparticles (BMNPs) or the doxorubicin (DOXO) functionalized BMNPs before and after 1 or 24 h incubation with human plasma. Black areas of the curves indicate SD calculated from three individual measurements.



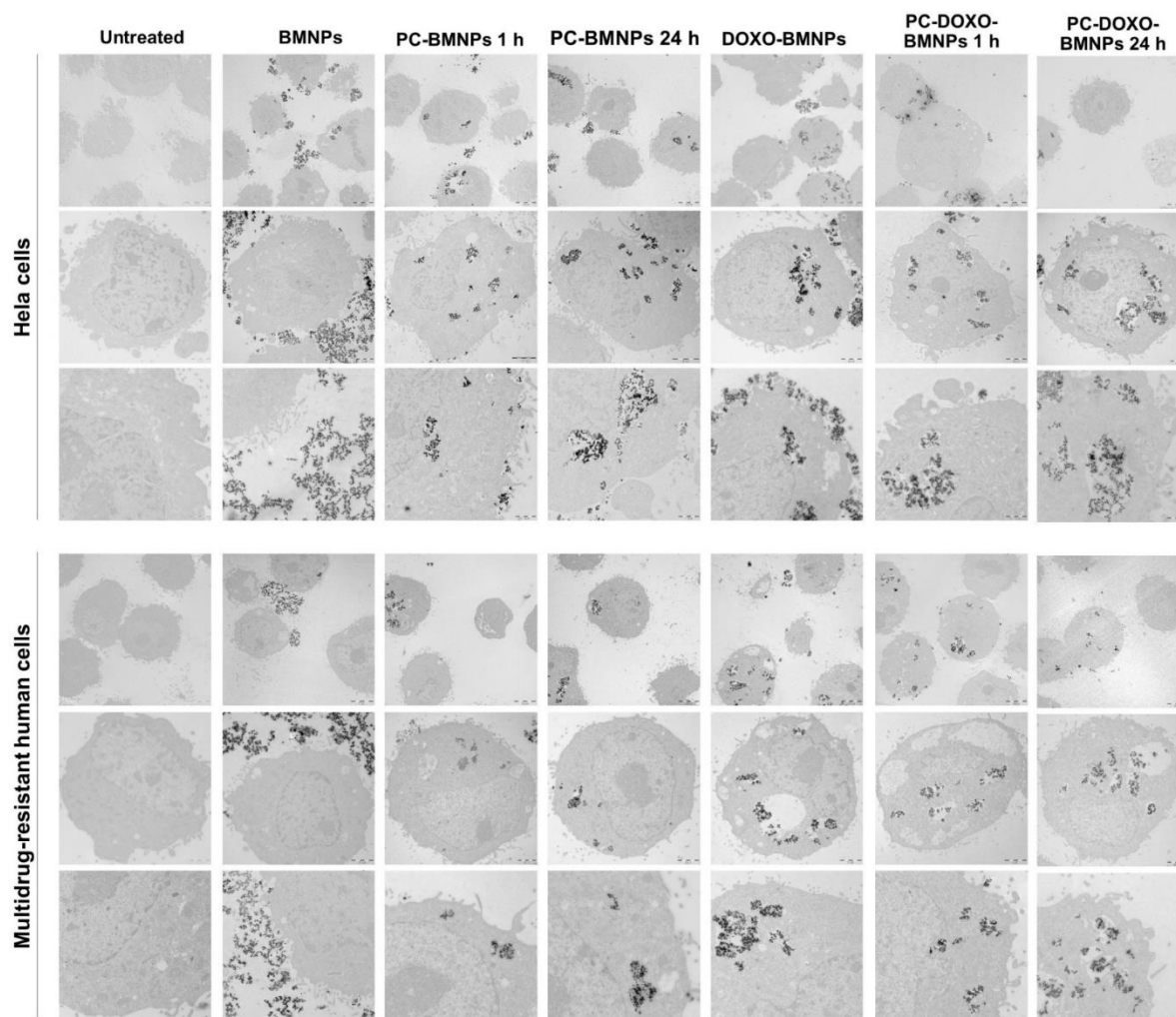
Overall, PC formation had little effect on the magnetic properties of the BMNPs (Figure 3). All nanoassemblies and BMNPs showed similar blocking temperature ( $T_B$ ) values between 183 K and 202 K indicating highly crystalline nanoparticles which is in line with the TEM data. As previously demonstrated by Garcia-Rubia *et al.* (2018)<sup>23</sup> and Iglesias *et al.* (2019)<sup>45</sup> for BMNPs, the nanoassemblies produced in this study are superparamagnetic at room temperature



**Figure 3.** ZFC-W and FC-C of inorganic magnetite nanoparticles (MNPs), BMNPs, DOXO-BMNPs, PC-BMNPs incubated for 1 and 24 h, and PC-DOXO-BMNPs incubated for 1 and 24 h.

### Cellular uptake of the BMNPs nanoassemblies

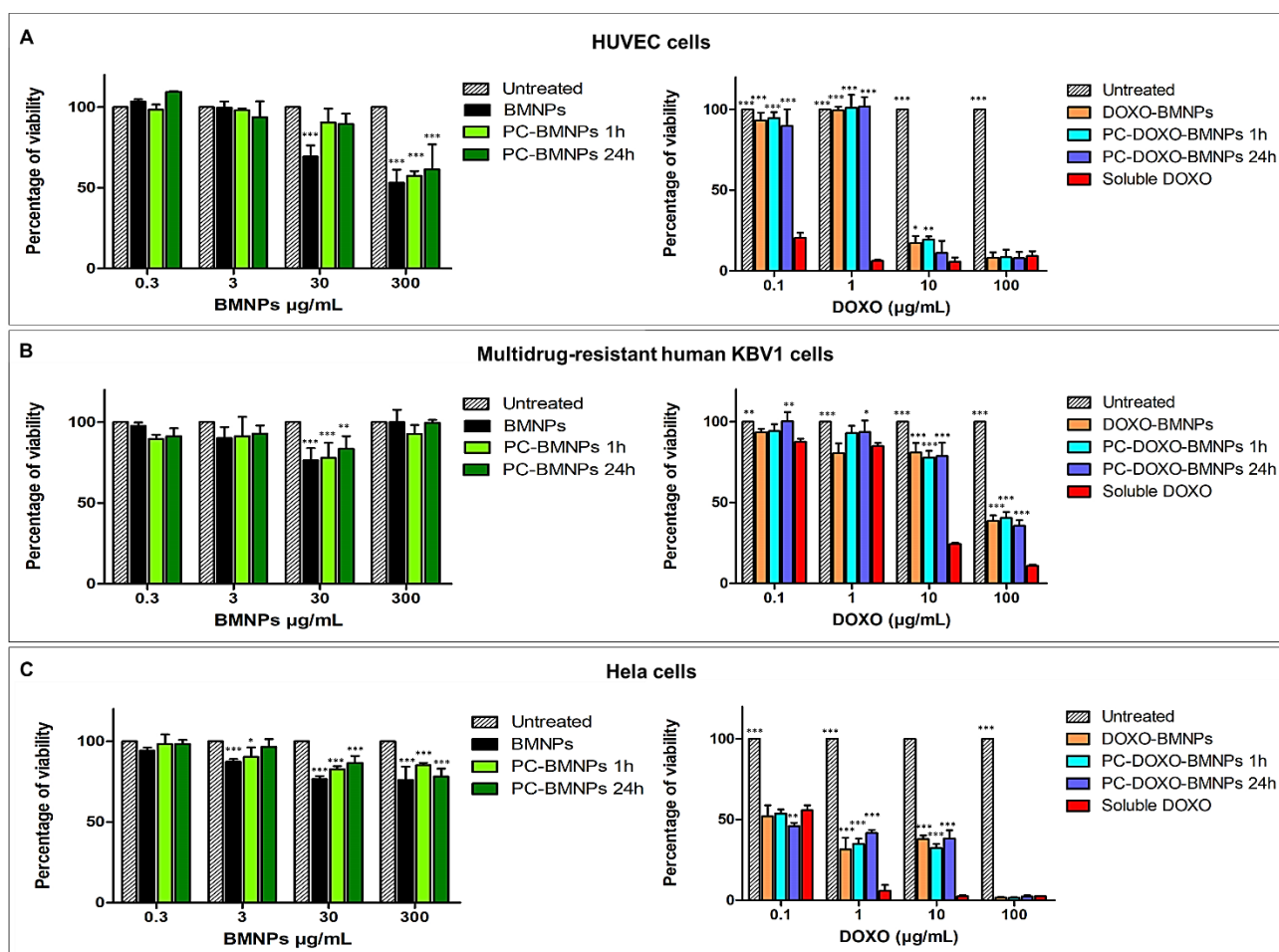
The BMNPs internalized by cells were identified as iron oxide nanoparticles by electron spectroscopy imaging (ESI) and electron energy loss spectroscopy (EELS) (Figure S2). The internalization of PC-BMNPs in HeLa and multidrug-resistant KB-V1 cells was increased compared to BMNPs (Figure 4), in accordance with the reduction of the hydrodynamic diameter of the agglomerates after incubation with plasma (Figure 3). This shows that the PC facilitates cell uptake,<sup>2</sup> which is consistent with previous studies using ApoH-bearing NPs,<sup>46</sup> alpha2GP-, IgG- and HAS-bearing NPs,<sup>47</sup> and MNPs incubated in human serum.<sup>48</sup> Consistently, for PC-DOXO-BMNPs, increased cytotoxicity was observed compared to pristine DOXO-BMNPs as indicated by reduced cell counts and an impaired phenotype (Figure 4).



**Figure 4.** TEM micrographs of HeLa and multidrug-resistant KB-V1 cells incubated with the different functionalized BMNP nanoassemblies. The micrographs are representative of alternate serial cuts of the cell pellets of each sample.

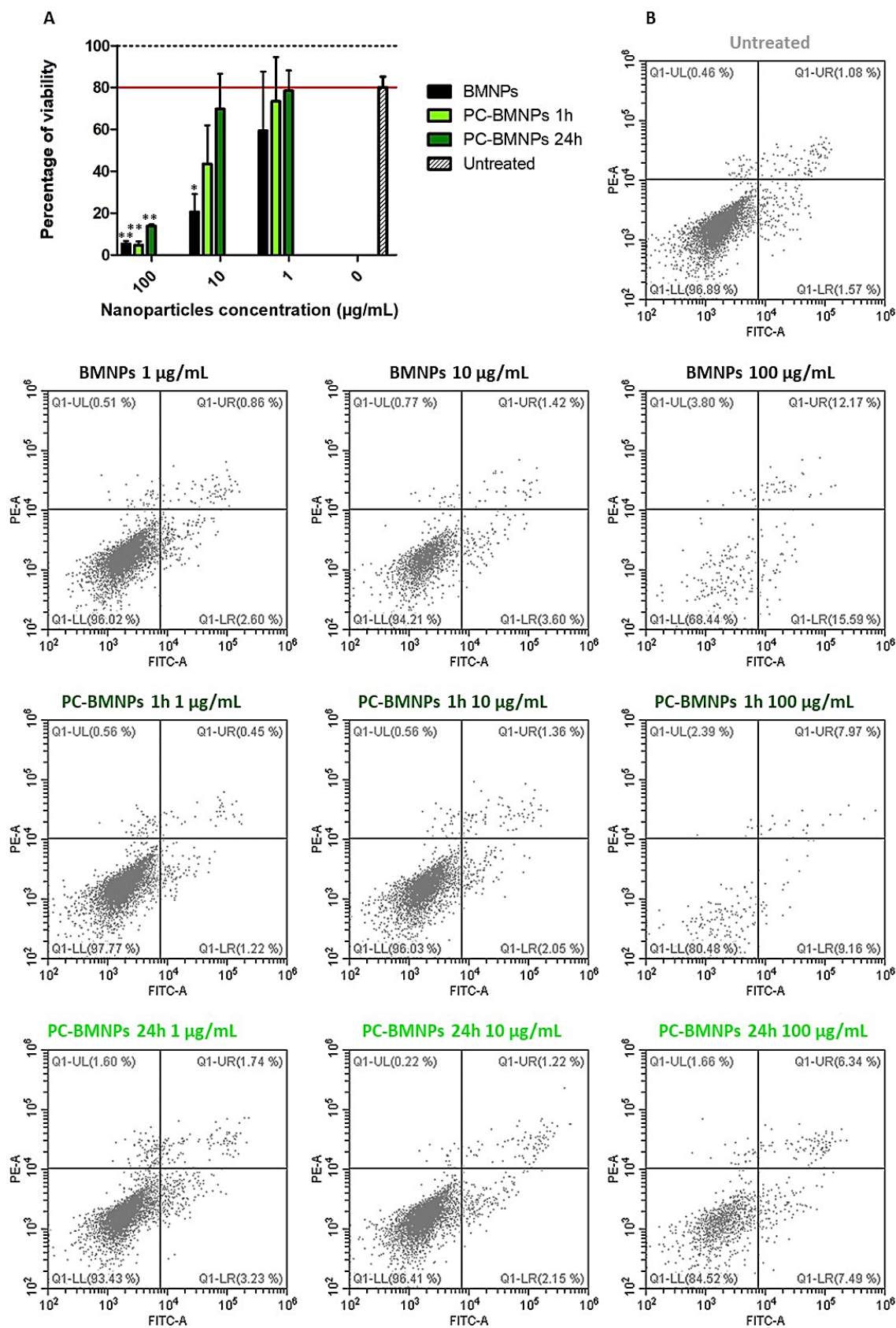
### **Cytotoxicity assay**

BMNPs and PC-BMNPs did not trigger significant cytotoxicity in HUVEC, HeLa, and KB-V1 cells at concentrations  $\leq 30 \mu\text{g/mL}$  (Figure 5), which is in accordance with previous studies using different cell lines.<sup>22</sup> On the other hand, DOXO-BMNPs and PC-DOXO-BMNPs were cytotoxic for HUVEC and KB-V1 at DOXO concentrations  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  or  $\geq 0.1 \mu\text{g/mL}$  for HeLa cells. All the DOXO-BMNPs nanoassemblies show a DOXO-specific cytotoxic effect in a dose-dependent manner (Figure 5), which indicates that PC formation does not reduce the DOXO activity. Overall, soluble DOXO was more toxic than DOXO bound to BMNPs at concentrations  $\leq 10 \mu\text{g/mL}$ , in accordance with previous studies.<sup>22,49,50</sup> The reduced cytotoxicity of DOXO-BMNPs at low concentrations may be explained by the fact that the nanoassemblies have to be taken up by the cells followed by drug release ultimately slowing down the cytotoxic effect compared to the soluble drug. On the other hand, this may be advantageous too, since the drug is adsorbed to the nanoparticles thus reducing side effects. Nevertheless, at the highest dose ( $100 \mu\text{g/mL}$ ), the cytotoxicity of DOXO-BMNPs and soluble DOXO are comparable in HeLa and HUVEC cells (Figure 5A,C), but not in multiresistant KB-V1 cells (Figure 5B). This may be due to a premature DOXO release in the cell growth medium, in line with the fast release observed by Garcia Rubia *et al.* (2018)<sup>23</sup> showing 20% of DOXO release from the BMNPs after just 1 h, which might explain that DOXO-BMNPs does not outperform soluble DOXO against these multiresistant cells. This would be expected if DOXO would be released inside the cell and in close proximity to the cell nucleus, where it can intercalate in the DNA, avoiding to be extracellularly transported by P-glycoprotein (P-gp) of the cell membrane.<sup>51</sup>



**Figure 5.** Cytotoxicity of the biomimetic magnetite nanoparticles (BMNPs) or the doxorubicin (DOXO) functionalized BMNPs before and after 1 or 24 h incubation with human plasma incubated with (A) Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), (B) multidrug-resistant KB-V1 cells and (C) HeLa cells for 72 h. Cell viability was assessed by MTT assay. Untreated cells served as 100% control. Statistical differences between the treatments were considered significant when p values were  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*). DOXO-BMNPs and PC-DOXO-BMNPs are compared to soluble DOXO (positive control), while BMNPs and PC-BMNPs are compared to untreated cells (negative control).

The biocompatibility of BMNPs and PC-BMNPs was also tested in primary human macrophages as exemplary cells of the innate immune system. Flow cytometric analysis of the macrophage population (Figure 6) shows that macrophage viability decreased in a dose-dependent manner, especially when treated with BMNPs. For instance, at 10  $\mu\text{g/mL}$  of BMNPs, cell viability was drastically reduced to 20.6%. Again, PC-bearing BMNPs showed reduced cytotoxicity compared to BMNPs (43.6%). Most interestingly, PC-BMNPs incubated for 24 h in plasma had the least effect onto the cell viability (69.8%). This protective effect of PC covered NP is in accordance with a number of previous studies.<sup>5,40,43,52–55</sup> In fact, Wang *et al.* (2013)<sup>52</sup> describe it as a ‘Trojan horse’ effect since protein corona coating promotes internalization of the nanoassemblies preventing damage of the cell membrane. The reduced aggregation of PC-BMNPs compared to BMNPs incubated with the macrophages (Figure S3) may also contribute to the lower toxicity of the former.



**Figure 6.** Cytotoxicity of biomimetic magnetite nanoparticles (BMNPs) or the doxorubicin (DOXO) functionalized BMNPs before and after 1 or 24 h incubation with



human plasma incubated with macrophages for 4 h. Cell viability was assessed by annexin V and PI staining in flow cytometric analysis. Untreated macrophages served as control. **(A)** The bar chart shows the percentage of total viable cells for each condition. Viable cells were counted as those which fell in the lower left box. **(B)** Representative dot plots from the subsequent flow cytometric analysis of the different BMNPs nanoassemblies treated macrophages are shown. Statistical differences between the treatments were considered significant when p values were  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

## **Experimental section**

### **MamC expression and purification**

MamC expression and purification was carried out following the protocol previously described by Valverde-Tercedor *et al.* (2015).<sup>21</sup> Briefly, recombinant MamC pTrcHis-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific) was transformed and overexpressed in *Escherichia coli* TOP10 competent cells (Thermo Fisher Scientific) by using 2 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) as inducing agent at 37 °C for 5 h. This recombinant vector codes for a hexahistidine sequence, so MamC was expressed with a His-tag at its N-terminal. MamC purification was performed by using a HiTrap chelating HP column (GE Healthcare), previously equilibrated with buffer 20 mM phosphate buffer, pH 8.0, 6 M urea, and 0.5 M NaCl, loaded on a fast protein liquid chromatography system (FPLC). Then the column was washed with 15 bed volumes of the same buffer, followed by 10 bed volumes of the buffer adjusted to pH 6.5 and, finally, the protein was eluted by pH change under denaturing conditions with 5 bed volumes of the buffer at pH 4. After purification, MamC was refolded through dialysis by progressive removal of the urea. The purity and concentration of MamC protein was evaluated after dialysis by SDS-PAGE and using a NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific), respectively.

### **MamC-mediated BMNPs synthesis**

MamC-mediated BMNPs were synthesized following the previously published procedure described by Garcia Rubia *et al.* (2018).<sup>23</sup> Briefly, BMNPs precipitation was produced by mixing deoxygenated solutions of 2.78 mM  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ , 5.56 mM  $\text{FeCl}_3$ , 3.5 mM/3.5 mM  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MamC protein and NaOH to reach a pH value of 9. This reaction was carried out in anaerobic conditions (to avoid magnetite oxidation)

at 25 °C and 1 atm total pressure. Magnetite precipitation was allowed to proceed for 30 days and then the formed BMNPs were washed twice with oxygen-free Milli-Q water and a last wash in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer (pH 7.4). BMNPs were sterilized by autoclave (121 °C, 15 min) and kept inside the anaerobic COY chamber. As the BMNPs used in the present study belonged to the batch characterized in Garcia-Rubia *et al.* (2018),<sup>23</sup> basic mineral characterization is included in the present manuscript while a more exhaustive characterization ( $\zeta$ -potential, thermogravimetric analyses, specific surface area by BET and hysteresis cycle) can be found in the manuscript referred to above and is not included here. According to these results, the BMNPs used in the present study are superparamagnetic magnetic nanoparticles at 300K containing up to 5 wt% of MamC (thus composed of  $\square$ 95 wt% of magnetite and  $\square$ 5 wt% of MamC), with an isoelectric point of  $\square$ 4.4, specific surface area of  $\square$  90 m<sup>2</sup>/g, blocking temperature of  $\square$ 145 K and irreversibility temperature of  $\square$ 292 K.<sup>21,23</sup>

The morphology and size of the BMNPs formed were analysed by using a LIBRA 120 PLUS of Carl Zeiss SMT Transmission Electron Microscope (TEM). BMNPs were embedded in Embed 812 resin, ultrathin sections (50–70 nm) were made using a Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and deposited onto copper grids. The size of 1000 BMNPs was measured on multiple micrographs by using ImageJ 1.47 software, and size distribution curves were created from those values using GraphPad Prism version 4.03 (GraphPad Prism, San Diego, CA).

#### **Plasma isolation and protein corona (PC) formation on BMNPs and DOXO-BMNPs**

Human plasma was separated from whole blood of healthy donors (with permission, Deutsches Rotes Kreuz) diluted 2-4 times in PBS containing 2 mM EDTA by centrifugation at 400 g for 5 min and stored at – 80 °C.

BMNPs were functionalized with DOXO (DOXO-BMNPs nanoassemblies) and/or with protein corona from human plasma suspensions (PC-BMNPs and PC-DOXO-BMNPs nanoassemblies). To produce DOXO-BMNPs nanoassemblies, the protocol previously described by Peigneux *et al.* (2019)<sup>22</sup> was followed. Briefly, an aliquot of 5 mg of BMNPs was mixed with 1 mg/mL of DOXO in HEPES-buffered saline solution (HBS; 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) for 24 h at room temperature and shaking at 1000 rpm. The DOXO-BMNPs nanoassemblies were collected with a magnet and washed five times with HEPES-buffered saline solution to remove the unbound DOXO.



The amount of the adsorbed DOXO was assessed by UV-Vis spectroscopy ( $\lambda = 490$  nm), and the final concentration was calculated as difference between the initial concentration of the molecule in solution and the measured final concentration remaining in the supernatant after the removal of the BMNPs at the end of the adsorption experiments.

To produce PC-BMNPs and PC-DOXO-BMNPs nanoassemblies, BMNPs and DOXO-BMNPs were incubated with human plasma suspensions (1:1 v/v) for 1 or 24 h at 37°C. In all cases, the particles were collected with a magnet at the end of the specified incubation time and washed three times with HBS to remove unbound proteins. The concentration of the PC adsorbed was analyzed by the Bicinchoninic Acid Assay (BCA) after 1 h treatment with 1% SDS in HBS and by Bradford protein assay (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol.

DOXO-BMNPs, PC-BMNPs and PC-DOXO-BMNPs nanoassemblies were resuspended in HEPES buffered saline solution and kept at 4 °C.

### **PC assessment**

At the end of the specified incubation time (1 or 24 h) the PC-bearing nanoassemblies were collected with a magnet and then washed three times with HEPES buffer to separate the particle-protein nanoassemblies from the free (non-adsorbed) proteins. Bound proteins were separated from the BMNPs by incubation with Laemmli sample buffer (final concentration 2% w/v SDS, 5 min 95 °C) followed by 4-20% gradient polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF). Protein bands were visualized by Coomassie Brilliant Blue staining. Then, the individual bands were isolated following an in-gel tryptic digestion protocol. Briefly, gel bands were cut and destained by incubation with a 1:1 mixture of ammonium bicarbonate (100mM) and acetonitrile (v/v) for 15 min, and afterwards with 100% acetonitrile for a further 5 minutes. After drying, proteins were reduced in dithiothreitol (100 mM, 56 °C, 30 min), shortly centrifuged and the gel pieces were shrunk in 100% acetonitrile. Subsequently, gel pieces were incubated with iodoacetamide (55 mM, 20 min) in the dark for alkylation, washed with 100 mM ammonium bicarbonate and kept in 100% acetonitrile. Then they were dehydrated by vacuum centrifugation and incubated overnight with trypsin (12.5  $\mu$ g/mL in 25 mM ammonium bicarbonate). After supernatant removal, the residual peptides were extracted using in 40% acetonitrile (0.1% trifluoroacetic acid).

Peptide masses were determined by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) using an Ultraflex-II TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics) equipped with a 200 Hz solid-state Smart beam™ laser. The mass spectrometer was operated in the positive reflector mode. Mass spectra were acquired over an  $m/z$  range of 600-4,000. Protein digest samples were spotted using the dried droplet technique, onto  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid. MS/MS spectra of selected peptides were acquired in the LIFT mode. Database searches were performed using Mascot (Matrix Science Ltd., London, UK, <http://www.matrixscience.com>). Annotation of the MS/MS spectra was performed manually.

### **Characterization of BMNPs nanoassemblies**

The different BMNPs nanoassemblies were characterized by Nanoparticle Tracking Analyses (NTA) using the properties of both light scattering and Brownian motion to obtain the particle size distribution in liquid suspension. This analysis was performed using a Malvern NanoSight NS500 instrument equipped with a He-Ne laser ( $\lambda = 642$  nm) under a scattering angle of  $100^\circ$  and a sCMOS camera. Video capturing was done with camera level, slider shutter, and slider gain set at 13, 800, and 350, respectively. All samples were diluted 1:1000 and measured at  $25^\circ\text{C}$ . For each sample, 3 video sequences of 30 s with 25 FPS were recorded. Analysis was carried out using NTA 3.0 0064 software. The nanoparticle size distribution diagrams are representative of six consecutive measurements.

$\zeta$ -potential measurements of the nanoassemblies suspended in HEPES buffered saline solution (pH 7.4) were performed by using a Zetasizer Nano ZS. Electrophoretic mobility was then analyzed by application of a 20 V/cm electric field and converted into the zeta potential according to the Helmholtz-Smoluchowski equation.

Zero-field cooling (ZFC) and field cooling (FC) analysis of the different nanoassemblies were performed using a superconducting quantum interference device (SQUID) 5 T magnetometer (Quantum Design MPMS XL, USA). Each sample was lyophilized and placed in a double-walled polycarbonate capsule. Then they were loaded under an argon flow and were immediately cooled, in zero field, to 5 K. After that 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 BMNPs nanoassemblies, the  $M(T)$  curves were normalized by the mass (g) and by their

magnetization value at 300 K, both of each sample. Blocking temperature ( $T_B$ ) was calculated as the maximum magnetization values of the ZFC curves.<sup>[56]</sup>

### **Cell culture**

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), multidrug-resistant human KB-V1 cells and human cervical cancer cells (HeLa) were cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> using endothelial cell growth medium (EGM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium and Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), respectively. All these medium were supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 1% non-essential amino acids. Primary human macrophages were generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), isolated using the buffy-coats (Nycoprep 1.077), of healthy donors (with permission of the Deutsches Rotes Kreuz, Berlin, Germany). After three washing and centrifugation steps using Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free phosphate buffered saline (PBS) containing 2 mM EDTA, monocytes were separated from the PBMCs. Then, monocytes were cultured in complete growth medium (RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin 10% heat-inactivated fetal calf serum and 20 ng/mL MCSF) for six days at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

### **Cellular uptake of the different BMNPs nanoassemblies**

Multidrug-resistant human KB-V1 and HeLa cells (approximately  $10 \times 10^5$  cells/well) were incubated in T25 flasks for 48 h; then 300 µg/mL (comparable concentration to the one used in the cytotoxicity assay) of BMNPs, PC-BMNPs or PC-DOXO-BMNPs) were added. After 5 h incubation, cells were washed three times with sodium cacodylate buffer prior to fixation with 2.5% glutaraldehyde for 1 h. Then samples were washed again three times with sodium cacodylate buffer and embedded in Epon. Ultrathin sections (50–70 nm) were cut parallel to the vertical axis of the cells using a Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), mounted on copper grids and stained with lead citrate and uranyl acetate for transmission electron microscopy (TEM) analysis. Electron energy loss spectra (EELS) and electron spectroscopy imaging (ESI) were used to confirm the BMNPs visualization by iron detection.

### **Cytotoxicity assay in HUVEC, KB-V1 and HeLa cells**

HUVEC, multidrug-resistant human KB-V1 and HeLa cells (approximately  $10 \times 10^3$  cells/well) were incubated in 96-well plates for 24 h; then different concentrations of soluble DOXO, BMNPs, DOXO-BMNPs or PC coupled BMNPs with (PC-DOXO-BMNPs) and without (PC-BMNPs) DOXO were added. Equimolar amounts of DOXO, either soluble or loaded on nanoparticles were used. Also comparable concentrations of BMNPs were evaluated among the different treatments. After a three-day incubation, cell viability was evaluated by the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Briefly, each well was washed three times with PBS and MTT solution (5 mg/mL in PBS) was added. Then, the plate was incubated at 37 °C for 3 h and afterwards supernatants were removed. Finally, isopropanol 0.2 N HCl was added to dissolve the formazan crystals formed and the optical density was measured in a microplate reader (Tecan Infinite M200 Pro) at 570 nm. Viability of parallel cultures of untreated cells was taken as 100% viability and values obtained from treated cells were referred to this value. Experiments were performed 3-5 times using 3 replicates for each sample.

### **Cytotoxicity assay in primary macrophages**

After six days incubation of primary human macrophages at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, different concentrations (1, 10 and 100 µg/mL) of BMNPs, PC-BMNPs 1 h and PC-BMNPs 24 h were incubated with the macrophages for 4 h. Then, necrotic and apoptotic macrophage populations were identified by Propidium Iodide (PI) and Annexin V staining by flow cytometric analysis using a CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter).

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were done using one-way ANOVA test with Bonferroni's post-test for grouped analyses using GraphPad Prism version 4.03 (San Diego, CA). Statistical differences between the treatments were considered significant when p values were  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)

## Conclusions

Protein corona (PC) formation on BMNPs and DOXO-BMNPs through electrostatic or steric interactions was demonstrated. The magnetic properties of the particles were not altered by PC formation. Interestingly, fibrinogen was detected as the main component of the PC in PC-DOXO-BMNPs. Increased fibrinogen adsorption might protect the particles from phagocytosis, thus prolonging circulation time for *in vivo* applications and opens the possibility for future studies to further investigate the effect on chemotherapy resistance *in vivo*. In addition, the adsorption of PC to the BMNPs increased their dispersibility in aqueous solutions, thereby improving their colloidal stability that has favorable consequences for their interaction with biological systems. On one hand, the PC adsorption on the BMNPs surface reduced their cytotoxicity in primary human macrophages and, on the other hand, favored their internalization in KB-V1 and HeLa cell lines. All the DOXO-BMNPs nanoassemblies show a DOXO-specific cytotoxic effect in a dose-dependent manner, which indicates that PC formation does not reduce the DOXO activity. Overall, these data are a proof of concept for future *in vivo* applications, in which an adsorption of PC will occur once the particles are in contact with biological fluids such as plasma.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support from Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) through the NanoMatFutur award (13N12561), the projects CGL2013-46612 and CGL2016-76723 (MINECO, Spain and FEDER) for financial support. For mass spectrometry we would like to acknowledge the assistance of the Core Facility BioSupraMol supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). We also would like to thank CIC personnel of the University of Granada for technical assistance in the TEM.

## References

- (1) Baetke, S.C.; Lammers, T.; Kiessling, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br. J. Radiol.* **2015**, *88* (1054), 20150207.
- (2) Rahman, M.; Laurent, S.; Tawil, N.; Yahia, L. M.; Mahmoudi, M. Nanoparticle and protein corona. Chapter 2 in *Protein-Nanoparticle Interactions*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2013**.
- (3) Miceli, E.; Kar, M.; Calderón, M. Interactions of organic nanoparticles with proteins in physiological conditions. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (23), 4393–4405.
- (4) Miceli, E.; Kuropka, B.; Rosenauer, C.; Blanco, E. R. O.; Theune, L. E.; Kar, M.; Weise, C.; Morsbach, S.; Freund, C.; Calderón, M. Understanding the elusive protein corona of thermoresponsive nanogels. *Nanomedicine (Lond.)* **2018**, *13* (20), 2657–2668.

- (5) Obst, K.; Yealland, G.; Balzus, B.; Miceli, E.; Dimde, M.; Weise, C.; Eravci, M.; Bodmeier, R.; Haag, R.; Calderón M.; Charbaji, N.; Hedtrich, S. Protein corona formation on colloidal polymeric nanoparticles and polymeric nanogels: Impact on cellular uptake, toxicity, immunogenicity, and drug release properties. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (6), 1762–1771.
- (6) Nguyen, V.H. and Lee, B.J. Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 3137–3151.
- (7) Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105* (38), 14265–14270.
- (8) Lundqvist, M.; Stigler, J.; Cedervall, T.; Berggård, T.; Flanagan, M.B.; Lynch, I.; Elia, G.; Dawson, K.. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano* **2011**, *5* (9), 7503–7509.
- (9) Mahmoudi, M.; Lynch, I.; Ejtehadi, M.R.; Monopoli, M.P.; Bombelli, F.B.; Laurent, S. Protein nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (9), 5610-5637.
- (10) Lynch, I. and Dawson, K.A. Protein-Nanoparticle Interactions. *Nano Today* **2008**, *3* (1–2), 40–47.
- (11) Vroman, L.; Adams, A.L.; Fischer, G.C.; Munoz, P.C. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood* **1980**, *55* (1), 156–159.
- (12) Dobson, J. Magnetic micro- and nano-particle-based targeting for drug and gene delivery. *Nanomedicine (Lond.)* **2006**, *1* (1), 31–37.
- (13) Shubayev, V.I.; Pisanic, T.R. 2nd; Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (6), 467–477.
- (14) Sun, J.-B.; Duan, J.-H.; Dai, S.-L.; Ren, J.; Guo, L.; Jiang, W.; Li, Y. Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: Magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, *101* (6), 1313–1320.
- (15) 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* (8), 6279–6296.
- (16) Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36* (13), R167.
- (17) Soares, P.I.; Ferreira, I.M; Igreja, R.A.; Novo, C.M.; Borges, J.P. Application of hyperthermia for cancer treatment: recent patents review. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2012**, *7* (1), 64–73.

- (18) Obaidat, I.M.; Issa, B.; Haik, Y. Magnetic properties of magnetic nanoparticles for efficient hyperthermia. *Nanomaterials (Basel)* **2015**, *5* (1), 63–89.
- (19) Datta, N.R.; Krishnan, S.; Speiser, D.E.; Neufeld, E.; Kuster, N.; Bodis, S.; Hofmann, H. Magnetic nanoparticle-induced hyperthermia with appropriate payloads: Paul Ehrlich's "magic (nano)bullet" for cancer theranostics? *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *50*, 217–227.
- (20) El-Boubbou, K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery. *Nanomedicine (Lond.)* **2018**, *13* (8), 929–952.
- (21) 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.; 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* (12), 5109–5121.
- (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. Char.* **2019**, *36* (6), 1900057.
- (23) 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* (45), 13713–13724.
- (24) Agrawal, P.; Barthwal, S.K.; Barthwal, R. Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (4), 1437–1451.
- (25) Rodríguez-Ruiz, I.; Delgado-López, J.M.; Durán-Olivencia, M.A.; Iafisco, M.; Tampieri, A.; Colangelo, D.; Prat, M.; Gómez-Morales, J. pH-responsive delivery of doxorubicin from citrate-apatite nanocrystals with tailored carbonate content. *Langmuir* **2013**, *29* (26), 8213–8221.
- (26) Rügheimer, L.; Hansell, P.; Wolgast, M. Determination of the charge of the plasma proteins and consequent Donnan equilibrium across the capillary barriers in the rat microvasculature. *Acta Physiol. (Oxf.)* **2008**, *194* (4), 335–339.
- (27) Aggarwal, P.; Hall, J.B.; McLeland, C.B.; Dobrovolskaia, M.A.; McNeil, S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (6), 428–437.
- (28) Cedervall, T.; Lynch, I.; Foy, M.; Berggård, T.; Donnelly, S.C.; Cagney, G.; Linse, S.; Dawson, K.A. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (30), 5754–5756.

- (29) Gessner, A.; Waicz, R.; Lieske, A.; Paulke, B.; Mäder, K.; Müller, R.H. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int. J. Pharm.* **2000**, *196* (2), 245–249.
- (30) Lu, D.Y.; Chen, X.L.; Cao, J.Y.; Li, Z.; Xue, H.W.; Luo, L.J.; Xu, B. Effects of cancer chemotherapy on the blood fibrinogen concentrations of cancer patients. *J. Int. Med. Res.* **2000**, *28* (6), 313–317.
- (31) Zhang, X. and Long, Q. Elevated serum plasma fibrinogen is associated with advanced tumor stage and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Medicine (Baltimore)* **2017**, *96* (17), e6694.
- (32) Yu, X.; Hu, F.; Yao, Q.; Li, C.; Zhang, H.; Xue, Y. Serum fibrinogen levels are positively correlated with advanced tumor stage and poor survival in patients with gastric cancer undergoing gastrectomy: a large cohort retrospective study. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 480.
- (33) Owens, D.E. 3rd and Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307* (1), 93–102.
- (34) Yermolenko, I. S.; Gorkun, O.V.; Fuhrmann, A.; Podolnikova, N.P.; Lishko, V.K.; Oshkadyerov, S.P.; Lord, S.T.; Ros, R.; Ugarova, T.P. The Assembly of Nonadhesive Fibrinogen Matrices Depends on the AC Regions of the Fibrinogen Molecule. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (50), 41979–41990.
- (35) Safiullin, R.; Christenson, W.; Owaynat, H.; Yermolenko, I.S.; Kadirov, M.K.; Ros, R.; Ugarova, T.P. Fibrinogen matrix deposited on the surface of biomaterials acts as a natural anti-adhesive coating. *Biomaterials* **2015**, *67*, 151–159.
- (36) Yermolenko, I.S.; Fuhrmann, A.; Magonov, S.N.; Lishko, V.K.; Oshkadyerov, S.P.; Ros, R.; Ugarova, T.P. Origin of the nonadhesive properties of fibrinogen matrices probed by force spectroscopy. *Langmuir* **2010**, *26* (22), 17269–17277.
- (37) Lishko, V.K.; Burke, T.; Ugarova, T. Antiadhesive effect of fibrinogen: a safeguard for thrombus stability. *Blood* **2007**, *109* (4), 1541–1549.
- (38) Lopez-Moreno, R.; Fernández-Vivas, A.; Valverde-Tercedor, C.; Fortes, A. I. A.; Atienza, S. C.; Rodríguez-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* (4), 1620–1629.
- (39) Monopoli, M.P.; Walczyk, D.; Campbell, A.; Elia, G.; Lynch, I.; Bombelli, F.B.; Dawson, K.A. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (8), 2525–2534.
- (40) Tedja, R.; Lim, M.; Amal, R.; Marquis, C. Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS Nano* **2012**, *6* (5), 4083–4093.

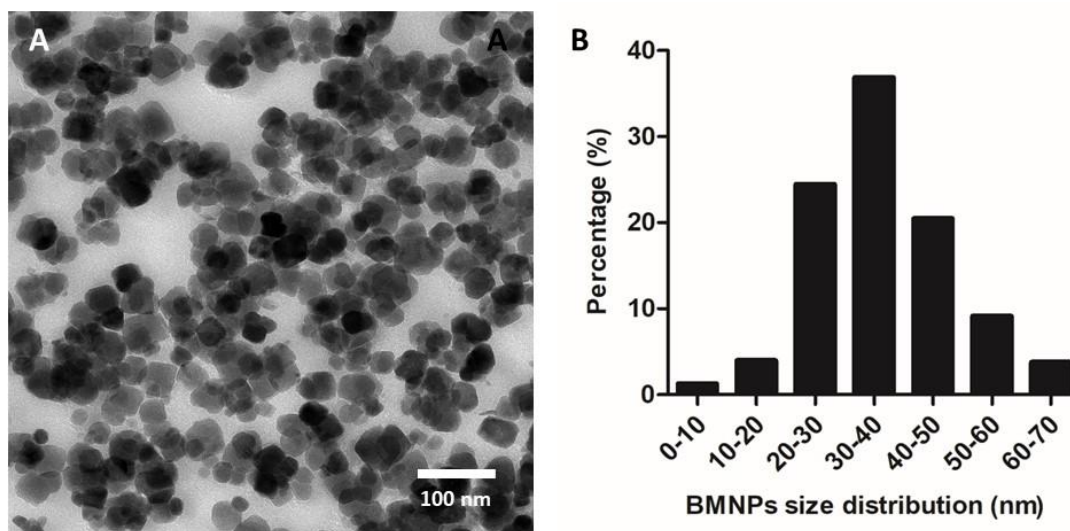


- (41) Wells, M.A.; Abid, A.; Kennedy, I.M.; Barakat, A.I. Serum proteins prevent aggregation of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and ZnO nanoparticles. *Nanotoxicology* **2012**, *6*, 837–846.
- (42) Dominguez-Medina, S.; Blankenburg, J.; Olson, J.; Landes, C.F.; Link, S. Adsorption of a protein monolayer via hydrophobic interactions prevents nanoparticle aggregation under harsh environmental conditions. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2013**, *1* (7), 833–842.
- (43) Zaloga, J.; Janko, C.; Nowak, J.; Matuszak, J.; Knaup, S.; Eberbeck, D.; Tietze, R.; Unterweger, H.; Friedrich, R.P.; Duerr, S.; Heimke-Brinck, R.; Baum, E.; Cicha, I.; Dörje, F.; Odenbach, S.; Lyer, S.; Lee, G.; Alexiou, C. Development of a lauric acid/albumin hybrid iron oxide nanoparticle system with improved biocompatibility. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 4847–4866.
- (44) Moore, T.L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (17), 6287–305.
- (45) Iglesias, G.R.; Jabalera, Y.; Peigneux, A.; Fernández, B.L.C.; Delgado, Á.V.; Jimenez-Lopez, C. Enhancement of magnetic hyperthermia by mixing synthetic inorganic and biomimetic magnetic nanoparticles. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (6), 273.
- (46) Ritz, S.; Schöttler, S.; Kotman, N.; Baier, G.; Musyanovych, A.; Kuharev, J.; Landfester, K.; Schild, H.; Jahn, O.; Tenzer, S.; Mailänder, V. Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (4), 1311–1321.
- (47) Thiele, L.; Diederichs, J.E.; Reszka, R.; Merkle, H.P.; Walter, E. Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells. *Biomaterials* **2003**, *24* (8), 1409–1418.
- (48) Yallapu, M.M.; Chauhan, N.; Othman, S.F.; Khalilzad-Sharghi, V.; Ebeling, M.C.; Khan, S.; Jaggi, M.; Chauhan, S.C. Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **2015**, *46*, 1–12.
- (49) Shi, M.; Ho, K.; Keating, A.; Shoichet, M.S. Doxorubicin-Conjugated Immuno-Nanoparticles for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Adv. Func. Mater.* **2009**, *19* (11), 1689–1696.
- (50) 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* (22), 3834–44.
- (51) Molina, M.; Wedepohl, S.; Miceli, E.; Calderón, M. Overcoming drug resistance with on-demand charged thermoresponsive dendritic nanogels. *Nanomedicine (Lond.)* **2017**, *12* (2), 117–129.
- (52) Wang, F.; Yu, L.; Monopoli, M.P.; Sandin, P.; Mahon, E.; Salvati, A.; Dawson, K.A. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the

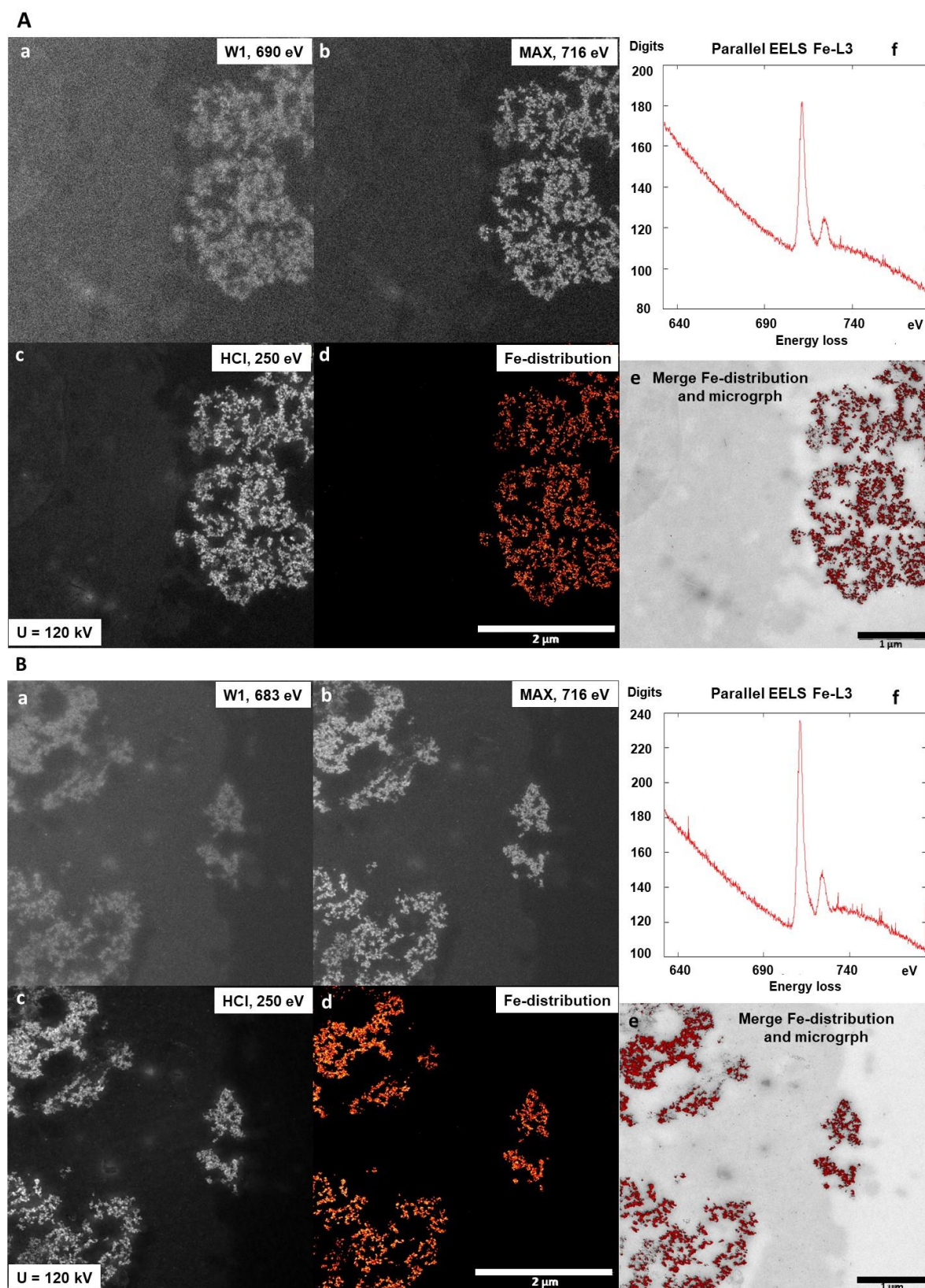
damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine* **2013**, 9 (8), 1159–1168.

- (53) Petri-Fink, A.; Steitz, B.; Finka, A.; Salaklang, J.; Hofmann, H. Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68 (1), 129–37.
- (54) Clift, M.J.; Bhattacharjee, S.; Brown, D.M.; Stone, V. The effects of serum on the toxicity of manufactured nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **2010**, 198 (3), 358–365.
- (55) Ge, C.; Du, J.; Zhao, L.; Wang, L.; Liu, Y.; Li, D.; Yang, Y.; Zhou, R.; Zhao, Y.; Chai, Z.; Chen, C. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, 108 (41), 16968–16973.

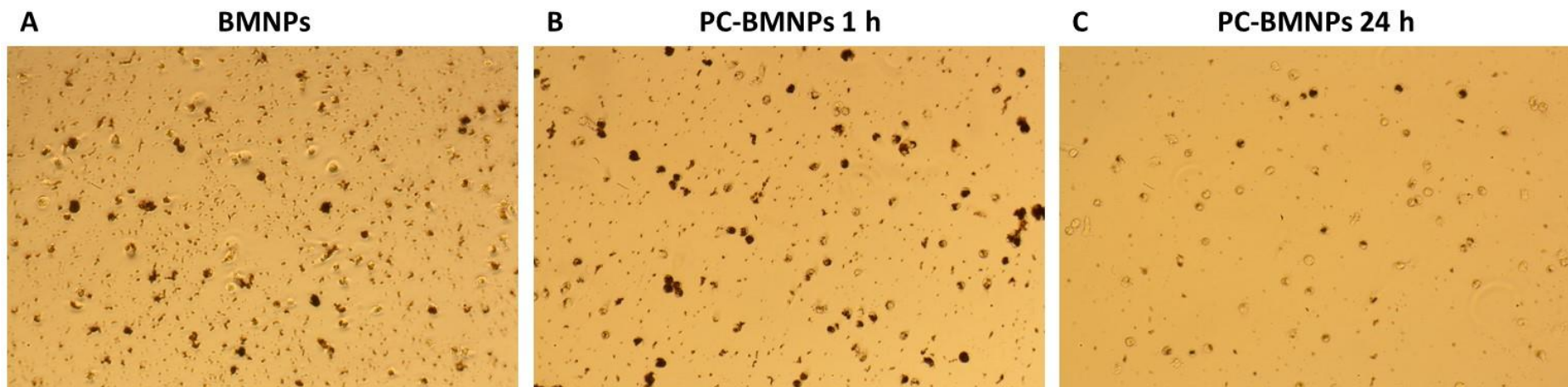
### Supporting information



**Figure S1.** (A) Transmission electron microscopy images of biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs). (B) Size distribution of BMNPs.



**Figure S2.** Elemental mapping by electron spectroscopy imaging – Transmission electron microscopy (ESI-TEM) (a-e) and electron energy loss spectroscopy (EELS) (f) of BMNPs either (**A**) outside or (**B**) inside the cells.



**Figure S3.** Primary human macrophages cultured with (A) BMNPs, (B) PC-BMNPs 1h and (C) PC-BMNPs 24 h after 4 h incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

## Chapter V. *In vivo* magnetic drug targeting and hyperthermia treatment by using biomimetic magnetite nanoparticles

Francesca Oltolina<sup>1†</sup>, Ana Peigneux<sup>2†</sup>, Guillermo R. Iglesias<sup>3</sup>, Annarita D'Urso<sup>1</sup>, Nausicaa Clemente<sup>1</sup>, Donato Colangelo<sup>1</sup>, Guido Valente<sup>4</sup>, Concepción Jimenez-Lopez<sup>2\*</sup>, Maria Prat<sup>1,5\*</sup>

\* Corresponding authors

† Both authors have equally contributed

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale A. Avogadro, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>3</sup>Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>4</sup>Dipartimento di Medicina Traslazionale, Università del Piemonte Orientale A. Avogadro, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy

<sup>5</sup>Centro di Biotecnologie per la Ricerca Medica Applicata (BRMA), Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy. Consorzio Interuniversitario per Biotecnologie, (CIB), Italy. Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Scienza e Tecnologia dei Materiali (INSTM). Via Giuseppe Giusti 9, 50121 Firenze, Italy. Consorzio Interuniversitario di Ricerca in Chimica dei Metalli nei Sistemi Biologici (CIRCMSB). Piazza Umberto I 1, 70121 Bari, Italy.

### Abstract

MamC-mediated biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs) have been recently demonstrated as effective multifunctional doxorubicin (DOXO) nanocarriers that allow a directed chemotherapy, being the release of the DOXO dependent on pH changes and favor by the exposure of the nanoparticles to an alternating magnetic field (AMF). However, the *in vitro* magnetic behavior of these BMNPs and their *in vivo* biocompatibility, magnetic drug targeting, and capacity to produce magnetic hyperthermia still needs to be investigated. In the present work, we demonstrate that these BMNPs are cytocompatible in the presence of a gradient magnetic field (GMF)



while their cellular uptake is increased. In BALB/c mice model, the systemically administration of the BMNPs did not produce any morphological alterations of the major organs, such as liver, spleen, kidney, lung, thus showing a high biocompatibility. When DOXO-BMNPs were intravenously injected in BALB/c mice bearing 4T1 induced mammary carcinomas and a GMF was applied over the tumor, a higher amount of nanoparticles accumulated in the tumor site and tumor growth was significantly inhibited compared to mice injected with DOXO-BMNPs but not treated with the GMF. The injection of DOXO-BMNPs *in situ* in 4T1 tumor bearing BALB/c mice together with the application of an AMF, resulted in a significant tumor weight decrease of ~40% compared to mice only injected with soluble DOXO (~25%). Therefore, these *in vivo* experiments show the suitability of the BMNPs as magnetic nanocarriers for local targeted chemotherapy and might be combined with hyperthermia to increase efficiency.

**Keywords:** biomimetic magnetic nanoparticles; *in vivo* tumour targeting; magnetic field; Doxorubicin; hyperthermia.

## **Introduction**

Nowadays a great transition is taking place in cancer therapy, shifting from systemic treatments with broad-spectrum cytotoxic molecules that lack specificity and, thus, show severe and unwanted side effects,<sup>1,2</sup> to alternative approaches that comprises local targeted therapies.<sup>3</sup> Multifunctional nanoparticles (NPs) have been proposed as an alternative, opening new perspectives in the treatment of targetable diseases like cancer.<sup>4,5</sup> In this context, the development of NPs with stimuli-responsive properties allows the transport of adsorbed or encapsulated drugs to tumor site, where the specific stimuli triggers drug release in that localized area. This reduces systemic toxicity and, consequently, drug side effects. In addition, drug binding to the NP improves its solubility and prolongs circulation time.<sup>6-10</sup> Among NPs, magnetic nanoparticles (MNPs) have emerged as one of the most promising NPs, specially for magnetic drug targeting,<sup>2</sup> as they can be manipulated under the influence of external magnetic fields,<sup>11,12</sup> increasing the controllability of NPs transport and, thus, facilitating their accumulation in a specific site. Moreover, once at the area of interest, the MNPs present the advantage to be able to produce magnetic hyperthermia.<sup>13</sup> The magnetic hyperthermia, on one hand, locally rises the temperature in the tumor microenvironment

to values that selectively induce apoptosis of tumor cells<sup>14</sup> and, on the other hand, the rotation of the particles generated acts as a stimulus capable of triggering the release or activation of therapeutic molecules.<sup>15</sup> However, for the effectiveness of these approaches, the MNPs have to respond, as efficiently as possible, to magnetic fields<sup>12</sup> that guide the NPs to the target site and trigger hyperthermia production. Therefore, for these biomedical applications, the use of superparamagnetic nanoparticles belonging to the single magnetic domain (30-100 nm) is preferred. This is because single magnetic domain particles show the highest coercivity, which remains stable due to a greater energy barrier compared to smaller ones and, thus, the particles are uniformly magnetized.<sup>16,17</sup> In addition, the magnetic behaviour is essential for *in vivo* applications because it ensures no remnant magnetization in the absence of magnetic fields, which reduces particle agglomeration and facilitates their excretion.<sup>18,19</sup> In this regard, MamC-mediated biomimetic magnetic nanoparticles (BMNPs) have been recently proposed as cytocompatible, superparamagnetic nanoparticles of ~35 nm with high blocking temperatures, which is indicative of a larger magnetic moment per particle.<sup>20,21</sup> Moreover, these BMNPs present novel surface properties. Specifically, MamC confers to the BMNPs surface functional groups that allow their coupling at physiological pH to positively charged molecules, such as the chemotherapeutic agent Doxorubicin (DOXO), based on electrostatic interactions. This results in DOXO-BMNPs nanoassemblies that are stable at physiological pH while they are destabilized at acidic pH values, thus releasing the previously coupled DOXO.<sup>22</sup> In addition, this release can be favored under hyperthermia conditions triggered by an AMF.<sup>21</sup> Altogether, the previous *in vitro* data of the DOXO-BMNPs<sup>21,22</sup> show that BMNPs might be effective nanocarriers for a dual local antitumor therapy, based on magnetic drug targeting combined with magnetic hyperthermia, and this study represents their *in vivo* demonstration.

Therefore, for the first time, the *in vivo* biodistribution and biocompatibility of the BMNPs were assessed after intravenous injection in this work. We furthermore investigated the response of the BMNPs to gradient and alternating magnetic fields, with field strengths and frequencies physiologically tolerable, to ensure the optimal magnetic response of the nanoparticles. Finally, the *in vivo* suitability of the DOXO-BMNPs as targeted chemotherapy NPs and as magnetic hyperthermia agents was evaluated.

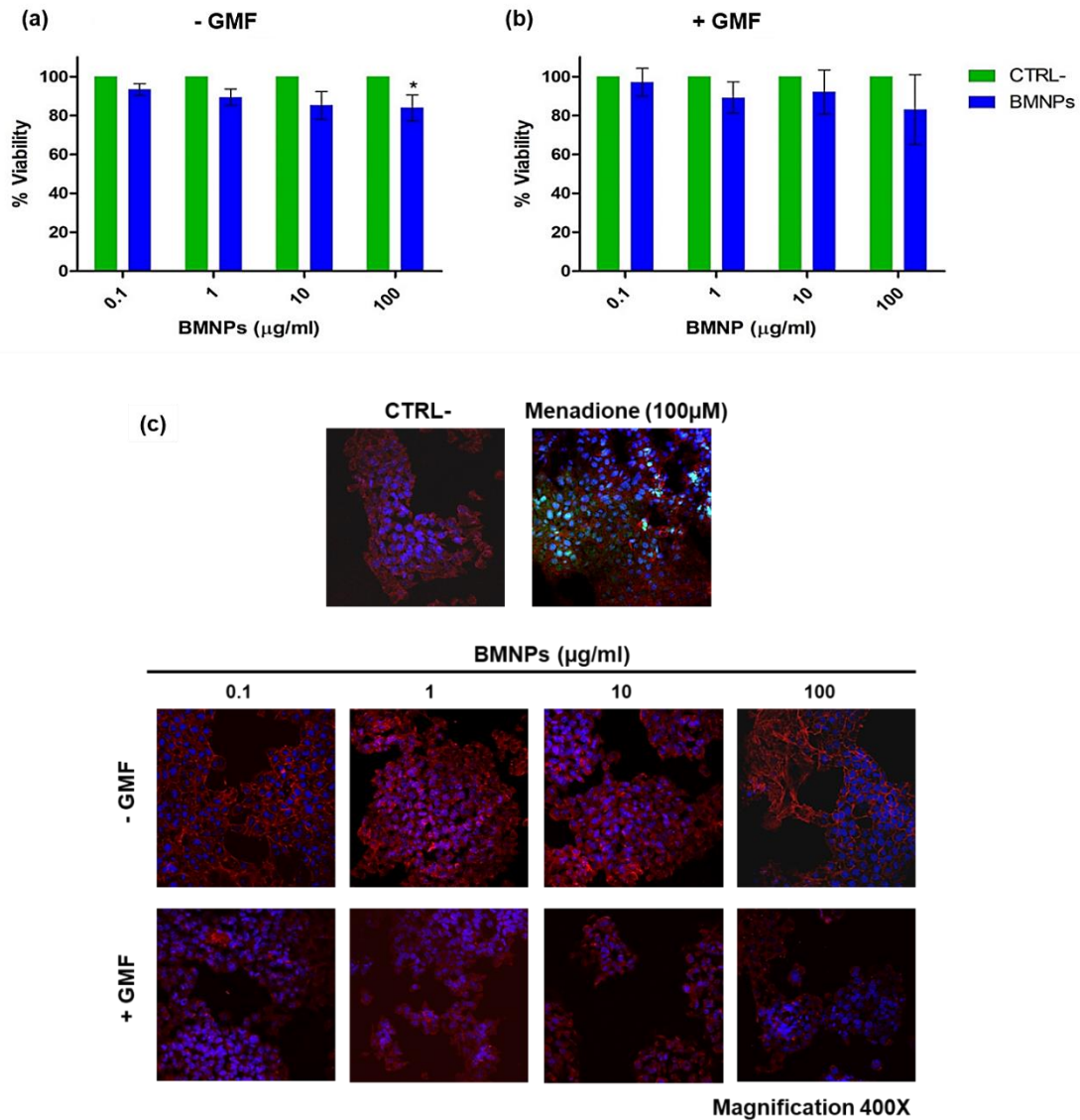
## **Results and discussion**

### ***In vitro* cytocompatibility of BMNPs in the absence/presence of a GMF**

The BMNPs did not display significant toxicity (viability always over 80%) in an MTT assay up to 100  $\mu\text{g/mL}$  concentrations in 4T1 cells (Figure 1a), as already observed in other cells lines.<sup>21,22</sup> Moreover, the same level of cell viability was observed when an external gradient magnetic field was applied by using a neodymium magnet (1.8 kg pull) for 72 h (Figures 1b), confirming its safe use as previously performed in other *in vitro* and *in vivo* studies.<sup>23–25</sup>

The level of reactive oxygen species (ROS) in the cells treated as above was additionally monitored, since the production of these molecules is associated with oxidative stress for the cells. No ROS production was detectable under both conditions either with or without the exposure to a GMF. In cells treated with Menadione (100  $\mu\text{M}$ ), a redox-active quinone that generates superoxides (used as positive control),<sup>26</sup> ROS were detectable as a virtual green color (CellROX® Green Reagent) under confocal microscopy (Figure 1c), thus showing that oxidative stress was induced. Therefore, we can conclude that the BMNPs are cytocompatible (Figure 1) and do not induce oxidative stress in living cells.



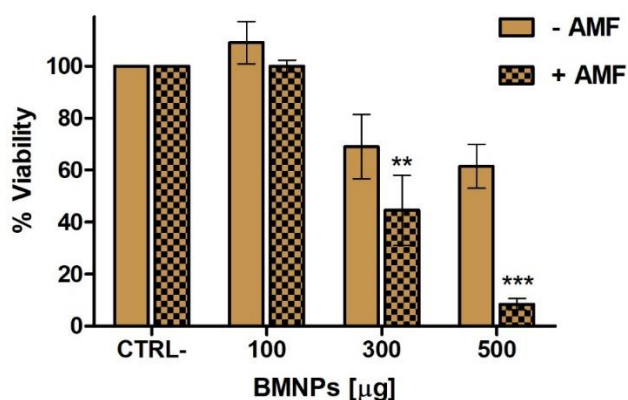


**Figure 1.** (a,b) Cytocompatibility analyzed by MTT assay of the BMNPs (0.1, 1, 10 and 100 µg/mL) on 4T1 cells in the absence/presence of a gradient magnetic field after 72 h. (c) Analysis of potential ROS production in the presence of different concentrations (0.1, 1, 10 and 100 µg/mL) of the BMNPs on 4T1 cells, in the absence/presence of a gradient magnetic field, by confocal microscopy. The release of ROS (green). Menadione (100 µM) was used as a positive control. Fixed and permeabilized cells were stained for cytoskeletal actin with TRITC-phalloidin (red) and nuclei with TO-PRO3 (blue).

#### ***In vitro* cytotoxicity of BMNPs under the influence of an AMF**

The viability of cells subjected to an AMF of 130 kHz and  $18 \text{ kAm}^{-1}$  was also analyzed. In this case, 4T1 cells ( $10^6$ ) were resuspended in 0.15 mL tubes together with BMNPs at different concentrations and positioned inside the coil of the instrument for

20 min. An aliquot containing  $10^4$  cells was then recovered and plated, and their viability was analyzed in an MTT assay, which was read the following day. Cells were fully viable when incubated with 100  $\mu\text{g}$  of BMNPs, both in presence or absence of the AMF, as this BMNPs concentration was not high enough to generate heat by their rotation (Figure 2). On the other hand, by increasing the amount of BMNPs, in the presence of the AMF, cell viability was significantly affected in dose-dependent relationship, being decreased to only 8.4% at 500  $\mu\text{g}$  of BMNPs. The same amount of BMNPs, which was required to exert high cytotoxicity by hyperthermia, reduced cell viability only to 60% in the samples incubated with BMNPs but not exposed to the AMF.

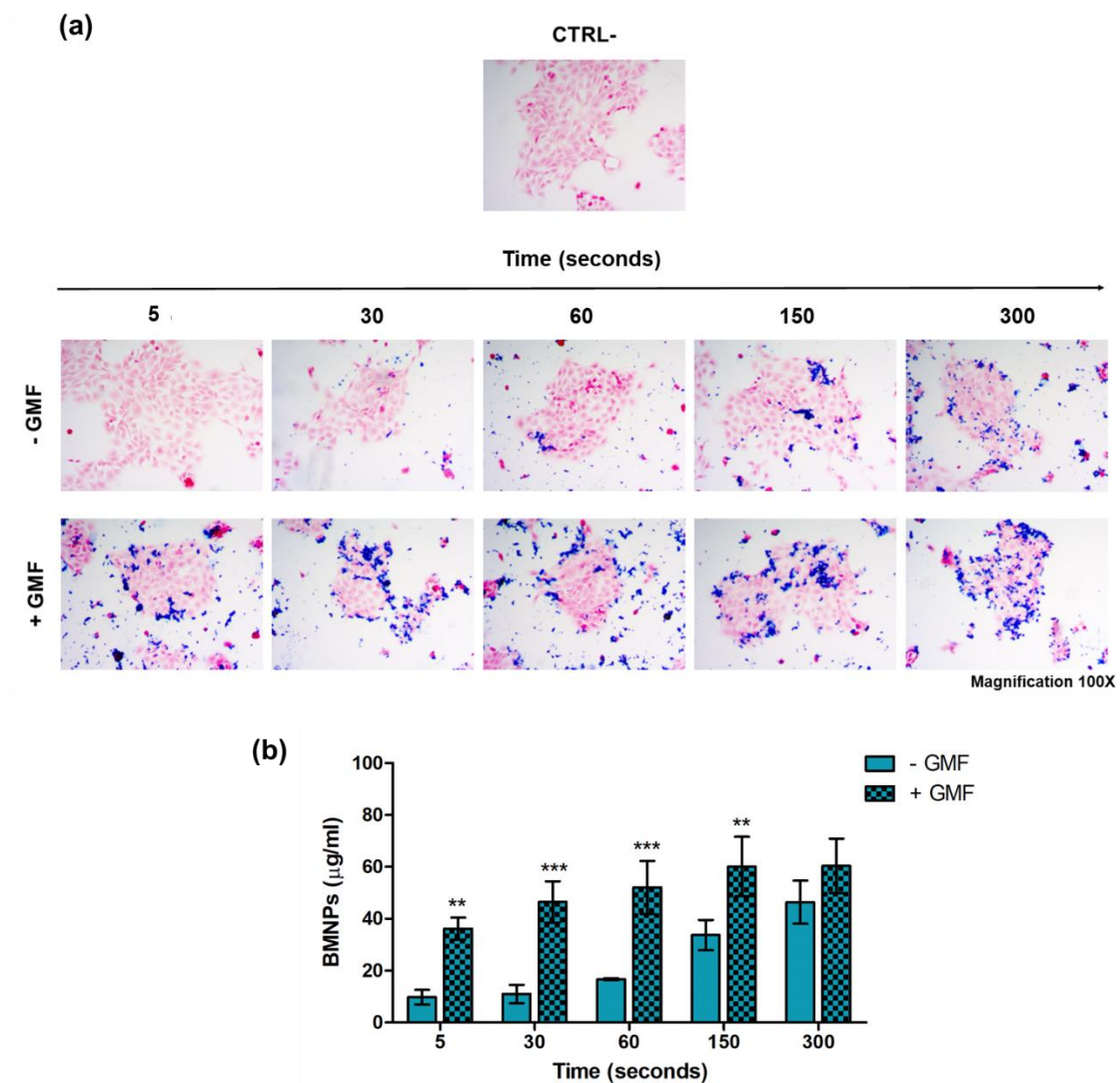


**Figure 2.** Cytocompatibility/cytotoxicity of BMNPs (100, 300, 500  $\mu\text{g}$ ) on 4T1 cells in the absence/presence of an alternating magnetic field after 20 min.

### Cellular interaction of BMNPs and DOXO-BMNPs in the absence/presence of a GMF

The interaction of the BMNPs with cells in the presence/absence of a GMF is shown in Figure 3. Cells plated on coverslips were incubated for different periods of time with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BMNPs in the presence or absence of a magnetic field, fixed, washed and stained with Prussian blue (Figure 3a). In the treatment without the magnetic field, BMNPs are detectable only and at a very low level after 1 min incubation, while in the case of the application of the magnetic field they are clearly visible already from 5 seconds, the first time analyzed. In both cases more BMNPs are detectable with increasing time of incubation, but there was always a significant difference between samples treated or not with the magnetic plate and indeed at 5 min without the application of the magnetic field there were fewer BMNPs than in samples

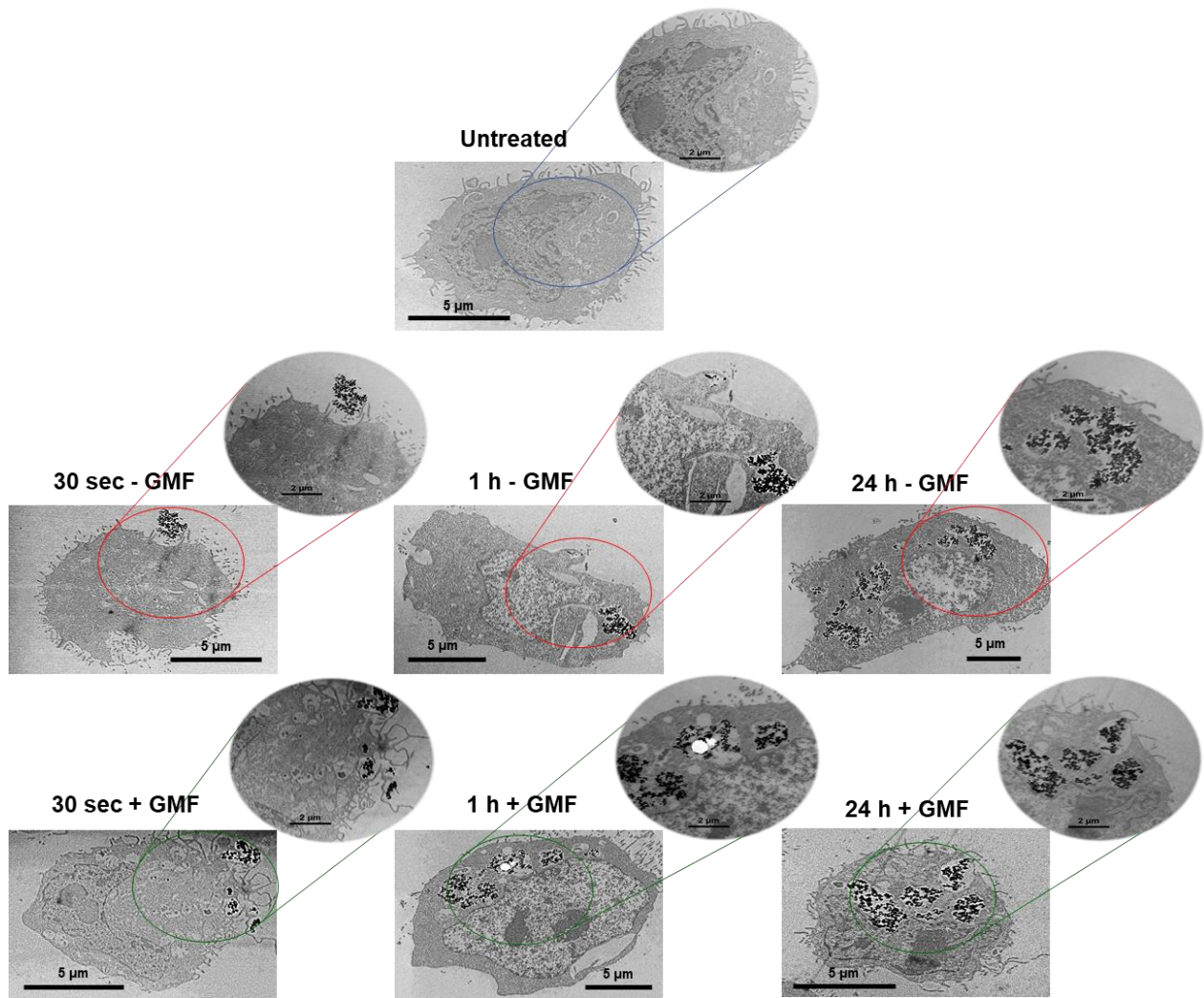
treated for 5 second with the magnet. Iron quantification experiments were carried out by potassium thiocyanate on samples treated as before (Figure 3b). In the absence of the magnetic plate, low concentrations of iron were detected until 1 min incubation, and increases up to 46  $\mu\text{g/mL}$  after 5 min. When cells were treated with the magnetic plate, a faster particle-cell interaction/internalization was detected. A significant amount of iron was associated with the cells from the very first time (36.2  $\mu\text{g/mL}$  at 5 second) and iron continued to be accumulated in time-dependent way, until stabilization (60  $\mu\text{g/mL}$ ) after 150 seconds.



**Figure 3.** (a) Qualitative (Prussian blue) and (b) quantitative (potassium thiocyanide) analyses of the interaction of BMNPs (100  $\mu\text{g/mL}$ ) with 4T1 cells at different times (5 and 30 seconds, 1, 2.5 and 5 minutes) in absence (- GMF) and presence (+ GMF) of a gradient magnetic field. Untreated cells were used as negative control (CTRL-).

The interaction of BMNPs with cells was also analyzed by TEM at different time points (Figure 4) and by energy dispersive X-ray (EDX) (Figure 5) that identify the BMNPs through iron detection. In agreement with the data of optical microscopy after 30 seconds, only few BMNPs were detected around the cell surface when cells are not subjected to the magnetic field. Otherwise, some BMNPs appear to interact with the cell membrane and even be internalized if cells undergo the treatment with the magnetic field (Figure 4). In contrast, Prijic *et al.* (2010)<sup>25</sup> did not observe statistically differences up to 30 seconds. Although superparamagnetic, the NPs used in that study have sizes of 8–9 nm, which show lower magnetic response than larger ones in the range of single magnetic domain, coated with a 2-nm-thick layer of silica that also affects the magnetic behavior.

At 24 h the concentration of particles internalized was comparable between the samples in the absence and presence of the magnetic field (Figure 4). These results are in accordance with Prussian blue analysis and iron quantification, in which a higher cell-particles interaction is observed at short periods of time, up to 2.5 min. Altogether these data show that BMNPs are highly responsive to a GMF *in vitro*, which allows a faster cellular interaction (Figure 3) and uptake (Figure 4). The faster internalization of BMNPs treated with a gradient magnetic field is in good agreement as reported by other authors<sup>27–29</sup> in different cell lines, which also present enlarged endosomes where MNPs were accumulated in high amounts, without affecting cell viability.



**Figure 4.** TEM micrographs of 4T1 cells incubated with the 100 μg/mL of BMNPs in the absence/presence of a gradient magnetic field for 30 seconds, 1 and 24 h. The micrographs are representative of alternate serial cuts of the cell pellets of each sample.

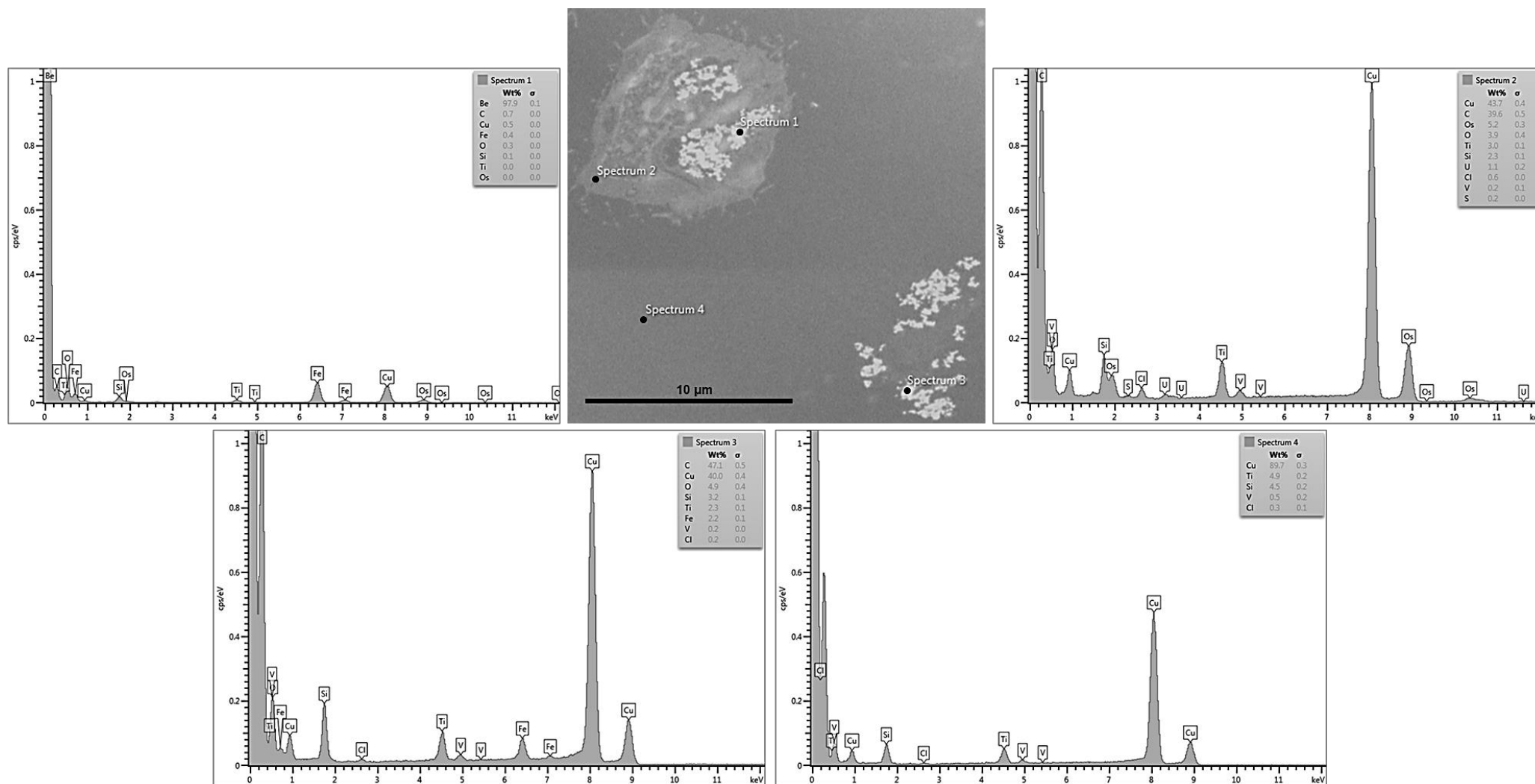
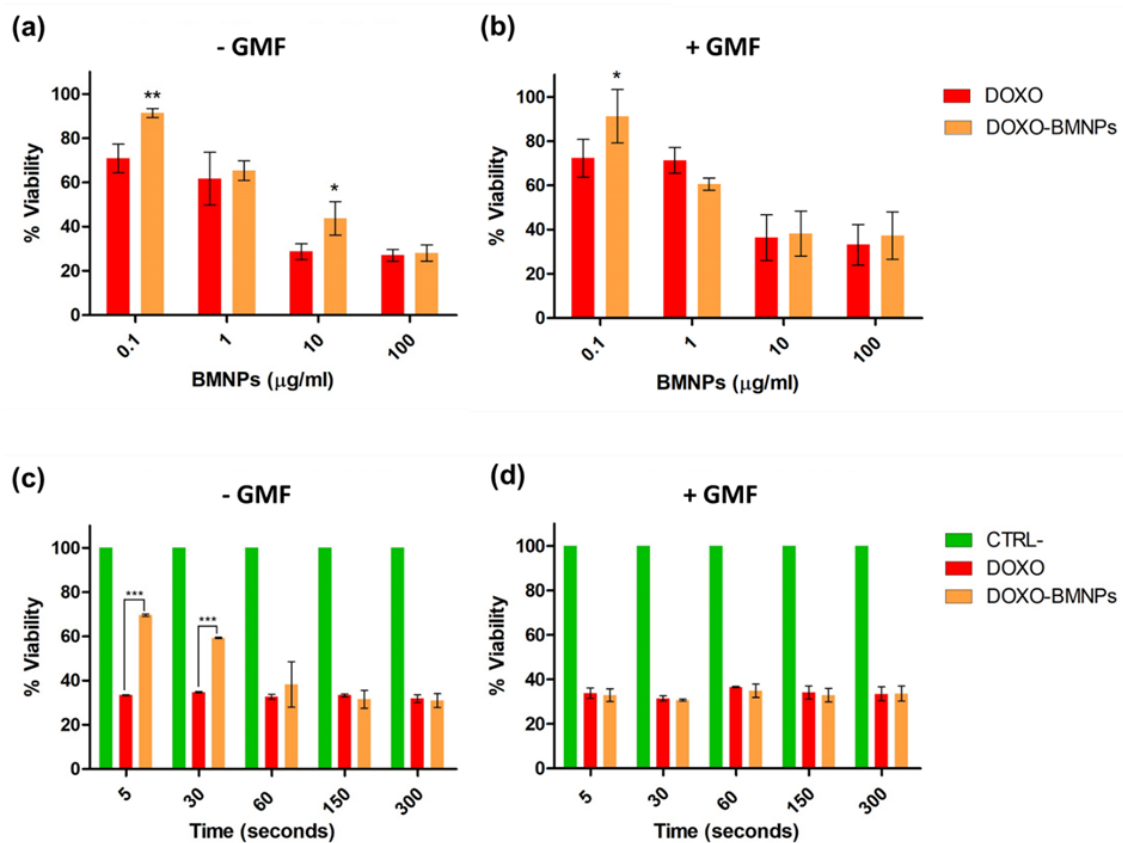


Figure 5. Microanalysis by energy dispersive X-ray (EDX) spectroscopy of 4T1 cells incubated with the 100 µg/mL of BMNPs.



***In vitro* cytotoxicity of DOXO-BMNPs in the absence/presence of a GMF**

Cells were incubated with different concentrations (0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) of DOXO-BMNPs for 72 h in the presence or absence of the magnetic plate and cytotoxicity was evaluated in an MTT assay. At all the concentrations tested, no differences in cytotoxicity in the presence or in the absence of the magnetic field were observed (Figure 6a, b). This is reasonable since the effect of the magnetic field in the interaction with the cells was only observed in short periods of time, as observed after Prussian blue staining. Therefore, to evaluate potential differences between the cytotoxicity in the samples treated and not with the magnetic field, shorter time points (5, 30, 60, 150, and 300 seconds) and the highest BMNPs concentration (100  $\mu\text{g/mL}$ ) were used (Figure 6c, d). After magnetic treatment, the medium and the BMNPs were removed and incubation with fresh media was continued for 72 h before an MTT assay was carried out. In the presence of the magnetic field at the time points of 5 and 30 seconds, the cytotoxicity exerted by the DOXO-BMNPs is exactly the same as the one induced by the soluble DOXO, while in the absence of the magnetic field DOXO-BMNPs exert a lower toxicity compared to soluble DOXO at the first two time points (Figure 6c, d). Thus, the treatment with the magnetic field concentrated the BMNPs at close contact with the cells or even promoted internalization, as already checked by Prussian blue (Figure 3) and TEM (Figure 4) analyses, so that DOXO was readily available to exert toxicity.

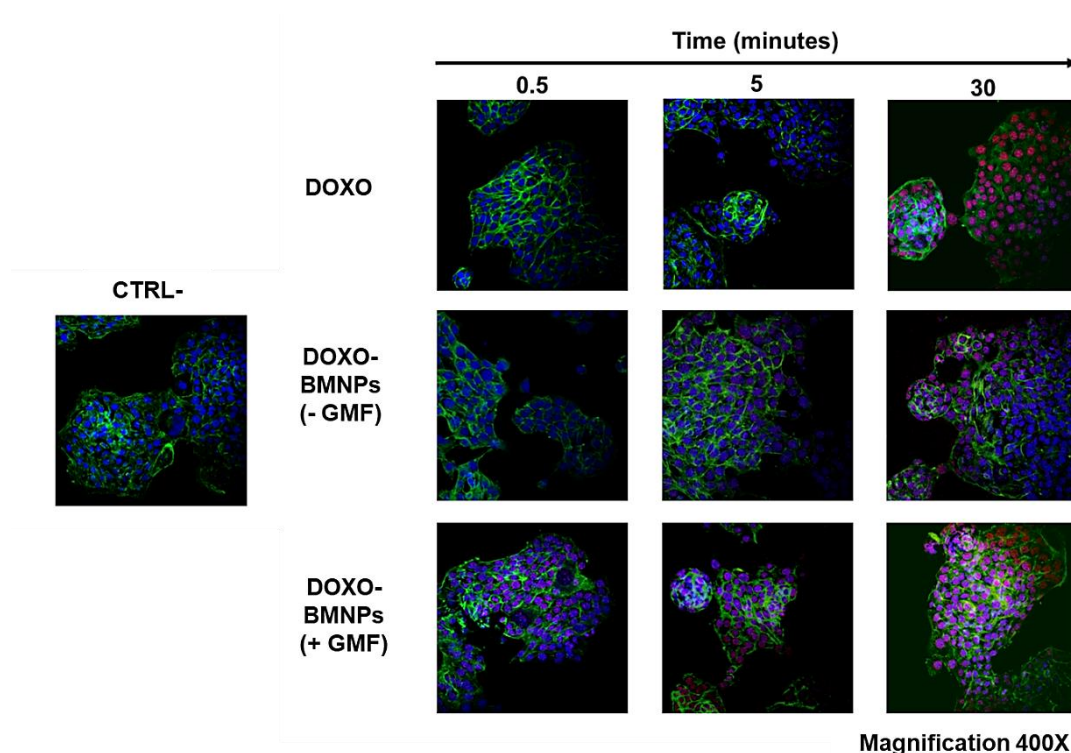


**Figure 6.** Cytotoxic activity analyzed by MTT assay of DOXO-BMNPs and soluble DOXO (as a positive control) on 4T1 cells in the absence/presence of a gradient magnetic field. The cytotoxicity was analyzed (a, b) as a function of the DOXO concentration (0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{g/mL}$ ), and (c,d) as a function of the time (5, 30, 60, 150 and 300 seconds). In all the experiments untreated cells (CTRL-), receiving medium without nanoparticles, were taken as reference value (100%) of viable cells to which refer the values of treated cells. Data are the average of 3 experiments performed in triplicates.

When the internalization of soluble DOXO and of DOXO coupled to BMNPs was analyzed by confocal microscopy, DOXO signal increased over time in all tested samples (Figure 7). However, interestingly, the internalization of DOXO in the cell nuclei was already detected at 0.5 and 5 minutes in the DOXO-BMNPs treated with the magnetic field, while it was detected only after 5 min in the case of soluble DOXO and at neither times when DOXO-BMNPs were incubated in the absence of the magnetic plate (Figure 7). In this case the DOXO signal of the functionalized BMNPs was detectable only after 30 minutes of incubation and its intensity was lower. Therefore, the magnetic field treatment accelerated the DOXO uptake from the BMNPs and their



nuclear accumulation. These results are also directly related to a faster cytotoxic activity of DOXO-BMNPs under the influence of a GMF for short periods of time, as analyzed by MTT assay (Figure 6c, d).



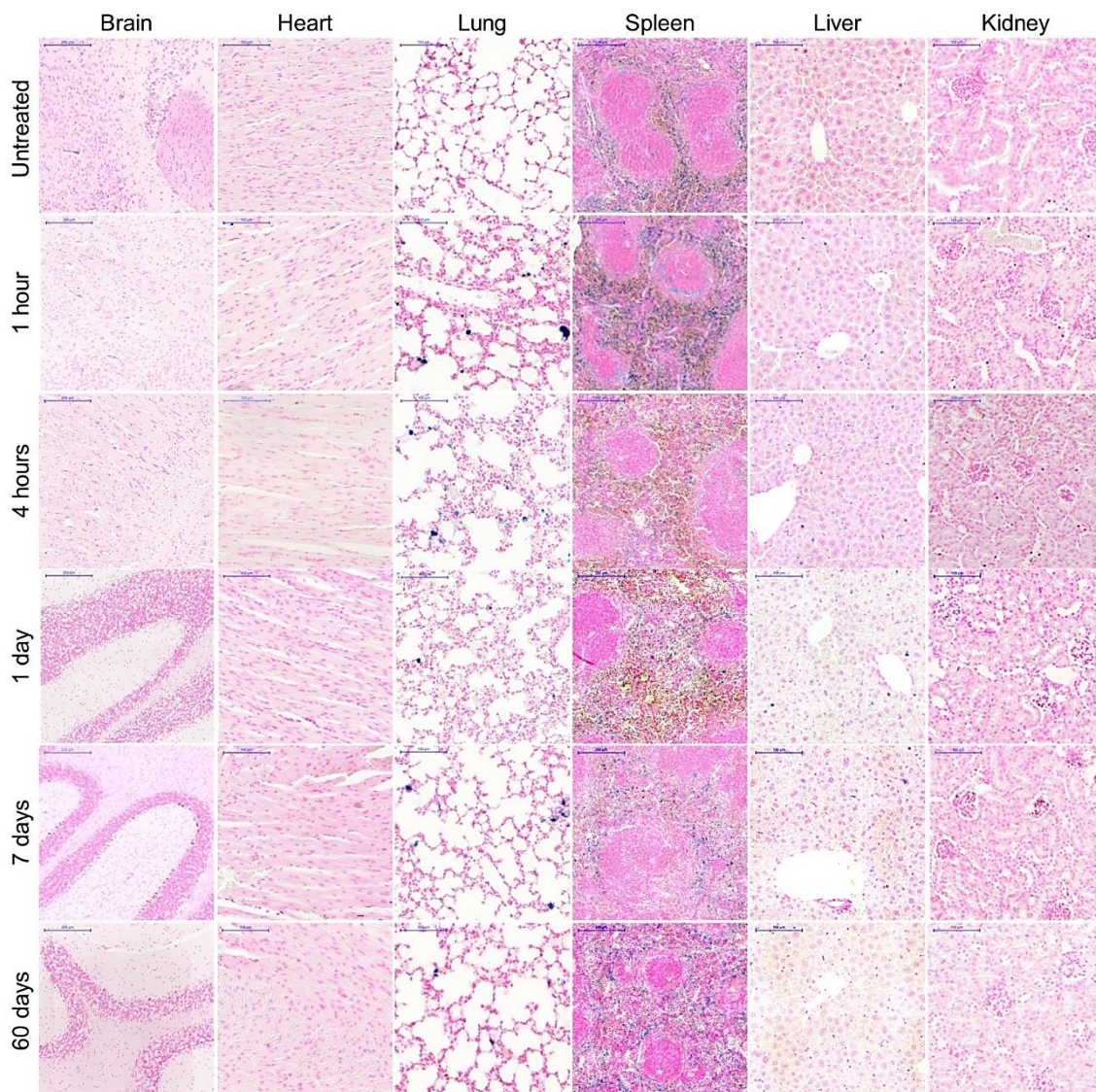
**Figure 7.** Analysis of the interaction of DOXO-BMNPs with 4T1 cells at different times (0.5, 5 and 30 minutes) in the absence (- GMF) and presence (+ GMF) of a gradient magnetic field by confocal microscopy. Soluble DOXO was used as a positive control. Fixed and permeabilized cells were stained for cytoskeletal actin with FITC-phalloidin (green), for nuclei with TO-PRO3 (blue). DOXO was detectable for its intrinsic fluorescence in red.

### ***In vivo* biocompatibility and nanoparticles biodistribution**

All mice injected with BMNPs were found to be alive and in good shape for at least 60 days, the latest time point checked. Sections of brain, heart, lung, spleen, liver and kidney prepared from animals 1, 4 h, 1, 7, 60 days after BMNPs injection do not show any morphological alterations compared to the ones of a control mouse (Figure 8). In the case of spleen, while the specimens from untreated control animals were positive for the Prussian blue staining - because of their endogenous iron deposits - such a staining was undetectable 4 h and 1 day after BMNP injection, but it was resumed 1 week after, if not before. Moreover, BMNPs are not retained in the different organs, with the exception of a low amount in the lungs and in the liver (Figure 8). Other

authors also detected magnetic nanoparticles in spleen, liver, and lungs<sup>30-33</sup> after their intravenous administration, due to the vascularized nature of these organs, but without associated toxicity. Moreover, these organs are part of the reticuloendothelial system (RES), where many different nanoparticles of the BMNPs size range accumulated because they are phagocytosed by macrophages through adsorption of opsonins.<sup>32,34-36</sup>

All together these data confirm the full biocompatibility of BMNPs up to 10  $\mu\text{g}$ , in agreement with the *in vitro* data (Figures 1) and the previously reported.<sup>21,22</sup> In fact, Kim *et al.* (2006)<sup>37</sup> demonstrated that doses of up to 100 mg/kg of MNPs, within the range of 50 nm, are not toxic after circulation for a month.



**Figure 8.** Biodistribution profile of BMNPs after intravenous tail-vein administration (10  $\mu\text{g/g}$  mouse body weight) in BALB/c mice (n = 3) grouped into 5 groups differing



on the time in which were euthanized (1, 4 h, 1, 7, and 60 days). Untreated mice were taken as reference samples.

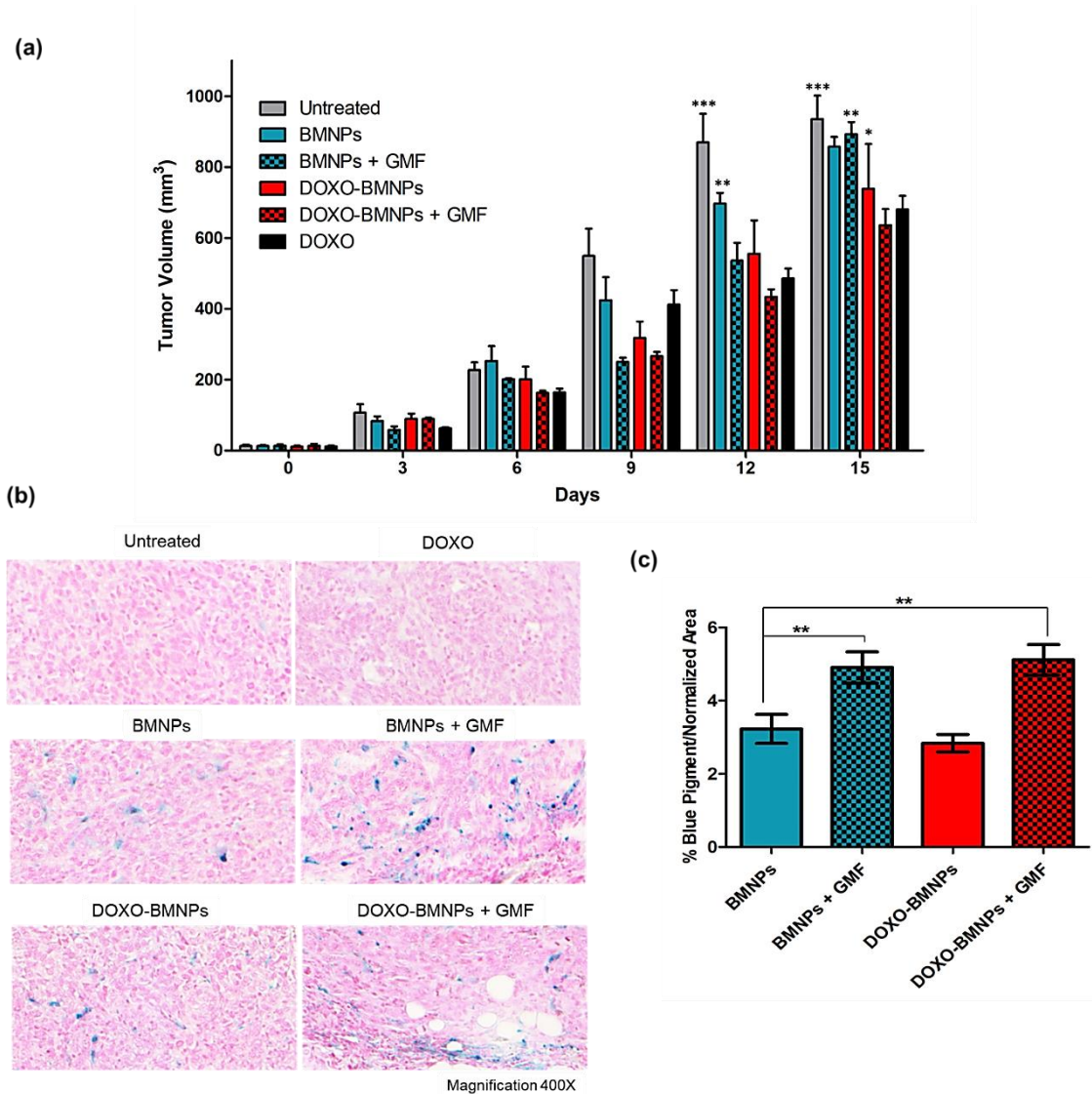
### **Effects of GMF and AMF *in vivo* on tumors**

The 4T1 murine breast carcinoma cells (ATCC® CRL-2539™) were injected into the fat pad of mammary gland of BALB/c mice because their tumor growth and metastatic spread mimick very closely the stage IV of human breast cancer.

In the first *in vivo* experiment, a GMF was applied or not for 1 h to 4T1 cells-induced tumors, after the i.v. injection of the BMNPs, DOXO-BMNPs or soluble DOXO (2 mg/kg mouse). The treatments were repeated 5 times, every 3-4 days and each time tumor sizes were evaluated and compared to untreated control animals receiving only PBS. Up to day 6 (measured just before the second injection) no differences between the groups receiving the different treatments were observed (Figure 9a). From day 9 to day 12, the apposition of a GMF coin on the tumors of animals receiving either pristine or DOXO-coupled BMNPs inhibited their growth at a higher level when compared to mice not subjected to magnetic field treatment. At the end of the experiment (day 15) tumor volumes were significantly reduced only in the groups of mice receiving DOXO. In particular, the highest percentage of inhibition was observed in mice receiving the combined treatment of DOXO-BMNPs and apposition of GMF coin (32%), in comparison to animals receiving only DOXO-BMNPs (21%) or soluble DOXO (27%) (Figure 9a). At the last day of the experiment, mice were sacrificed, their tumors excised, fixed and histological sections were stained with Prussian blue to analyze and quantify the iron content. As expected, sections from tumors in animals, which underwent magnetic field treatment, displayed a higher content of the blue pigment revealing iron, which was similar in the two cases of BMNPs or DOXO-BMNPs (Figure 9b, c). This is in line with Cheng *et al.* (2012)<sup>38</sup> findings, which demonstrated that intravenous injected MNPs accumulate approximately 8 times greater in the tumor site when a magnetic field is applied.

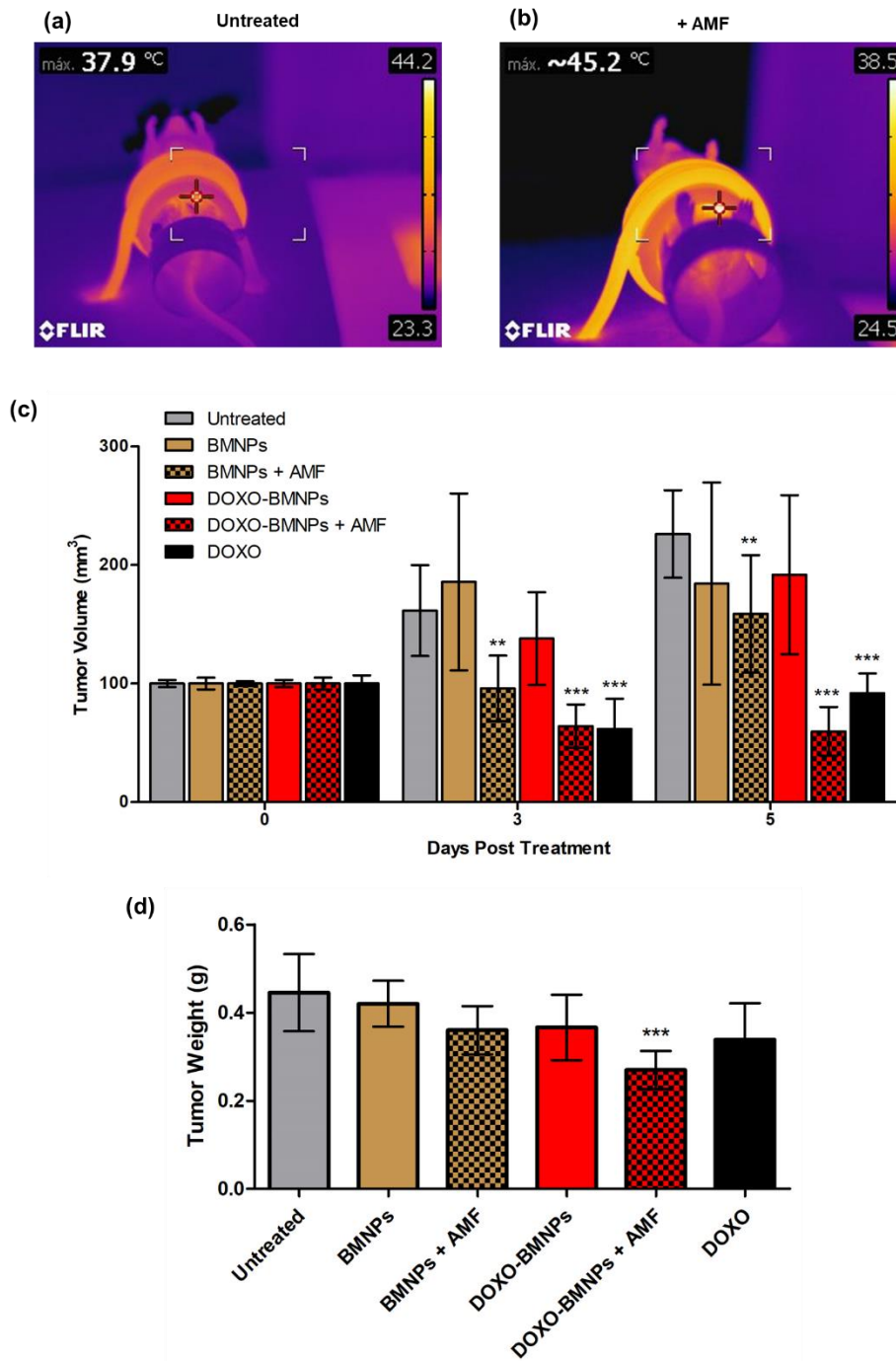
On the other hand, these results suggest that the DOXO adsorbed onto the BMNPs did not interfere with the magnetic field, as previous demonstrated by SQUID analysis.<sup>21</sup> This means that the magnetic field can direct the BMNPs/DOXO-BMNPs to a specific organ/tumor for drug delivery or hyperthermia treatment (once arrived at the tumor site). This targeted treatment potentially reduces the side effect of the drug on the healthy cells in the rest of the body, thus favoring the accumulation of nanoparticles in

the tumor site and of the coupled DOXO, which could exert its toxic effect. In this context, a large number of studies have been produced with the aim of achieving a high concentration of drug in the affected area with a rapid response time and minimal side effects through the application of the magnetic field, including the administration of drugs to tumors of lung,<sup>39</sup> prostate,<sup>40</sup> brain,<sup>41</sup> melanoma,<sup>42</sup> breast,<sup>43,44</sup> and liver.<sup>45,46</sup>



**Figure 9.** (a) Antitumor effect of DOXO-BMNPs or BMNPs +/- gradient magnetic field application on the growth of 4T1 tumors in female BALB/c mice (n = 5). Each treatment was administered intravenously 5 times, every 3-4 days, at a dose of 2 mg DOXO/kg mouse body weight or comparable amounts of BMNPs (15 µg BMNPs/kg body weight). (b) Tumor biodistribution profiles (Prussian blue staining) and (b) particles quantification in the tumor site performed for the different treatments at the end (day 15) of the experiment.

When an AMF was applied *in vivo*, hyperthermia production was observed only in the mice injected with the nanoparticles (Figure 10a, b). Tumor temperature rose rapidly and was maintained at 42–45°C for 20 minutes in the presence of the AMF. This increase of temperature had an effect in reducing the tumor size since the first measurement (3 days) post injection (Figure 10c, d). This could be explained because the heat generated by the BMNPs in contact with the plasma membrane, both internally and externally, can alter the structure of the membrane directly and produce cellular necrosis in a fast way.<sup>47</sup> Moreover, above 42 °C tumor vessels can collapse, trapping the heat applied and resulting in necrosis or apoptosis.<sup>48</sup> When the hyperthermia generated by the BMNPs is combined with the cytotoxicity of DOXO, i.e. DOXO-BMNPs + AMF, a synergistic effect was observed, reducing the tumor at higher levels compared to BMNPs + AMF or DOXO-BMNPs, and at the same levels as soluble DOXO (Figure 10c). Moreover, 5 days post injection, the only group with a statistically significant reduction in tumor weight is the one that combined AMF + DOXO, decreasing tumor weight by almost half (0.27 g) compared to the ones in the untreated control group (0.45 g) (Figure 10d). This is because the magnetic hyperthermia not only increases the local temperature, but also produces particles rotation as a stimulus capable of triggering the release of DOXO from the BMNPs, as already demonstrated *in vitro*.<sup>21,49</sup> In addition, some authors<sup>50,51</sup> demonstrated that temperature rise can make tumor cells more sensitive to the therapeutic molecules.



**Figure 10.** *In vivo* hyperthermia under an alternating magnetic field. Images taken with a thermal camera of (a) the untreated and (b) the treated with the alternating magnetic field groups. (b,d) Antitumor effect of DOXO-BMNPs or not functionalized BMNPs +/- alternating magnetic field (hyperthermia) application on the growth of 4T1 tumors in female BALB/c mice (n = 6). Each group received one intratumor injection of 3 mg BMNPs/mouse the first day of the treatment. For the groups injected with soluble DOXO or DOXO-BMNPs, the dose of DOXO (either soluble or adsorbed on the BMNPs) was 80 µg/mouse.

## **Experimental section**

### **BMNPs synthesis**

MamC protein was heterologous expressed in *E. coli* TOP10 competent and purified by and affinity chromatography in denatured conditions and refolded by serial dialysis steps. Then, the BMNPs were synthesized, in anaerobic conditions, by adding 10 µg/mL of this protein in coprecipitation magnetite *in vitro* reactions, composed by deoxygenated solutions of 2.78 mM Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5.56 mM FeCl<sub>3</sub>, 3.5 mM/3.5 mM NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.<sup>20</sup>

### **Functionalization of the BMNPs produced in presence of MamC protein**

BMNPs were functionalized with doxorubicin (DOXO-BMNPs) following the same procedure carried out in Peigneux *et al.* (2019)<sup>21</sup>. Briefly, 5 mg of BMNPs were mixed with 1 mg/mL of DOXO dissolved in water inside hermetic closed bottles to avoid magnetite oxidation. Mixtures were maintained at 25 °C under shaking (200 rpm) for 24 h. Then the DOXO content was assessed by UV-Vis spectroscopy ( $\lambda = 490$ ), indicative of the concentration of the molecule by comparison to a standard curve. The amount of the adsorbed DOXO was calculated from the differences between the concentration of the molecule in the supernatant before and after the adsorption on the BMNPs. The solid components were washed 5 times with HEPES buffered saline solution (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl) until the absorbance was less than 0.02 units at 490 nm (equivalent to a negligible amount) using a magnet. Then the functionalized nanoparticles were resuspended in HEPES buffered saline solution and kept at 4°C until further use.

### **Cell culture preparation**

The 4T1 murine breast carcinoma cell line derived from BALB/c mice (ATCC® CRL-2539™) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50 U/mL penicillin, and 50 µg streptomycin. Cells were transplanted twice a week, when they were at 90-95% confluence.

## **Cellular interaction of the BMNPs and DOXO-BMNPs in the absence/presence of a gradient magnetic field**

### ***Prussian blue staining***

Cells (approximately  $20 \times 10^3$  4T1/well) were seeded on glass coverslips in 24-well plates and, after 24 h, 100  $\mu\text{g/mL}$  BMNPs suspensions were added. After the incubation at 37 °C for short (5 and 30 seconds) and longer (1, 2.5, and 5 minutes) periods of time in the absence (- GMF) and the presence (+ GMF) of a gradient magnetic field, coverslips were washed with fresh Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2 and fixed with paraformaldehyde (2 wt% in PBS). Then Prussian blue solution (1:1 of 2% potassium ferrocyanide in  $\text{H}_2\text{O}$  and 2% HCl both in  $\text{H}_2\text{O}$ ) was added to the coverslips. In that way any ferric ion (+3) present in the samples combines with the ferrocyanide and results in the formation of bright blue pigments called Prussian blue or ferric ferrocyanide. After two other washes with fresh PBS, Nuclear Fast Red was added for staining cell nuclei. Finally, coverslips were washed with  $\text{H}_2\text{O}$  and mounted on slides by using one drop of Eukitt quick-hardening mounting medium for each sample. The interaction of the stained BMNPs with cells was analyzed by optical microscopy at 100X.

### ***Iron quantification by potassium thiocyanide***

Cells (approximately  $22 \times 10^4$  4T1/well) were seeded in 6-well plates and, after 24 h incubation at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  BMNPs suspensions in DMEM medium were added. After their incubation for 5, 30, 60, 150, and 300 seconds in the presence and absence of a gradient magnetic field, the supernatant was removed, cells were washed with fresh PBS, trypsinized, transferred to 0.5 mL tubes and centrifuged at 1000 for 5 min. Then, the cell pellets formed were dissolved in 37% HCl, mixed with 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and incubated for 20 min at room temperature. After the incubation time, the samples were colorized with 1 mL of 1% potassium thiocyanide in MilliQ water, and their absorbance was measured at 490 nm. The concentration of ferric ions, i.e. the BMNPs, was calculated referencing the absorbance obtained to a standard curve performed with the BMNPs alone. The endogenous iron of the cells was subtracted from the treated samples normalizing by the untreated control cells.



### ***Confocal analysis***

Cells (approximately  $20 \times 10^3$  4T1/well) were seeded on glass coverslips in 24-well plates and, after 24 h, soluble DOXO (as a positive control) or DOXO-BMNPs suspensions were added. After incubation at 37 °C for different periods of time (30 seconds, 5 and 30 minutes) in the absence (- GMF) and the presence (+ GMF) of a gradient magnetic field, coverslips were washed with fresh PBS pH 7.2 and fixed with paraformaldehyde (2% wt in PBS). To minimize unspecific interactions and permeabilize cells, coverslips were washed with Tris-Buffered Saline (TBS) containing 5% Bovine Serum Albumin (BSA), 0.1% Triton X-100 and 5% goat serum and then stained. In particular cytoskeletal actin microfilaments were stained with FITC-phalloidin (Sigma-Aldrich, excitation at 488 nm; emission at 500-535 nm) and nuclei with TO-PRO-3 (1/70, Life Technologies; excitation at 633 nm; emission at 650-750 nm). DOXO was detected after excitation at 476 nm and emission at 575-630 nm. Fluorescence was detected using a Leica TCS SP2 AOBS Spectral Confocal Scanner microscope. Images were taken at 400X magnification. ImageJ software was used for analysis.

### **Cellular internalization of BMNPs in the absence/presence of a gradient magnetic field**

Cells (approximately  $10 \times 10^5$  4T1/well) were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Afterwards, 100 µg/mL of BMNPs were added and were incubated in the absence and presence a magnetic gradient field for 30 seconds, 1 and 24 h. After these treatments, cells were washed three times with PBS prior to fixation with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in PBS for 1 h. Then samples were washed again three times with sodium cacodylate buffer and embedded in epon. Ultrathin sections (50–70 nm) were cut using a Reichert Ultracut S microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), mounted on copper grids, and stained with lead citrate and uranyl acetate for transmission electron microscopy (TEM) analysis. In addition, microanalysis by energy dispersive X-ray (EDX) spectroscopy was performed to confirm the BMNPs imaging by iron detection.

### **MTT assay in the absence/presence of a gradient or an alternating magnetic field**

Cells (approximately  $5 \times 10^3$  4T1/well) were incubated in 96-well plates for 24 h. Then different concentrations (0.1, 1, 10, and 100 µg/mL) of soluble DOXO, BMNPs, and DOXO-MNPs were added to plated cells in 100 µL. Equimolar amounts

of DOXO, either soluble or loaded on nanoparticles, as well as of BMNPs, were used. These samples were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in the absence or presence of a gradient magnetic field, using a magnetic plate below the 96-well plates, for 72 h. In another set of experiments the cells were incubated with 100 µg/mL BMNPs for shorter time points (5, 30, 60, 150, and 300 seconds) in the presence and absence of the gradient magnetic field.

In the case of the alternating magnetic field treatment, approximately 95 x 10<sup>4</sup> 4T1 cells were placed in a 0.5 mL tube. Then suspensions of 100, 300, and 500 µg of BMNPs in DMEM medium were added and exposed or not to an alternating magnetic field (130 kHz and 18 kAm<sup>-1</sup>) for 20 minutes. After this treatment the cells were counted by using trypan blue, seeded in 96-well plates (approximately 10 x 10<sup>3</sup> 4T1/well) and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h.

At the end of the incubation time of the different set of experiments, cell viability was evaluated by the MTT colorimetric assay. Briefly, 20 µL of MTT solution (5 mg mL<sup>-1</sup> in PBS solution) was added to each well. The plate was then incubated at 37 °C for 2 h and, then, supernatants were carefully aspirated. Afterwards, 125 µL of 0.2 N HCl in isopropanol was added to dissolve the formazan crystals formed. 100 µL were then removed carefully and the optical density was measured in a multiwell reader (2030 Multilabel Reader Victor TM X4, PerkinElmer) at 570 nm. Viability of parallel cultures of untreated cells (CTRL-) was taken as 100% viability and values obtained from cells undergoing the different treatments were referred to this value. Experiments were performed 3 times using 3 replicates for each sample.

### **Detection of reactive oxygen species (ROS) production**

To measure the potential oxidative stress in living cells, as a consequence of the presence of the BMNPs, the CellROX® Green Reagent (ThermoFisher) was used following the protocol recommended by the manufacturer. Briefly, cells (approximately 20 x 10<sup>3</sup> 4T1/well) were seeded on glass coverslips in 24-well plates. After their exposure to different concentration (0.1, 1, 10, 100 µg/mL), in the presence and absence of a gradient magnetic field, of BMNPs for 4 hours, the cells were washed with PBS and CellROX® Green Reagent was added to a final concentration of 5 µM in 300 µl of DMEM medium without serum. Then, the plate was incubated in the dark at 37 °C for 30 minutes. Menadione (100 µM) was used as a positive control. After the incubation time, the coverslips were washed with PBS pH 7.2, fixed with 4% paraformaldehyde in

PBS, washed again and permeabilized with 0.1% Triton-X100 for 10 minutes. Finally, the coverslips were stained and mounted on specimen slides (Biosigma). The cytoskeletal actin was stained with TRITC-phalloidine (1/200, Sigma-Aldrich, excitation at 543 nm; emission at 560-620 nm) and the nuclei with TO-PRO-3 (1/50, Life Technologies, excitation at 642 nm, emission at 650-750 nm). The CellROX® Green Reagent is only fluorescent in the oxidized state (as a consequence of ROS production). Therefore, the emission of green fluorescence (at 485/520 nm) is stable and is produced after the DNA binding and therefore its signal is mainly located in the nucleus and in the mitochondria. Fluorescence was detected using a Spectral Confocal Leica TCS SP2 AOBS microscope. The images were taken at 400X magnification. The ImageJ software was used for the analysis.

### ***In vivo* biocompatibility and nanoparticles biodistribution**

Fifteen BALB/c mice were injected in the tail vein with 10 µg of BMNPs/g mouse weight diluted in a final volume of 100 µl of sterile PBS. Animals were monitored every two days up to 2 month. Mice were subdivided in 5 groups, differing for the time point of euthanization (from 1 h to 2 month). For each group, composed by 3 mice, one control untreated mouse was also used. Their organs were collected, fixed, embedded in paraffin, and processed for histological analysis. Serial sections were stained with Prussian blue and haematoxylin-eosin (Sigma Aldrich) and subjected to histological evaluation by an independent pathologist not informed of the sample identity. All procedures were carried on in accordance with the European Community Directive for Care and Italian Laws on animal experimentation (Law by Decree 116/92).

### ***In vivo* magnetic targeting and antitumor activity**

Thirty female BALB/c mice were inoculated with  $10^5$  4T1 cells into fat pad of mammary gland. When the tumors became palpable (10 days after cell inoculation), mice were divided into 6 different groups with comparable tumor volumes among the groups. The 6 groups were intravenous injected and treated as follows: i) PBS (control), ii-iii) DOXO-BMNPs +/- gradient magnetic field, iv-v) BMNPs +/- gradient magnetic field, and vi) soluble DOXO. Mice were injected 5 times with a dose of 2 mg/kg DOXO soluble or adsorbed to the BMNPs or equivalent doses of not functionalized BMNPs, each time 3-4 days apart and, in case of magnetic treatment, after each injection they received a magnetic field treatment for 1 h. The magnetic field was applied by attaching

a 10 mm in diameter x 3 mm thick N42 neodymium magnet (1.8 kg pull, Magnet Expert Ltd) with 3MTM Vetbond™ tissue adhesive on the tumor site and keeping it attached for 1 hour after the injection. This neodymium magnet, with a magnetic anisotropy normal to the plane and a saturation magnetization of 800 emu/cc, could generate a direct current (d.c.) magnetic field of the order of 100 Oe a few millimeters from the surface. Therefore, the effect of the magnet is equivalent to application of a local 100 Oe external d.c. magnetic field immediately after the administration of the nanoparticles. Throughout the study, tumor volumes (measured with caliper) were recorded every 3-4 days. Three days after the last injections (day 18), mice were euthanized, their weights, as well as, tumor weights were recorded and, then, tumors, hearts, livers, spleens, brains, lungs, and kidneys were collected for histology. Histological sections of the tumors were prepared for hematoxylin-eosin and Prussian blue staining to analyze particles biodistribution.

#### ***In vivo* hyperthermia and antitumor activity**

Thirty-six female BALB/c mice were inoculated with  $10^5$  4T1 cells into fat pad of mammary gland. After ~15 days after cell inoculation, when the tumor dimensions were ~100 mm<sup>3</sup>, mice were divided into 6 different groups with comparable tumor volumes among the groups. The 6 groups were intratumor injected and treated as follows: i) PBS (control), ii-iii) DOXO-BMNPs +/- alternating magnetic field, iv-v) BMNPs +/- alternating magnetic field, and vi) soluble DOXO. Mice were injected only once at beginning of the treatment (day 0) with a dose of 3 mg BMNPs/mouse, equivalent to 80 µg DOXO for the soluble DOXO and DOXO-BMNPs groups. After each injection, the some groups were exposed to an alternating magnetic field (130 kHz and 18 kAm<sup>-1</sup>) for 20 minutes immediately after the administration of the nanoparticles. Throughout the study, tumor volumes were measured with caliper every two days. Finally, five days post treatment, mice were euthanized and their tumor weights recorded.

#### **Statistical analysis**

One-way ANOVA statistical analyses were performed with Bonferroni's or Dunnett's post-test using GraphPad Prism version 4.03 (San Diego, CA). Statistical differences between the treatments were considered significant when p values were p<0.05 (\*), p<0.01 (\*\*), p<0.001 (\*\*\*).

## **Conclusions**

In this study, *in vivo* magnetic drug targeting and magnetic hyperthermia produced by BMNPs were analyzed for the first time. The BMNPs showed high biocompatibility *in vitro* and *in vivo*, not showing morphological alterations of the organs up to 2 months. On one hand, the exposition of the BMNPs/DOXO-BMNPs to a GMF lead to a higher cellular uptake *in vitro* after short time points, which promotes the availability of DOXO to exert cytotoxicity, and an increase of particles in the tumor site in 4T1 mammary carcinomas bearing BALB/c mice after their intravenous injection. In fact, the accumulation of DOXO-BMNPs, consequence of the GMF, showed a higher tumor reduction in comparison to mice in which no GMF was applied. The treatment with DOXO-BMNPs + AMF is able to generate hyperthermia *in situ* and DOXO release from BMNPs (as shown in *in vitro* experiments) decreasing tumor volumes in 4T1 tumor bearing mice compared to mice only injected with soluble DOXO. Therefore, altogether these *in vivo* data represent the basis for the potential safety and efficient application of the BMNPs in dual antitumor therapy, which combines the magnetic drug targeting with the magnetic hyperthermia treatment to increase the treatment efficiency.

## **Acknowledgments**

MP thanks a financial support from the Università del Piemonte Orientale A. Avogadro, Italy. CJL wants to thank projects CGL2013-46612 and CGL2016-76723 (MINECO, Spain and FEDER) for financial support and Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05 (University of Granada, Spain). Thanks go to the CIC personnel of the University of Granada for technical assistance in the TEM.

## **References**

- (1) Dobson, J. Magnetic micro- and nano-particle-based targeting for drug and gene delivery. *Nanomedicine (Lond.)* **2006**, *1*, 31–37.
- (2) Sun, J.-B.; Duan, J.-H.; Dai, S.-L.; Ren, J.; Guo, L.; Jiang, W.; Li, Y. Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: Magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, *101*, 1313–1320.
- (3) Jurj, A.; Braicu, C.; Pop, L.A.; Tomuleasa, C.; Gherman, C.D.; Berindan-Neagoe, I. The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 2871–2890.

- (4) Datta, N.R.; Krishnan, S.; Speiser, D.E.; Neufeld, E.; Kuster, N.; Bodis, S.; Hofmann, H. Magnetic nanoparticle-induced hyperthermia with appropriate payloads: Paul Ehrlich's "magic (nano)bullet" for cancer theranostics? *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *50*, 217–227.
- (5) Sau, S.; Alsaab, H.O.; Bhise, K.; Alzhrani, R.; Nabil, G.; Iyer, A.K. Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy: A groundbreaking approach for reprogramming malfunctioned tumor environment. *J. Control Release* **2018**, *274*, 24–34.
- (6) Chen, B.; Dai, W.; He, B.; Zhang, H.; Wang, X.; Wang, Y.; Zhang, Q. Current multistage drug delivery systems based on the tumor microenvironment. *Theranostics* **2017**, *7*, 538–558.
- (7) Din, F. ud; Aman, W.; Ullah, I.; Qureshi, O.S.; Mustapha, O.; Shafique, S.; Zeb, A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 7291–7309.
- (8) Cheng, R.; Meng, F.; Deng, C.; Klok, H.A.; Zhong, Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials* **2013**, *34*, 3647–3657.
- (9) Wei, M.; Gao, Y.; Li, X.; Serpe, M.J. Stimuli-responsive polymers and their applications. *Polym. Chem.* **2016**, *8* (1), 127–143.
- (10) Karimi, M.; Ghasemi, A.; Zangabad, P.S.; Rahighi, R.; Basri, S.M.M.; Mirshekari, H.; Amiri, M.; Pishabad, Z.S.; Aslani, A.; Bozorgomid, M.; Ghosh, D.; Beyzavi, A.; Vashi, A.; Aref, A.R.; Haghani, L.; Bahrami, S.; Hamblin, M.R. Smart Micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1457–1501.
- (11) Shubayev, V.I.; Pisanic, T.R. 2nd; Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 467–477.
- (12) Prozorov, T.; Bazylinki, 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.
- (13) Soares, P.I.; Ferreira, I.M; Igreja, R.A.; Novo, C.M.; Borges, J.P. Application of hyperthermia for cancer treatment: recent patents review. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2012**, *7*, 64–73.
- (14) Ortega, D.; Pankhurst, Q.A. Magnetic Hyperthermia. *Nanoscience* **2012**, 60–88.
- (15) Issels, R.D. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur. J. Cancer* **2008**, *44*, 2546–2554.
- (16) Bennet, M.; Bertinetti, L.; Neely, R.K.; Schertel, A.; Körniwei, A.; Flors, C.; Müller, F.D.; Schüler D.; Klumppf, S.; Faivre, D. Biologically controlled synthesis and assembly of magnetite nanoparticles. *Faraday Discuss.* **2015**, *181*, 71–83.
- (17) Thomas-Keprta, K.L.; Bazylinki, D.A.; Kirschvink, J.L.; Clemett, S.J.; McKay, D.S.; Wentworth, S.J.; Vali, H.; Gibson, E.K.; Jr., Romanek, C.S. Elongated prismatic

- magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, *64*, 4049–4081.
- (18) Williams, P.S.; Carpino, F.; Zborowski, M. Magnetic nanoparticle drug carriers and their study by quadrupole magnetic field-flow fractionation. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1290–1306.
- (19) 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.
- (20) 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.
- (21) 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. Char.* **2019**, *36*, 1900057.
- (22) 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.
- (23) Alieva, I.B.; Kireev, I.; Garanina, A.S.; Alyabyeva, N.; Ruyter, A.; Strelkova, O.S.; Zhironkina, O.A.; Cherepaninets, V.D.; Majouga, A.G.; Davydov, V.A.; Khabashesku, V.N.; Agafonov, V.; Uzbekov, R.E. Magnetocontrollability of Fe<sub>7</sub>C<sub>3</sub>@C superparamagnetic nanoparticles in living cells. *J. Nanobiotechnology* **2016**, *14*, 67.
- (24) Dominguez, G.; Durand, L.; De Rosa, J.; Danguise, E.; Arozamena, C.; Ferraina, P.A. Retraction and triangulation with neodymium magnetic forceps for single-port laparoscopic cholecystectomy. *Surg. Endosc.* **2009**, *23*, 1660–1666.
- (25) Prijic, S.; Scancar, J.; Romih, R.; Cemazar, M.; Bregar, V.B.; Znidarsic, A.; Sersa, G. Increased cellular uptake of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles into malignant cells by an external magnetic field. *J. Membr. Biol.* **2010**, *236*, 167–179.
- (26) Loor, G.; Kondapalli, J.; Schriewer, J.M.; Chandel, N.S.; Vanden Hoek, T.L.; Schumacker, P.T. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1925–1936.
- (27) Lu, Y.-C.; Changa, F.-Y.; Tu, S.-J.; Chen, J.-P.; Ma, Y.-H. Cellular uptake of magnetite nanoparticles enhanced by NdFeB magnets in staggered arrangement. *J. Magn. Mater.* **2017**, *427*, 71–80.

- (28) MacDonald, C.; Barbee, K.; Polyak, B. Force dependent internalization of magnetic nanoparticles results in highly loaded endothelial cells for use as potential therapy delivery vectors. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 1270–1281.
- (29) Garanina, A.; Kireev, I.; Zhironkina, O.; Strelkova, O.; Shakhov, A.; Alieva, I.; Davydov, V.; Murugesan, S.; Khabashesku, V.; Majouga, A.; Agafonov, V.; Uzbekov, R. Long-term live cells observation of internalized fluorescent Fe@C nanoparticles in constant magnetic field. *J. Nanobiotechnology* **2019**, *17*, 27.
- (30) Tate, J.A.; Petryk, A.A.; Giustini, A.J.; Hoopes, P.J. *In vivo* biodistribution of iron oxide nanoparticles: an overview. *Proc. S.P.I.E.*, **2011**, *7901*, 790117.
- (31) Mejías, R.; Pérez-Yagüe, S.; Gutiérrez, L.; Cabrera, L.I.; Spada, R.; Acedo, P.; Serna, C.J.; Lázaro, F.J.; Villanueva, A.; Morales Mdel, P.; Barber, D.F. Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2938–2952.
- (32) Edge, D.; Shortt, C.M.; Gobbo, O.L.; Teughels, S.; Prina-Mello, A.; Volkov, Y.; MacEneaney, P.; Radomski, M.W.; Markos, F. Pharmacokinetics and biodistribution of novel super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) in the anaesthetized pig. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2016**, *43*, 319–326.
- (33) Chaves, S. B.; Silva, L. P.; Lacava, Z. G. M.; Morais, P. C.; Azevedo, R. B. Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lungs induced by 2, 3 meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2005**, *97*, 10Q915.
- (34) Owens, D.E. 3rd and Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93–102.
- (35) Jain, T.K.; Reddy, M.K.; Morales, M.A.; Leslie-Pelecky, D.L.; Labhasetwar, V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 316–327.
- (36) Nel, A.E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E.M.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
- (37) Kim, J.S.; Yoon, T.-J.; Yu, K.N.; Kim, B.G.; Park, S.J.; Kim, H.W.; Lee, K.H.; Park, S.B.; Lee, J.-K.; Cho, M.H. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol. Sci.* **2006**, *89*, 338–347.
- (38) Cheng, L.; Yang, K.; Li, Y.; Zeng, X.; Shao, M.; Lee, S.T.; Liu, Z. Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy. *Biomaterials* **2012**, *33*, 2215–2222.
- (39) El-Sherbiny, I.M.; Elbaz, N.M.; Sedki, M.; Elgammal, A.; Yacoub, M.H. Magnetic nanoparticles-based drug and gene delivery systems for the treatment of pulmonary diseases. *Nanomedicine (Lond.)* **2017**, *12*, 387–402.



- (40) Struss, W.J.; Tan, Z.; Zachkani, P.; Moskalev, I.; Jackson, J.K.; Shademani, A.; D'Costa, N.M.; Raven, P.A.; Frees, S.; Chavez-Munoz, C.; Chiao, M.; So, A.I. Magnetically-actuated drug delivery device (MADDD) for minimally invasive treatment of prostate cancer: An in vivo animal pilot study. *Prostate* **2017**, *77*, 1356–1365.
- (41) Cole, A.J.; David, A.E.; Wang, J.; Galbán, C.J.; Hill, H.L.; Yang, V.C. Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2183–2193.
- (42) Dandamudi, S. and Campbell, R.B. The drug loading, cytotoxicity and tumor vascular targeting characteristics of magnetite in magnetic drug targeting. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4673–4683.
- (43) Zhang, J.Q.; Zhang, Z.R.; Yang, H.; Tan, Q.Y.; Qin, S.R.; Qiu, X.L. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: in vitro and in vivo studies. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 573–583.
- (44) Kong, S.D.; Zhang, W.; Lee, J.H.; Brammer, K.; Lal, R.; Karin, M.; Jin, S. Magnetically vectored nanocapsules for tumor penetration and remotely switchable on-demand drug release. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 5088–5092.
- (45) Alexiou, C.; Arnold, W.; Klein, R.J.; Parak, F.G.; Hulin, P.; Bergemann, C.; Erhardt, W.; Wagenpfeil, S.; Lübke, A.S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6641–6648
- (46) Alexiou, C.; Jurgons, R.; Schmid, R.J.; Bergemann, C.; Henke, J.; Erhardt, W.; Huenges, E.; Parak, F. Magnetic drug targeting-biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J. Drug. Target.* **2003**, *11*, 139–149.
- (47) Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; Garcia-Hernandez, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, T. Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment. *ACS Nano* **2012**, *6*, 3080–3091.
- (48) Spirou, S.V.; Basini, M.; Lascialfari, A.; Sangregorio, C.; Innocenti, C. Magnetic hyperthermia and radiation therapy: Radiobiological principles and current practice. *Nanomaterials (Basel)* **2018**, *8*, 401.
- (49) Iglesias, G.R.; Reyes-Ortega, F.; Checa Fernandez, B.L.; Delgado, Á.V. Hyperthermia-triggered gemcitabine release from polymer-coated magnetite nanoparticles. *Polymers* **2018**, *10*, 269.
- (50) Hahn, G.M. Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 2264–2268.
- (51) Van der Zee, J. Heating the patient: a promising approach? *Ann. Oncol.* **2002**, *13*, 1173–1184.

## **Chapter VI. Green synthesis and use of magnetic eggshell membranes for removal of lead from contaminated waters**

Ana Peigneux<sup>1</sup>, Jose D. Puentes-Pardo<sup>1</sup>, Alejandro B. Rodríguez-Navarro<sup>2\*</sup>, Maxwell T. Hincke<sup>3\*</sup> and Concepción Jimenez-Lopez<sup>1</sup>

\* Corresponding authors

<sup>1</sup>Department of Microbiology and <sup>2</sup>Department of Mineralogy University of Granada, Faculty of Sciences, Campus de Fuentenueva s/n, 18002 Granada, Spain

<sup>3</sup>Departments of Innovation in Medical Education, and Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Ottawa, 451 Smyth Road, Ottawa, ON, Canada K1H 8M5

### **Abstract**

An increasing concern for natural resources preservation and environmental safety is the removal of heavy metals from contaminated sites. In this context, eggshell membranes (ESM) are an abundant biowaste from the food processing industry that could be used as a green adsorbent. An intriguing strategy is to transform eggshell membranes (ESM) into magnetic eggshell membranes (MESM) by decorating the membrane fibers with magnetite nanoparticles (MNPs), in order to facilitate their collection using an external magnetic field without the need for further treatment. MESM were successfully synthesized using a green coprecipitation method, which produced long strands of bead-like nearly spherical MNPs along the fibers of the ESM. In contrast, agglomerates of smaller particles with a random disposition are formed in the absence of a magnetic field. These manufactured MESMs have the capacity to improve the removal of Pb<sup>2+</sup> from contaminated water, since, although Pb<sup>2+</sup> affinity is observed both to the ESM and to the MNPs, the interaction is much greater to the magnetic nanoparticles of MESM. These results suggest the MESM could be utilized as an efficient bioremediation agent in separation/removal of heavy metal ions or other charged pollutants from contaminated waters that could be easily recovered magnetically and recycled.

**Keywords:** water treatment; lead; bioadsorbent; magnetic nanoparticles; eggshell membranes.

## **Introduction**

Heavy metal pollution is a major environmental problem due to their widespread distribution, persistency (non-biodegradability) and toxicity even at low concentrations, which is a major concern to public health.<sup>[1,2]</sup> Heavy metals can be transported by particles and solubilized in wastewater, discharged into rivers and enter groundwater.<sup>[3]</sup> Moreover, heavy metals can enter the food chain through bioaccumulation and affect the general health of organisms and entire aquatic ecosystems.<sup>[4,5]</sup> For example, lead is one of the most common toxic metals due to its major origin from mining and smelting activities, industrial products (i.e., leaded gasoline, batteries) as well as sporting debris (hunting: leadshot; fishing: lead sinkers). Lead is cytotoxic and accumulates in soft and hard tissues (i.e., kidney, bone) causing different pathologies with neurological, hepatic, renal and skeletal implications.<sup>[6-8]</sup>

There are different technologies for heavy metal removal from wastewater, which include electrochemical or chemical precipitation, ion exchange, reverse osmosis, electrochemical treatment and adsorption.<sup>[2,9]</sup> One of the most recommended methods, which is widely used because of its efficiency, is adsorption on solid, low-cost easy-to-handle materials.<sup>[10-12]</sup> The more conventional materials used for this purpose are activated carbons, zeolites, clays, biosorbents, and industrial by-products.<sup>[13]</sup> However, nanostructured materials, such as fullerenes,<sup>[14]</sup> carbon nanotubes,<sup>[15]</sup> or graphenes<sup>[16]</sup> have been used more recently for this purpose. In spite of these advances, the remediation industry still demands novel, eco-friendly and cost effective adsorbents that can be easily and rapidly recovered without additional and costly steps in the water treatment process. In this context, eggshell membranes (ESM) are an abundant biowaste from the food processing industry that could be used as a green adsorbent. ESM are a cysteine-rich, collagen-based biomaterial with a high surface area, consisting of a stable network of water-insoluble cross-linked fibers.<sup>[17-20]</sup> The ESM consist of a thinner inner membrane that surrounds the egg white, and an associated thicker outer membrane that is attached to the mineralized shell. The outer surface of the ESM possesses organic aggregates rich in sulfated proteoglycans (mammillary cores) that have a strong calcium binding capacity and act as nucleation sites for calcite crystal formation.<sup>[21]</sup> The ESM

can also bind heavy metal ions such as Au, Pt, Pd, arsenate and various actinides from dilute aqueous solution.<sup>[22–26]</sup> This material is a low cost and eco-friendly absorbent, but once used for remediation, it requires recovery from the water column. Traditionally used methods for recovery are sedimentation, filtration and/or centrifugation which are additional processing steps that can be costly and, at the least, time consuming.

To address this problem, we propose the novel strategy of transforming the ESM into magnetic eggshell membranes (MESM) by decorating the membrane fibers with magnetite nanoparticles (MNPs), in order to facilitate their collection using an external magnetic field without any further treatment as well as taking advantage of the ability of MNPs for heavy metal adsorption. In fact, it has been demonstrated that MNPs alone can efficiently and rapidly remove different heavy metal ions from large volumes of wastewater.<sup>[10,27–31]</sup> Therefore, a combination of magnetite nanoparticles and eggshell membranes could enhance the concentration and collection processes to improve the efficiency of recovery of heavy metals and to lower the costs and time related to the recovery procedures.

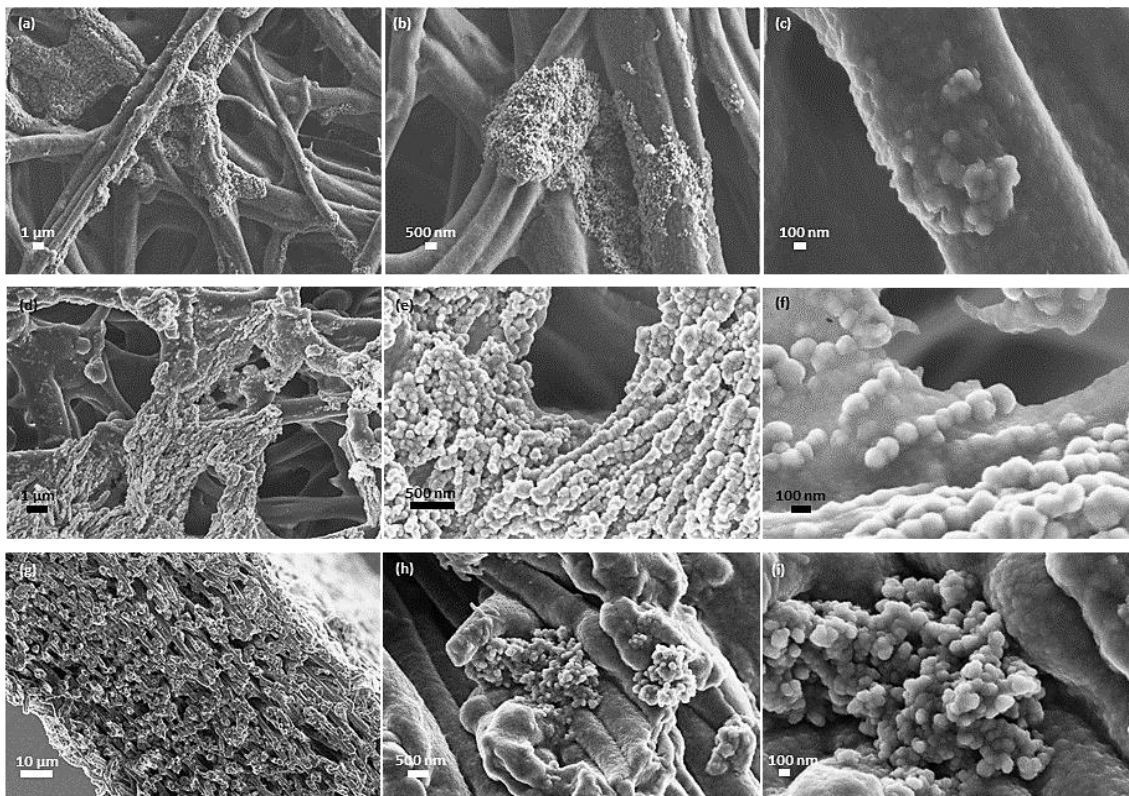
In the present study, both kinds of adsorbent materials, ESM and MNPs, have been combined by the precipitation of MNPs onto ESM using a rapid, straightforward and green method to produce a new material, termed MESM. The potential of the MESM adsorbent to remove heavy metals was validated *in vitro* using lead as a model heavy metal contaminant.

## **Results and Discussion**

### ***In situ* MNPs precipitation on ESM**

MESM formed by *in situ* precipitation of magnetite on ESM membranes were visualized by high resolution SEM (Figure 1). The surface of all membranes (interior, outer and total ESM) were coated with magnetite nanoparticles (MNPs) on both sides, irrespective of whether the ESM were suspended in the solution or laid down on the bottom of the wells during the precipitation experiments. However, in general, a higher particle abundance was observed on the ESM surfaces facing up during precipitation. Moreover, MNPs were embedded within the membrane fibers, not just deposited on their surfaces, as shown in Figure 1g-i. Other authors have also observed the formation of MNPs inside the cross-linked ESM fibers.<sup>[33]</sup> This indicates that nucleation and growth of the magnetite nanoparticles is favored in ESM fibers either because they

provide a surface for crystal growth and/or due to a specific affinity for Fe cations or for magnetite nuclei, and not just a simple magnetite particle precipitation in the bulk solution with later deposition on membranes by sedimentation.



**Figure 1.** Magnetic eggshell membranes and magnetic field. SEM images of eggshell membranes incubated with magnetite coprecipitation solutions. (a-c) in absence of magnetic field there is a lower degree of coverage of particles on the eggshell membranes. (e-f) In the presence of magnetic field, there is a higher density of particles coating eggshell membrane fibers. Magnetite nanoparticles are aligned forming chains. (g-i) Cross-section of eggshell membranes showing membrane fibers coated with magnetite nanoparticles.

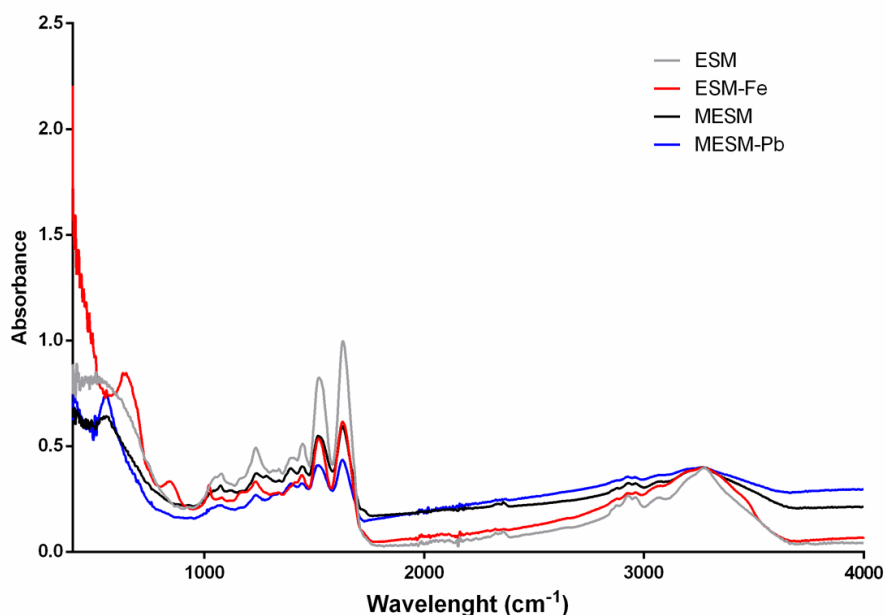
Although MNPs coated all configurations of ESM membranes, the amount of MNPs observed on the inner membrane fibers was lower than on the outer membranes. Mineralization of the thinner fibrils of the inner ESM is disfavored compared to the coarser fibers of the external ESM.<sup>[34]</sup> This result is in line with previous findings on nanoparticle nucleation on fibers. In fact, other authors have observed ferrite nanoparticles attached to cellulose where the fibrils act as nucleation sites,<sup>[35,36]</sup> and, similar to the present study, they detected fewer and smaller ferrite nanoparticles

associated with thinner cellulose fibers, and in rare cases in-between, possibly because these sites provided unstable or poor nucleation sites, compared to those available on the larger fibril bundles.<sup>[36]</sup>

MESM formed in the presence of a magnetic field (irrespective of whether it was perpendicular or parallel), have generally a greater density of nanoparticles than those formed in the absence of magnetic field (Figure 1). Also in the presence of a magnetic field, long strands of bead-like, nearly spherical magnetite particles (about 50 nm in diameter) were observed along the surface of the ESM fibers (Figure 1f). In contrast, agglomerates of smaller particles with a random disposition were formed in the absence of a magnetic field (Figures 1a-c). The alignment of the nanoparticles associated with membrane fibers in the presence of a magnetic field has been observed in other hybrid membranes, either associated with magnetic graphene iron oxide nanoparticles<sup>[37]</sup> or with functionalized magnetic ferroferric oxide nanoparticles.<sup>[38]</sup> In all these cases, the nanoparticles were well-aligned if the magnetic membrane was formed in the presence of an external magnetic field, and were randomly arranged in its absence.

Representative FTIR spectra of ESM and MESM are shown in Figure 2. The ESM showed a broad band around  $3275\text{ cm}^{-1}$  due to O–H and amide A groups (from water and proteins). Other relevant absorption peaks associated with proteins are Amide I, II and III bands observed at  $1629\text{ (C=O)}$ ,  $1520$  and  $1233\text{ cm}^{-1}$  (CN/NH bending modes), respectively.<sup>[39]</sup> There are additional peaks at  $2850\text{ cm}^{-1}$  (C–H),  $1076\text{ cm}^{-1}$  (C–O) and  $1446\text{ cm}^{-1}$  (C=C), which can be attributed to polysaccharides, the second main chemical component of ESM after proteins.<sup>[40]</sup> After  $\text{Fe}^{3+}$  loading of the ESM, two additional peaks appear at  $644$  and  $837\text{ cm}^{-1}$ . Those peaks are also seen in chloride-bearing Fe(III) (hydr)oxide salts.<sup>[41]</sup> This result is consistent with the fact that  $\text{FeCl}_3$  was incubated with the ESM, and confirms that iron interacts with the membrane fibers. The ESM peaks are mainly conserved in MESM, with some shifts and with the emergence of a new peak at  $555\text{ cm}^{-1}$ , which is characteristic of the Fe–O bond in magnetite.<sup>[42]</sup> No Fe–O peaks for other common iron oxides/hydroxide minerals (i.e., hematite, goethite, maghemite) were detected, supporting the fact that only magnetite particles were formed during the MESM synthesis. On the other hand, in MESM samples, the peaks of Amide II and Amide III are slightly shifted from  $1521$  to  $1516\text{ cm}^{-1}$ , and from  $1233$  to  $1237\text{ cm}^{-1}$ , respectively, and are accompanied by a general decrease in intensity of the amide peaks. Additionally, we observe a decrease in the Amide I/Amide II ratio from

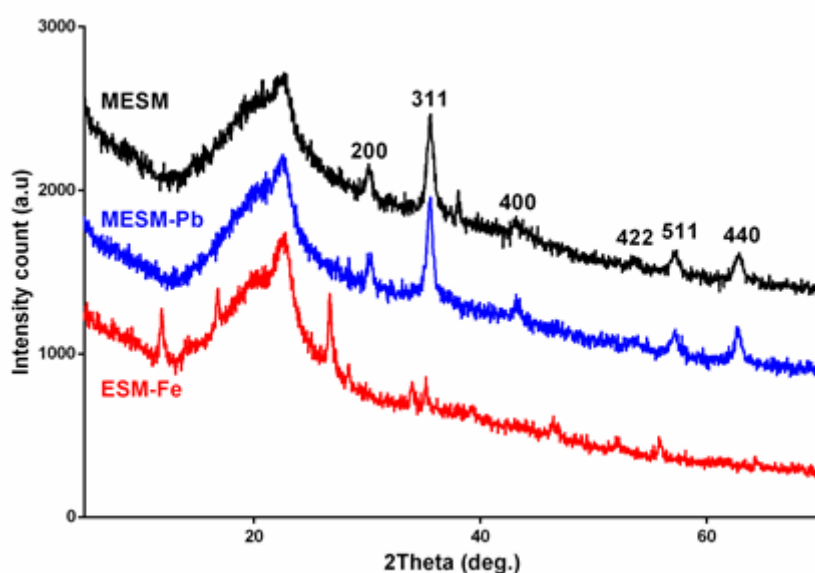
1.30 to 1.16, which can be related to changes in protein secondary structure.<sup>[43]</sup> Changes in the frequency and relative intensity of amide bands could be related to Fe ions binding to these protein groups through hydrogen bonding.<sup>[44]</sup> This interaction could concentrate Fe ions on the membrane fiber surfaces and favor magnetite nucleation (i.e., ionotropic effect), or produce a templating effect if there is a matching or correspondence in the disposition of protein molecular groups and Fe ions in the magnetite surface. Cationic groups have also been associated with magnetite nuclei stabilization, as previously reported by Lenders *et al.* (2015)<sup>[45]</sup> as the mechanism by which poly-lysine controls magnetite nucleation, and by Baumgartner *et al.* (2014)<sup>[46]</sup> for the control of magnetite nucleation by poly-arginine. In any case, other studies suggest that almost any surface can induce magnetite nucleation by one or a combination of these mechanisms (i.e.,<sup>[47]</sup>).



**Figure 2.** FT-IR analysis of total egg-shell membranes (ESM), ESM incubated with 310 ppm  $\text{Fe}^{3+}$  (ESM-Fe) and magnetic egg-shell membranes (MESM) produced by coprecipitation of magnetite nanoparticles.



Figure 3 shows the XRD patterns of ESM, MESM and ESM-Fe<sup>3+</sup> samples. The eggshell membrane contributes with a broad band around 22-23° that was present in all samples and is due to the amorphous or poorly crystalline organic components of the membrane.<sup>[48]</sup> The ESM-Fe sample produces peaks matching those of iron (II,III) hydroxycarbonate green rust GR(CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) which is a metastable mineral phase that is commonly formed during iron oxide precipitation experiments.<sup>[49,50]</sup> The MESM samples have well defined sharp peaks that match well with the JCPDS file no. 87-0245 for magnetite. Since magnetite and maghemite have very similar crystalline structure, they produce very similar XRD patterns and it is difficult to discriminate between them from XRD data alone. However, as discussed before, FTIR confirmed that magnetite was the only iron oxide mineral phase present on the MESM.



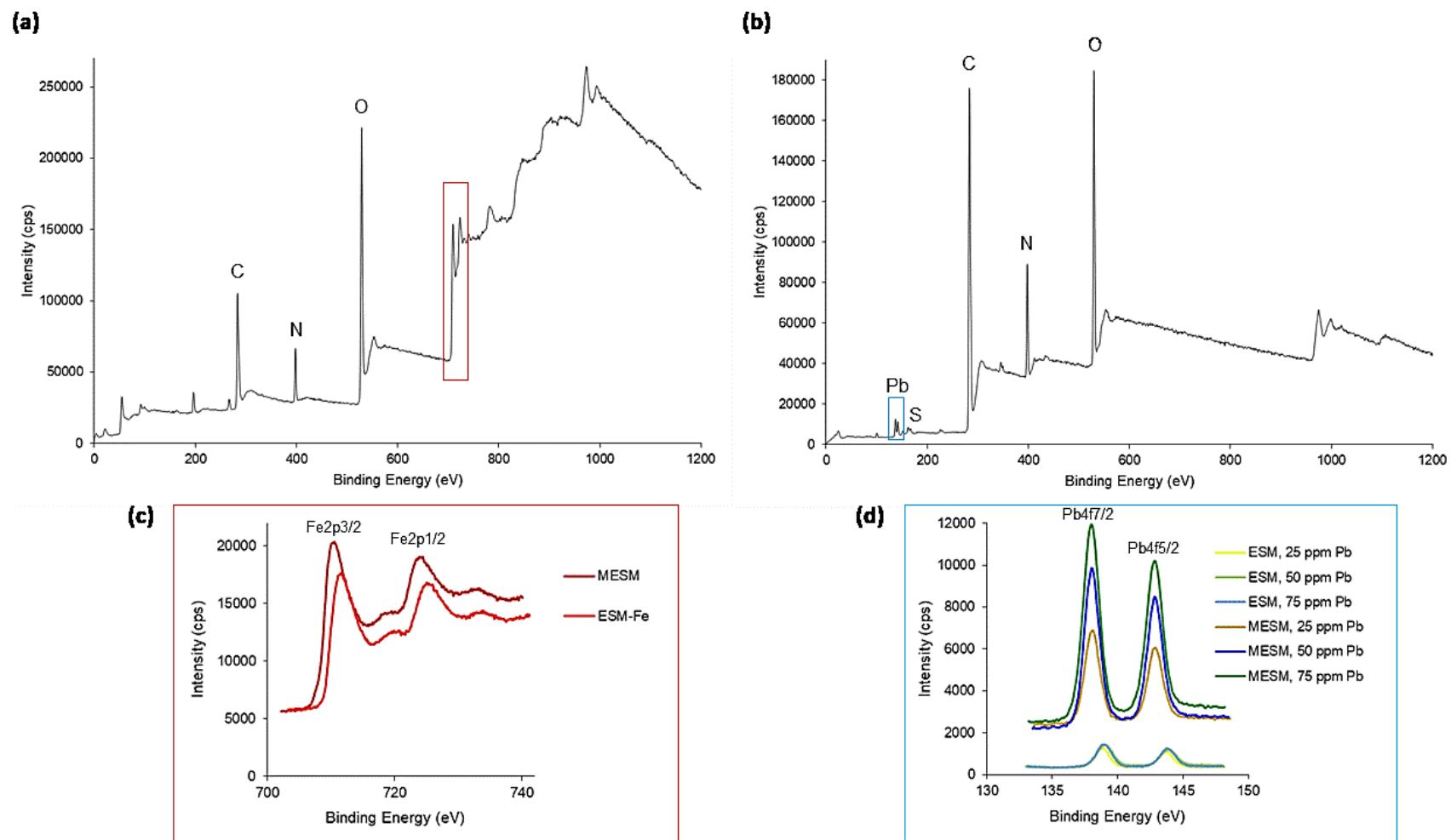
**Figure 3.** XRD analysis of total egg-shell membranes incubated with 310 ppm Fe<sup>3+</sup> (ESM-Fe), magnetic egg-shell membranes (MESM) produced by coprecipitation of magnetite nanoparticles and MESM incubated with 75 ppm Pb<sup>2+</sup>.

EDX spectra of the MNPs coating the ESM fiber surfaces only showed Fe and O peaks, confirming that they were iron oxides (Figure S3). EDX analyses also showed that the internal ESM fibers are covered with a sulfur-rich layer of proteinaceous material, previously recognized as the limiting membrane,<sup>[51]</sup> that possibly impedes the penetration of reagents, thus inhibiting or reducing the growth of magnetite on these fibers.



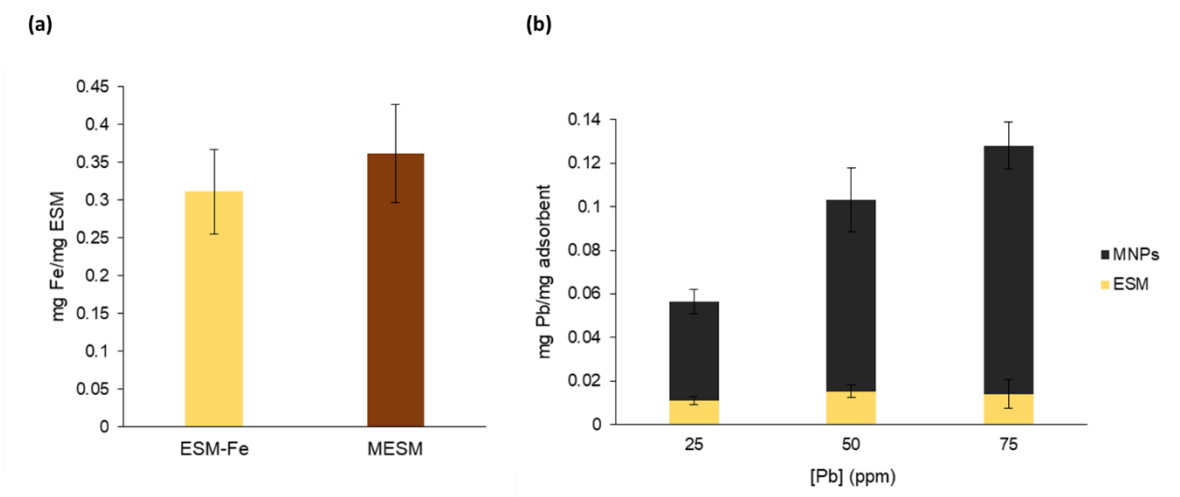
XPS analysis (Figure 4) also detected Fe peaks on the MESM surface with an estimated concentration of  $36 \pm 6$  % by mass of the membranes (up to 10 nm in depth) (Figures 4a,c and 5a), and, according to the binding energy, these data show that the oxidation state for Fe was closer to  $\text{Fe}^{3+}$  with values very similar to those previously reported for magnetite.<sup>[31]</sup> When ESM were incubated with  $\text{FeCl}_3$ , at the same concentration used in the magnetite precipitation experiments, the Fe binding energies matched those reported for  $\text{Fe}^{3+}$ . Comparing the XPS iron spectra between ESM-Fe and MESM, a slight shift is observed (Figure 4a,c). Fe peaks (Binding Energy of  $\text{Fe}2p_{3/2}$  and  $\text{Fe}2p_{1/2}$ ) in ESM are 711.6 eV (reference peak corresponding to  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) and 725.1 eV, while in MESM the peaks are at 710.5 and 723.9 eV, corresponding to reference magnetite.<sup>[31]</sup> The oxidation states of Fe (or Pb, as discussed later) interacting with ESM show that these two cations are forming metal oxides, confirmed by the O peak situated at 529-530 eV (Figure 4). As a summary, all analyses done on MESM are in accordance with magnetite nucleation, not simply deposition, on the fibers of the ESM, being especially intense on the outer ESM, and facilitated by an interaction between protein groups in ESM and magnetite.

Other authors have produced magnetic eggshell membranes ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -loaded ESM), designed for removal of Cu (II) and Ti (I) ions, by precipitating magnetite on the membranes at  $50^\circ\text{C}$ .<sup>[33]</sup> This method is less cost effective than that proposed in the present work, since magnetite precipitation occurs at room temperature in our protocol. As in our MESM, these authors also observed MNPs trapped inside the crosslinking ESM fibers by SEM.



**Figure 4.** XPS analysis of the chemical composition and the oxidation states of the elements found in the total ESM incubated with (a, c) 310 ppm Fe<sup>3+</sup> (ESM-Fe), magnetic ESM (MESM), and (b, d) MESM incubated with 25, 50 and 75 ppm Pb<sup>2+</sup>.

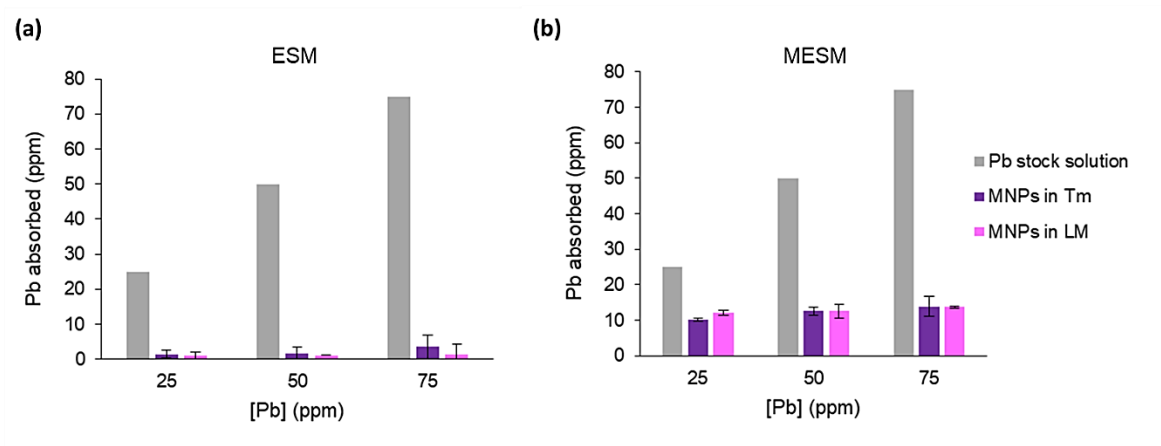
MESM could be efficiently and easily recovered magnetically by neodymium magnets of 1.8 kg pull (Magnet Expert Ltd). All the membranes were collected after 2 seconds following application of the magnetic field.



**Figure 5.** XPS quantification of the amount of (a) iron adsorbed to the total ESM incubated with 310 ppm  $\text{Fe}^{3+}$  (ESM-Fe), and of (b) lead adsorbed to the MESM incubated with 25, 50 and 75 ppm  $\text{Pb}^{2+}$ .

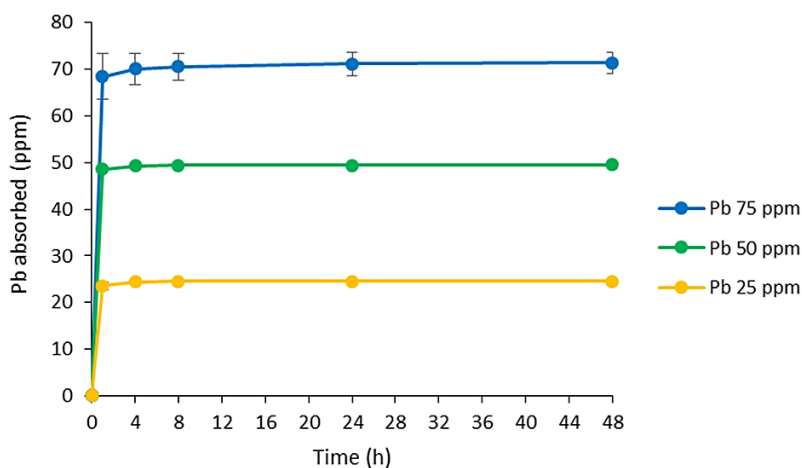
## 2.2. Adsorption of lead to the ESM and the MESM fibers

The accumulation of Pb in MESM was roughly ten times higher than that in ESM, as determined by AAS and XPS measurements (Figure 5b). For bulk solutions of 25 ppm Pb, the adsorption of Pb to MESM, determined by AAS, was between  $10.2 \pm 0.5$  ppm and  $12.15 \pm 0.7$  ppm. Thus, there was an almost 50% recovery of lead. In similar experiments with ESM, the Pb recovered did not exceed 3.5 ppm (4.7% recovery) at the maximum concentration tested (75 ppm) (Figure 6). The amount of Pb adsorbed in MESM at higher solution concentrations (50 and 75 ppm Pb) did not vary significantly when the 4 x 4 cm pieces of MESM were used (Figure 6b), indicating that the MESM was saturated. From these results, adsorption values of  $0.76 \pm 0.09$  and  $0.80 \pm 0.06$  ppm  $\text{Pb}/\text{cm}^2$  to the outer and the inner surfaces of the MESM, respectively, were calculated.



**Figure 6.** AAS quantification of the amount of lead adsorbed to 4 x 4 cm pieces of (a) total ESM, and of (b) MESM incubated with 25, 50 and 75 ppm Pb<sup>2+</sup>.

Additionally, the absorption kinetic of Pb on the MESM equivalent to that of one egg (104 ± 7 cm<sup>2</sup>) was analyzed by OES-ICP. In this case, 23.6 ppm (94.2%), 48.6 ppm (97.1%) and 68.5 ppm (91.3%) of Pb was removed from the stock solutions of 25, 50 and 75 ppm, respectively, after 1 h of incubation (Figure 7). These values reached equilibrium by that time point; however, slight increases occurred with extended times, until maximum values of 24.6 ppm (98.2%), 49.5 ppm (99%) and 71.5 ppm (95.3%) from the same stocks were obtained after 48 h (Figure7). These values corresponded to 0.082 mg MNPs/mg ESM (ICP-OES), which supposed a total amount of 14.73 mg of MNPs.



**Figure 7.** ICP-OES quantification of the amount of lead adsorbed to one egg equivalent of total MESM incubated with 25, 50 and 75 ppm Pb<sup>2+</sup> for different time points (1, 4, 8, 24 and 48 h).

A comparison of the maximum adsorption capacity of lead onto different magnetic adsorbents is given in Table 1. As shown, the maximum capacity of Pb ions onto MNPs adsorbed to ESM was approximately 1 to 29 times higher than that reported for other low cost adsorbents. This may be due to the effect of disseminated particle distribution on the ESM, and their consequent high degree of exposure.

**Table 1: Maximum adsorption capacity of lead by iron nanoparticles**

Absorbent	Maximum adsorption capacity (mg Pb/g MNPs)	Reference
Iron oxide nanoparticles	36.0	Nassar <i>et al.</i> (2010) <sup>[27]</sup>
Magnetic Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> baker's yeast biomass	89.2	Xu <i>et al.</i> (2011) <sup>[52]</sup>
Amino-functionalized Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> magnetic nanomaterial	76.6	Wang <i>et al.</i> (2011) <sup>[53]</sup>
Magnetite nanoparticles	4.028	Wang <i>et al.</i> (2014) <sup>[9]</sup>
Magnetite nanorods	5.643	Karami (2013) <sup>[5]</sup>
Magnetic magnetite nanoparticles	31	Rajput <i>et al.</i> (2016) <sup>[30]</sup>
Magnetite nanoparticles (MESM)	116.2	This study

On the other hand, lead was always detected, on all ESM and MESM surfaces, by XPS (Figures 4b, d and 5b). For ESM and MESM (at 10 nm depth) values ranges from  $1.1 \pm 0.2$  to  $1.4 \pm 0.6\%$  and  $5.7 \pm 0.5$  to  $12.5 \pm 1.1 \%$  by mass, respectively. These results corroborate the data obtained by AAS analyses. Moreover, XPS analyses also informs on the oxidation states of the different elements determined from the binding energy (eV). As it is shown in Figure 4b,d, the reference Pb peak (binding energy of Pb 4f7/2) is at 138 eV corresponding to the oxidation state of PbO<sub>2</sub> (<https://xpssimplified.com>).

FTIR spectra of MESM compared to ESM showed some modifications in peak positions and intensities (Figure 2), which corresponded to the magnetite adsorbed to the ESM fibers, as explained above. The FTIR spectra of Pb loaded MESM samples did not show any modification (Figure 2), because the concentration of Pb adsorbed is too low to be detected by FTIR analysis. Nevertheless, the Pb adsorbed to the MESM, as well as to the ESM, was confirmed by XPS (Figure 4b, d), AAS (Figure 6), and ICP-OES (Figure 7) analyses.

Regarding XRD analysis, no changes in the d-spacing or intensities of the XRD peaks of MESM were observed after Pb<sup>2+</sup> loading (Figure 3). This indicates that removal of the lead from solution occurred through an adsorption process on magnetite

particles and not by the formation of a new or modified Pb-bearing mineral phase (i.e., Pb doped magnetite). These results are consistent with the XPS oxide state data. All in all, these combined results indicate that there is a synergy in terms of lead binding between the ESM and the MNPs, resulting in a much greater adsorption of Pb to MESM. Interestingly, this higher efficiency of MESM for binding Pb compared to ESM was supported by SEM-EDX analyses (Figure S4-S10). In EDX elemental maps, the distribution of Pb matched that of Fe, indicating that Pb was mainly absorbed onto magnetite particles. However, Pb was generally not detected in regions where lower iron signals (4-10%) were collected, since this technique is not sensitive enough to detect very low Pb concentrations (<0.5%), in contrast to XPS (Figure S8-S11). In any case, all these results point to the high efficiency of MESM to remove Pb and to the synergic effect of Pb removal by ESM and MNPs. The high specific surface area as well as specific surface charged sites of MNPs favors metal absorption by ion binding, as previously also demonstrated by other authors.<sup>[28]</sup> Heavy metals bind to the Fe-OH surface groups, which can be either negatively or positively charged depending on the bulk water pH, either by dissociation ( $\equiv \text{FeOH} \rightarrow \equiv \text{FeO}^- + \text{H}^+$ ) or association ( $\equiv \text{FeOH} + \text{H}^+ \rightarrow \equiv \text{FeOH}^+$ ) of protons, respectively. Therefore, the pH at which the metal adsorption occurs is of great importance, as it could change the surface speciation of magnetite, and thus, its ability to bind cations.<sup>[28]</sup> In fact, other authors have observed that as pH increases from 2.0 to 4.0, the  $\text{Pb}^{2+}$  removal using magnetite nanoparticles increases, whereas above pH 5.0,  $\text{Pb}^{2+}$  removal remained constant. However, the unbuffered pH of the  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  solution (4.35) seems favorable for the chemical absorption of Pb to the magnetite surface.<sup>[54]</sup> As a consequence, and in the context of future potential applications of MESM, the pH of the contaminated water should be taken into account to ensure the efficiency of the heavy metal removal process.

This synergy between inorganic particles and organic membranes for the absorption of heavy metals was previously observed in aluminum oxide membranes modified with  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  nanoparticles,<sup>[55]</sup> in which the modified membranes could remove significantly higher amounts of arsenic (up to 80%) compared to that removed by the unmodified membranes (up to 12%). Moreover, functionalization of polyethylene oxide/chitosan composite fibers with  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and halloysite (clay) nanotubes were observed to facilitate the chemical adsorption of different metal cations.<sup>[56]</sup>

## **Experimental section**

### **ESM extraction**

ESM were prepared from table eggs ( $6.7 \pm 0.2$  cm in length x  $5.4 \pm 0.37$  cm in width, and  $68 \pm 5$  g in weight) purchased from a local grocery store. The eggs were cracked in half and the contents discarded. The eggshell interiors were first washed with running water followed by three washes with MilliQ water to remove all the interior (egg white) material. Two strategies were adopted to obtain either total ESM (tESM), or to separate the interior and outer ESM (iESM and oESM, respectively). To obtain the total ESM (two layers intact), the eggs were filled with 1 N HCl for 25 minutes to partially solubilize the inner eggshell mineral and detach the ESM fibers from the tips of the mammillary cones. Following this incubation, the interior was rinsed several times with MilliQ water, and the tESM was pulled out using forceps. Alternatively, prior to acid treatment, the inner ESM was obtained by pulling it from the egg interior, which left the outer ESM adhering to the inner shell surface. The egg interior was then filled with 1N HCl and incubated to detach the remaining oESM from the eggshell interior. The various ESM preparations were cut in pieces of about 2 x 4 cm and placed in 12-well plates. Additionally, pieces of tESM ( $104 \pm 7$  cm<sup>2</sup>) were placed in Petri dishes. In all cases, a small fragment of adhering shell was retained to assist in distinguishing the external surface. The surface area of the ESM corresponding to an entire egg was calculated from overall egg dimensions (i.e., maximum radius at egg equator, height) using the Egg shape calculator (<https://rechneronline.de/pi/egg-shape.php>).

### **MESM synthesis**

Pieces of total ESM inside wells of a 12-well plate or Petri dishes were used as substrates for magnetic nanoparticle synthesis to prepare magnetic ESM (MESM). During this process, some ESM pieces were subjected to an external magnetic field (with perpendicular or parallel orientation; see Figure S1) using stacks of 9 mm in diameter x 3 mm N42 neodymium magnets (1.8 kg pull, Magnet Expert Ltd). One ESM piece per well or the ESM from an entire egg per Petri dish was placed flat, with either inner or outer surface facing upwards. Deoxygenated MilliQ water was added to maintain membrane hydration. ESM pieces either were (a) deposited at the bottom of the well or (b) hung from threads fastened to the inner wall of each well (Figure S1, Figure S2, respectively). These reaction vessels were placed inside an anaerobic

chamber and the ESM were washed with deoxygenated MilliQ water to avoid potential magnetite oxidation during particle deposition. Magnetite precipitation was induced by mixing the following solutions: 3.5 mM NaHCO<sub>3</sub>/3.5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.78 mM Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5.56 mM FeCl<sub>3</sub>, at a pH of 9. All solutions and experiments were prepared with deoxygenated MilliQ water at 25 °C, 1 atm total pressure inside an anaerobic COY chamber. The precipitation experiments lasted 14 days and closely followed the methodology described more in detail Perez-Gonzalez *et al.* (2011).<sup>[32]</sup> Magnetite precipitation was terminated by washing the membranes three times with oxygen-free MilliQ water. During the washes, we noticed that the MESM could be magnetically manipulated and recovered within 2 seconds. Controls (absence of magnetite precipitation) consisted of ESM samples incubated with 3.5 mM NaHCO<sub>3</sub>/3.5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The MESM were prepared for further analysis by X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy – energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM–EDX). The bulk nanoparticles (not associated with ESM) were also collected for analysis by SEM–EDX, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES).

### **ESM iron (Fe<sup>3+</sup>) absorption**

To determine if there was an interaction between Fe<sup>3+</sup> cations and the membranes during the magnetite precipitation experiments, pieces of total ESM and MESM were incubated in 25 mL of 5.56 mM FeCl<sub>3</sub> in deoxygenated MilliQ water, corresponding to 310 ppm of iron (Fe<sup>3+</sup>). After 48 h of incubation, the membranes were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) for elemental content and by X-ray diffraction (XRD) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).

### **ESM and MESM lead (Pb<sup>2+</sup>) absorption**

Total ESM and MESM pieces approximately 4 x 4 cm in size (16 cm<sup>2</sup>) or the ESM corresponding to an entire egg (104 ± 7 cm<sup>2</sup>) were incubated for 48 h in 25 mL solutions of 25, 50 or 75 ppm of lead, prepared from Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> dissolved in MilliQ water (pH4.35), with shaking (100 rpm). After incubation, membranes were analyzed for Pb elemental content by SEM–EDX, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and X-ray diffraction (XRD). The Pb remaining in solution after ESM or MESM incubation was determined by atomic absorption spectroscopy (AAS) and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES).



### **Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy of ESM, ESM-Fe and MESM**

ESM, MESM and ESM samples incubated with 310 ppm Fe<sup>3+</sup> (corresponding to the biomineralization reaction) were analyzed using a FTIR spectrometer (model 6600, Jasco, Japan) equipped with an attenuated total reflection (ATR) diamond crystal window (ATR Pro One). The surface of each sample was pressed against the ATR window and infrared spectra were acquired in absorbance mode from 400 cm<sup>-1</sup> to 4000 cm<sup>-1</sup> at 2 cm<sup>-1</sup> resolution over 72 scans.

### **Variable pressure field emission scanning electron microscopy – energy dispersive X-ray spectroscopy (VP-FESEM-EDX)**

The topography of the MESM, the morphology and size of the magnetite nanoparticles, and the Pb content on the MESM after their incubation were studied using a Zeiss SUPRA40VPSEM instrument. Each MESM piece was placed flat on an Al stub and carbon coated with a Hitachi UHS evaporator (Japan). The SEM instrument was equipped with an X-ray dispersive energy microanalysis system (EDX) with an X-Max 500 mm large surface detector for elemental characterization.

### **X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)**

The Fe content of the MESM and ESM, following incubation with a solution containing an equivalent concentration of Fe<sup>3+</sup> as for magnetite precipitation, as well as their Pb content after Pb adsorption, were analyzed with an X-ray photoelectron spectrometer Kratos Axis Ultra-DLData selected point on the sample surface (300 x 700 µm). The oxidation state of the iron and lead in ESM-Fe, MESM and MESM-Pb was determined by XPS, by comparing the determined element binding energies (eV) with a XPS database (<https://xpssimplified.com/periodictable.php>).

### **X-ray diffraction (XRD)**

Samples of ESM after iron loading, as well as MESM before and after lead loading, were analyzed using an Xpert Pro X-Ray powder diffractometer (PANalytical, The Netherlands) with Cu K $\alpha$  radiation. Theta-2Theta scans were registered from 3 to 70° with a step size of 0.04° and an integration time of 100 seconds per step. The data were analysed with X Powder X software to identify the mineral phase(s) present in the samples and their crystallinity.

### **Atomic absorption spectroscopy (AAS)**

The Pb content of 4 x 4 cm pieces of ESM and MESM, after their incubation for 48 h in Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> solutions containing 25, 50 or 75 ppm of Pb<sup>2+</sup>, was determined using an atomic absorption spectrometer VARIAN SPECTRAA 140. The amount of Pb absorbed to ESM or tMESM was calculated as the difference between the initial concentration of tPb in the solution and the final concentration remaining after the absorption experiment.

### **Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES)**

The absorption kinetics of Pb onto MESM prepared from whole egg ESM (about 104 ± 7 cm<sup>2</sup>) was determined by incubating in Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> solutions containing 25, 50 or 75 ppm of Pb for different times (1, 4, 8, 24 and 48 h). The amounts of Pb and MNPs absorbed on the membrane were determined by dissolving the entire membrane in 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 65% nitric acid 1:1 (v/v) and measuring the lead and iron concentration using a Spectrometer ICP-OES Perkin-Elmer OPTIMA 8300 (dual vision).

### **Conclusions**

In the present work MESM were successfully synthesized using a green coprecipitation method. Investigation of the influence of a magnetic field during MESM production revealed a marked effect on the MNP features, producing long strands of nearly spherical magnetite nanoparticles MNPs distributed along the ESM fibers. In contrast, agglomerates of smaller particles with a random disposition are formed in the absence of the magnetic field. Under all experimental conditions, the MNPs are formed on both sides of the ESM surface, being more noticeable on the outer surface, confirming the specificity of the interaction between magnetite particles and ESM fibrils that are acting as an active surface for nucleation. Spectroscopic data (FTIR) suggest that there is a specific interaction between protein molecular groups and magnetite surface groups, demonstrating that the association of the MNPs to the ESM is a true interaction and not just a simple deposition. These manufactured MESM have the capacity to efficiently remove Pb<sup>2+</sup> from contaminated water, a synergy existing between the MNPs and the ESM that increase the efficiency of the removal more than 10 times compared to that of the ESM component alone. These results suggest the MESM could be potentially applied as an effective remediation biomaterial in separation/removal of heavy metal ions or other charged pollutants from contaminated water.

## Acknowledgements

We are grateful for financial support through grants CGL2015-64683-P and CGL2016-76723 from the Ministerio de Economía y Competitividad from Spain and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and RNM-179 group (Junta de Andalucía, Spain) (A.R.N.). The participation of M.H. was supported by the Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, RGPIN-2016-04410; CRDPJ-514335-17). The work of J.D.P.P. was supported by the grant “Iniciación a la Investigación” provided by the University of Granada. Thanks go to CIC personnel of the University of Granada for technical assistance in XPS, ICP-OES, AAS, and FESEM-EDX analyses.

## References

- [1] D. Adriano, in *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals*, New York, 2001, Springer-Verlag.
- [2] Z. Elouear, J. Bouzid, N. Boujelben, M. Feki, F. Jamoussi, A. Montiel, Heavy metal removal from aqueous solutions by activated phosphate rock, *J. Hazard. Mater.*, 2008, **156**, 412–420.
- [3] A. Begum, M. Ramaiah, Harikrishna, I. Khan, K. Veena, Analysis of heavy metals concentration in soil and lichens from various localities of hosur road, Bangalore, India, *J. Chem. (Hindawi. Online)*, 2009, **6**, 13–22.
- [4] N. Coleman, A. Castrejon, C. Blaine, T. Chemmachel, in *The toxicology of essential and nonessential metals*, ed. Academic Press, London, 2017, pp. 369.
- [5] V.H. Lokhande, T.D. Nikam, V.Y. Patade, M.L. Ahire, P. Suprasanna, Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and *in vitro* growth responses in *Sesuvium portulacastrum*, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2011, **104**, 41–49.
- [6] A.M. Scheuhammer, The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: a review, *Environ. Pollut.*, 1987, **46**, 263–95.
- [7] L. Gangoso, P. Álvarez-Lloret, Alejandro. A.B. Rodríguez-Navarro, R. Mateo, F. Hiraldo, J.A. Donázar, Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources, *Environ. Pollut.*, 2009, **157**, 569–574.
- [8] M. Martinez-Haro, A.J. Green, R. Mateo, Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in waterbirds in the field, *Environ Res.*, 2011, **111**, 530–538.
- [9] F. Fu, Q. Wang, Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review, *J. Environ. Manage.*, 2011, **92**, 407–418.

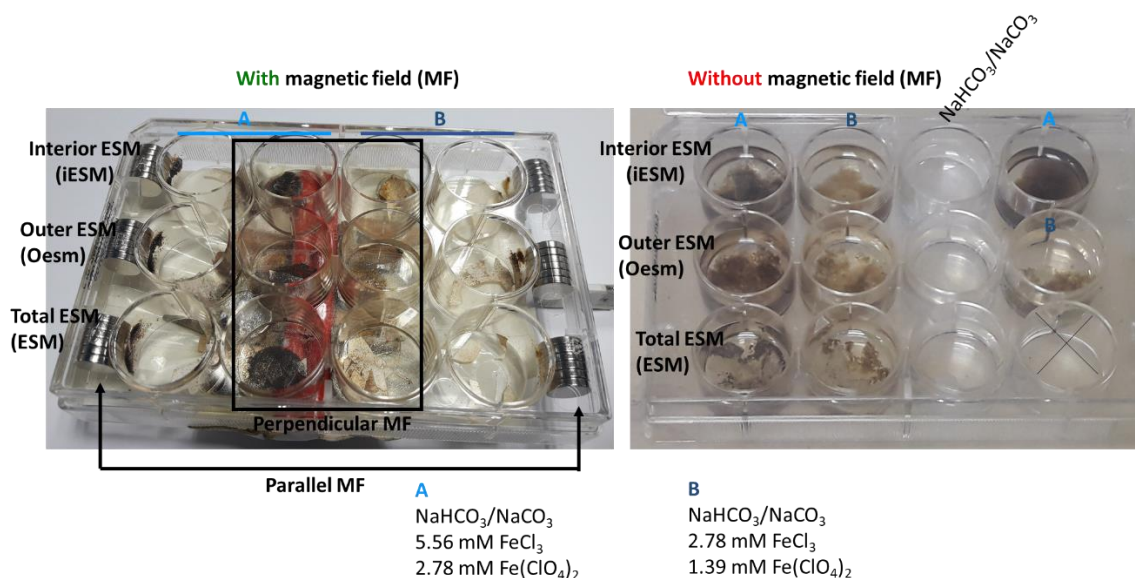
- [10] H. Karami, Heavy metal removal from water by magnetite nanorods, *Chem. Eng. J.*, 2013, **219**, 209–216.
- [11] G. Crini, Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment, *Prog. Polym. Sci.*, 2005, **30**, 38–70.
- [12] A.E. Burakova, E.V. Galunina, I.V. Burakova, A.E. Kucherova, S. Agarwal, A.G. Tkacheva, V.K. Gupta, Adsorption of heavy metals on conventional and nanostructured materials for wastewater treatment purposes: A review, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2018, **148**, 702–712.
- [13] N. Singh, S.K. Gupta, Adsorption of heavy metals: A review, *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.*, 2016, **5**, 2267–2281.
- [14] A.D. Darwish, Fullerenes, *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A: Inorg. Chem.*, 2013, **109**, 436–452.
- [15] A. Burakov, I. Romantsova, A. Kucherova, A. Tkachev, Removal of heavy-metal ions from aqueous solutions using activated carbons: effect of adsorbent surface modification with carbon nanotubes, *Adsorpt. Sci. Technol.*, 2014, **32**, 737–747.
- [16] A. Melezhyk, N. Memetov, A. Tkachev, V. Grachev, B. Myasoedov, Chemistry and technology for large-scale synthesis of graphene Nnanoplatelets, *Asian J. Pharm.*, 2016, **10**, 298–305.
- [17] T.A. Ahmed, H.P. Suso, M.T. Hincke, In-depth comparative analysis of the chicken eggshell membrane proteome, *J. Proteomics*, 2017, **155**, 49–62.
- [18] T.A.E. Ahmed, G. Kulshreshtha and M.T. Hincke, Value Added Uses of Eggshell and Eggshell Membranes. Chapter 19 in *Eggs as Functional Foods and Nutraceuticals for Human Health*, ed. J. Wu, Royal Society of Chemistry, 2019, 359–397.
- [19] C.M. Cordeiro and M.T. Hincke, Recent patents on eggshell: shell and membrane applications, *Recent Pat. Food Nutr. Agriculture*, 2011, **3**, 1–8.
- [20] M.T. Hincke, Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A.B. Rodriguez-Navarro, M.D. McKee, The eggshell: structure, composition and mineralization, *Front. Biosciences (Landmark Ed)*, 2012, **17**, 1266–1280.
- [21] M.S. Fernandez, K. Passalacqua, J.I. Arias, and J.L. Arias, Partial biomimetic reconstitution of avian eggshell formation, *J. Struct. Biol.*, 2004, **148**, 1–10.
- [22] K. Suyama, Y. Fukazawa, Y. Umetsu, A new biomaterial, hen egg shell membrane, to eliminate heavy metal ion from their dilute waste solution, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1994, **45–46**, 871–9.
- [23] S. Ishikawa, K. Suyama, I. Satoh, Biosorption of actinides from dilute waste actinide solution by egg-shell membrane, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1999, **78**, 521–533.
- [24] S. Ishikawa, K. Suyama, K. Arihara, M. Itoh, Uptake and recovery of gold ions from electroplating wastes using eggshell membrane, *Bioresour. Technol.*, 2002, **81**, 201–206.

- [25] S. Ishikawa, K. Suyama, K. Arihara, M. Itoh, Selective recovery of uranium and thorium ions from dilute aqueous solutions by animal biopolymers, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2002, **86**, 227–36.
- [26] M.L. Chen, C.B. Gu, T. Yang, Y. Sun, J.H. Wang, A green sorbent of esterified egg-shell membrane for highly selective uptake of arsenate and speciation of inorganic arsenic, *Talanta*, 2013, **116**, 688–94.
- [27] N.N. Nassar, Rapid removal and recovery of Pb(II) from wastewater by magnetic nanoadsorbents, *J. Hazard. Mater.*, 2010, **184**, 538–546.
- [28] T.M. Petrova, L. Fachikov, J. Hristov, The magnetite as adsorbent for some hazardous species from aqueous solutions: a review, *Int. Rev. Chem. Eng.*, 2011, **3**, 134–152.
- [29] F. Ahmed, D.F. Rodrigues, Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: a case study, *J. Hazard. Mater.*, 2013, **256–257**, 33–39.
- [30] S. Rajput, U.C Pittman, D. Mohan, Magnetic magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticle synthesis and applications for lead (Pb<sup>2+</sup>) and chromium (Cr<sup>6+</sup>) removal from water, *J. Colloid Interface Sci.*, 2016, **468**, 334–346.
- [31] T. Wang, X. Jin, Z. Chen, M. Megharaj, Simultaneous removal of Pb(II) and Cr(III) by magnetite nanoparticles using various synthesis conditions, *J. Ind. Eng. Chem.*, 2014, **20**, 3543–3549.
- [32] T. Perez-Gonzalez, A. Rodriguez-Navarro, C. Jimenez-Lopez, *J. Supercond. Nov. Magn.*, 2011, **24**, 549–557.
- [33] M. Naghizadeh, M.A. Taher, L.Z. Nejad, F.H. Moghaddam, Fabrication, characterization and theoretical investigation of novel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ egg-shell membrane as a green nanosorbent for simultaneous preconcentration of Cu(II) and Tl(I) prior to ETAAS determination, *Environ. Nanotechnol. Monit.*, 2018, **10**, 171–178.
- [34] M. Wong, M.J. Hendrix, K. von der Mark, C. Little, R. Stern, Collagen in the egg shell membranes of the hen, *Dev. Biol.*, 1984, **104**, 28–36.
- [35] E. Sourty, D.H. Ryan, R.H. Marchessault, Characterization of magnetic membranes based on bacterial and man-made cellulose, *Cellulose*, 1998, **5**, 5–17.
- [36] S. Galland, R.L. Andersson, M. Salajková, V. Ström, R.T. Olsson, L.A. Berglund, Cellulose nanofibers decorated with magnetic nanoparticles – synthesis, structure and use in magnetized high toughness membranes for a prototype loudspeaker, *J. Mater. Chem. C*, 2013, **1**, 7963-7972.
- [37] M. Wei-Ting, S.R. Kumara, C.-T. Hsua, C.-M. Shiha, S.-W. Tsai, C.-C. Yang, Y.-L. Liud, S.J. Luea, Magnetic field-assisted alignment of graphene oxide nanosheets in a polymer matrix to enhance ionic conduction, *J. Membrane Sci.*, 2018, **563**, 259–269.

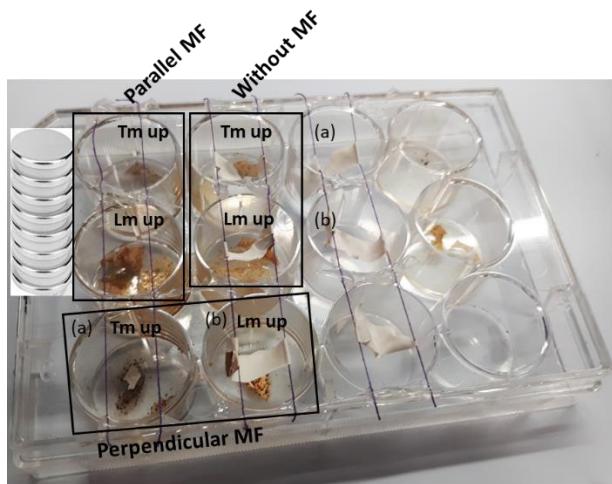
- [38] N. Chen, D. Wang, C. Long, Y. Li, C. Lu, F. Wang, H. Zhu, Magnetic field-oriented ferroferric oxide/poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide) hybrid membranes for anion exchange membrane applications, *Nanoscale*, 2018, **10**, 18680–18689.
- [39] M. Baláz, Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science, *Acta Biomater.*, 2014, **10**, 3827–3843.
- [40] W.T. Tsai, J.M. Yang, C.W. Lai, Y.H. Cheng, C.C. Lin, C.W. Yeh, Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane, *Bioresour. Technol.*, 2006, **97**, 488–493.
- [41] M. Veneranda, J. Aramendia, L. Bellot-Gurlet, P. Colomban, K. Castro, J.M. Madariaga, FTIR spectroscopic semi-quantification of iron phases: A new method to evaluate the protection ability index (PAI) of archaeological artefacts corrosion systems, *Corros. Sci.*, 2018, **133**, 68–77.
- [42] Y. Bagbi, A. Sarswat, D. Mohan, A. Pandey, P.R. Solanki, Lead (Pb<sup>2+</sup>) adsorption by monodispersed magnetite nanoparticles: Surface analysis and effects of solution chemistry, *J. Environ. Chem. Eng.*, 2016, **4**, 4237–4247.
- [43] S.J. Parikh, and J. Chorover, ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. *Langmuir*, 2006, **22**, 8492–8500.
- [44] J. Ma, I.M. Pazos, W. Zhang, R.M. Culik, F. Gai, Site-specific infrared probes of proteins, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2015, **66**, 357–377.
- [45] J.J.M. Lenders, H.R. Zope, A. Yamagishi, P.H.H. Bomans, A. Arakaki, A. Kros, G. de With, N.A.J.M. Sommerdijk, Bioinspired Magnetite Crystallization Directed by Random Copolypeptides, *Adv. Funct. Mater.*, 2015, **25**, 711–719.
- [46] J. Baumgartner, M.A. Carillo, K.M. Eckes, P. Werner, D. Faivre, Biomimetic magnetite formation: from biocombinatorial approaches to mineralization effects, *Langmuir*, 2014, **30**, 2129–2136.
- [47] É. Bereczk-Tompa, F. Vonderviszt, B. Horváth, I. Szalai, M. Pósfai, Biotemplated synthesis of magnetic filaments, *Nanoscale*, 2017, **9**, 15062–15069.
- [48] A.B. Rodríguez-Navarro, P. Marie, Y. Nys, M.T. Hincke, J. Gautron, Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: A new paradigm for understanding rapid eggshell calcification, *J. Struct. Biol.*, 2015, **190**, 291–303.
- [49] A. Zegeye, C. Mustin, F. Jorand, Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: green rust versus magnetite, *Geobiology*, 2010, **8**, 209–222.
- [50] A. Sumoondur, S. Shaw, I. Ahmed, L. G. Benning, Green rust as a precursor for magnetite: an *in situ* synchrotron based study, *Mineral. Mag.*, 2008, **72**, 201–204,
- [51] M.T. Hincke, J. Gautron, M. Panheleux, J. Garcia-Ruiz, M.D. McKee, Y. Nys, Identification and localization of lysozyme as a component of the eggshell membranes and shell matrix, *Matrix Biology*, 2000, **19**, 443–453.

- [52] M. Xu, Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Shen, M. Zhao, G. Pan, Study on the adsorption of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  by magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  yeast treated with EDTA dianhydride, *Chem. Eng. J.*, **168**, 2011, 737–745.
- [53] J. Wang, S. Zheng, Y. Shao, J. Liu, Z. Xu, D. Zhu, Amino-functionalized  $\text{Fe(3)O(4)@SiO(2)}$  core-shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **349**, 293–299.
- [54] T.K. Naiya, A.K. Bhattacharya, S.K. Das, Adsorption of  $\text{Cd(II)}$  and  $\text{Pb(II)}$  from aqueous solutions on activated alumina, *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, **333**, 14–26.
- [55] A. Maghsodi, L. Adlnasab, M. Shabanian, M. Javanbakht, Optimization of effective parameters in the synthesis of nanopore anodic aluminum oxide membrane and arsenic removal by prepared magnetic iron oxide nanoparticles in anodic aluminum oxide membrane via ultrasonic-hydrothermal method, *Ultrason. Sonochem.*, 2018, **48**, 441–452.
- [56] L. Li, F. Wang, Y. Lv, J. Liu, D. Zhang, Z. Shao, Halloysite nanotubes and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles enhanced adsorption removal of heavy metal using electrospun membranes, *Appl. Clay Sci.*, 2018, **161**, 225–234.

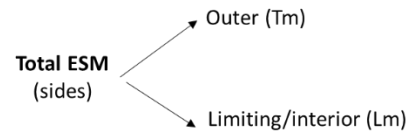
### Supporting information



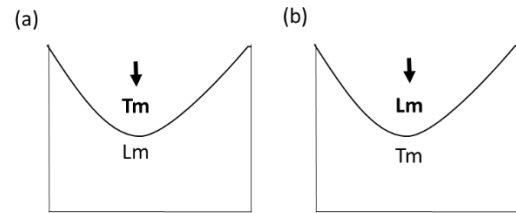
**Figure S1.** Experimental design of total ESM deposited in the bottom of 12 well-plates and incubated with magnetite coprecipitation solutions in the absence and presence of a magnetic field (MF).



$\text{NaHCO}_3/\text{NaCO}_3$   
 5.56 mM  $\text{FeCl}_3$   
 2.78 mM  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$

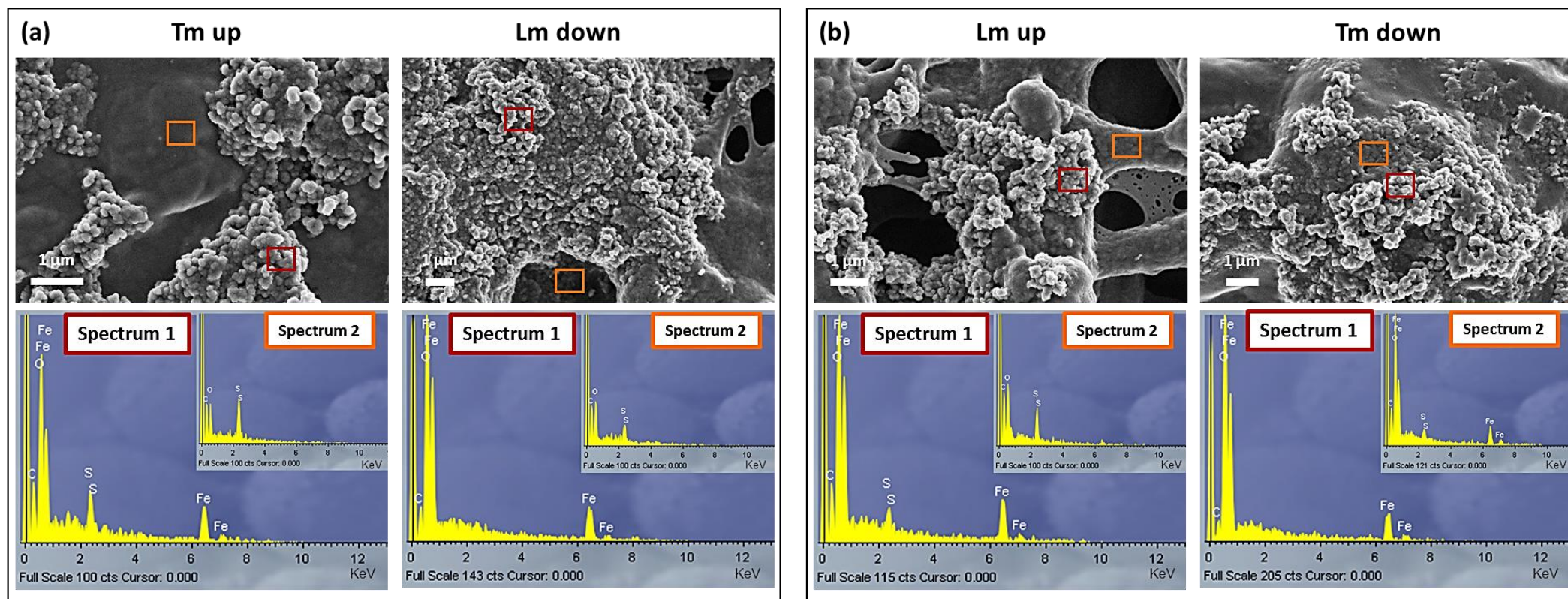


Options: depending on which side of the ESM the magnetite will be deposited

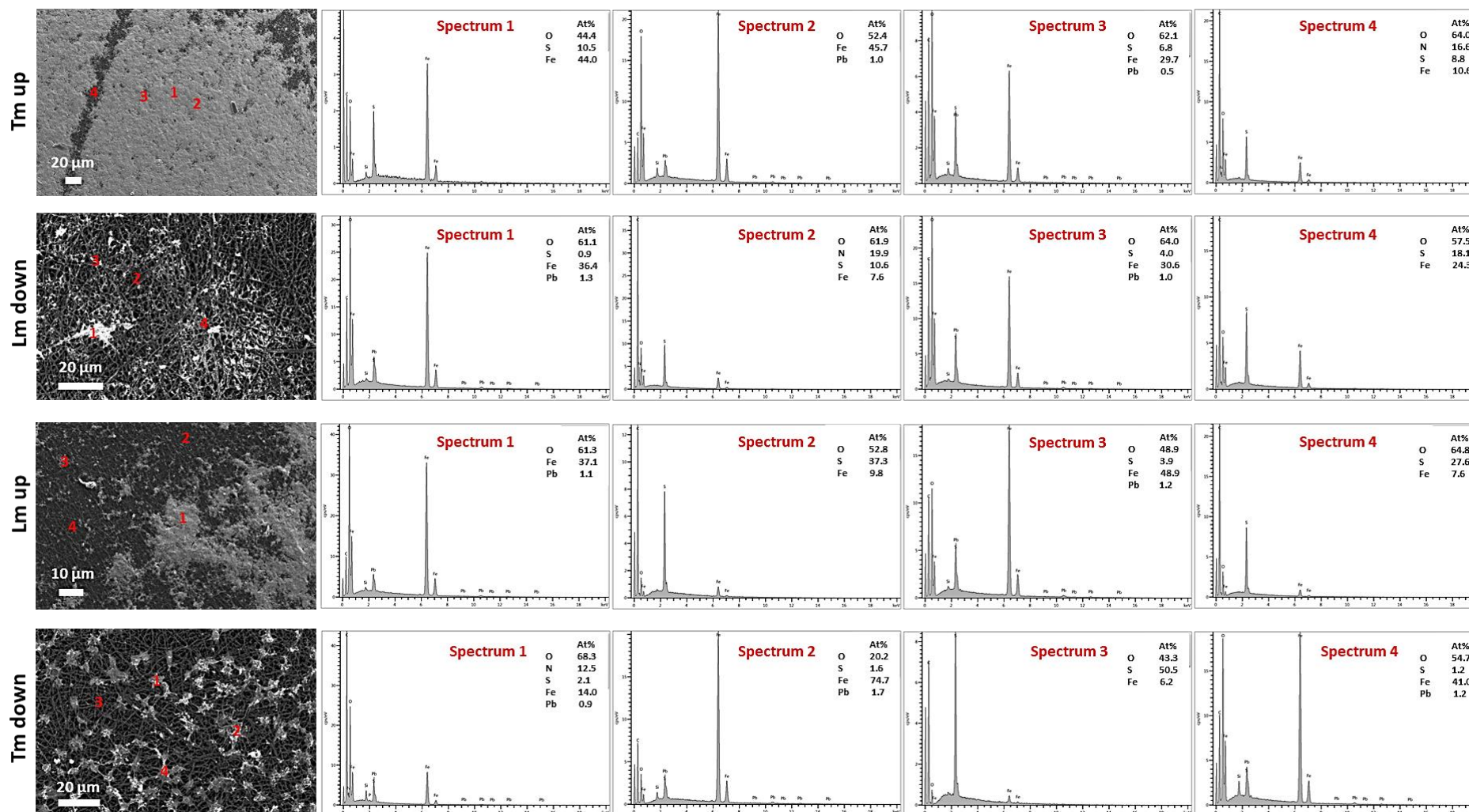


**Figure S2.** Experimental design of total ESM hanging into the magnetite coprecipitation solutions in a 12 well plates, exposing their outer (Tm) or interior/limiting (Lm) surfaces up or down, incubated in presence of a parallel magnetic field (MF).





**Figure S3.** VP-FESEM micrographs and EDX elemental microanalysis of MESM, exposing (a) the outer (Tm) surface up or (b) the interior/limiting (Lm) surface up.



**Figure S4.** VP-FESEM micrographs and EDX elemental microanalysis of MESM, exposing their outer (Tm) or interior/limiting (Lm) surfaces up or down, incubated with 25 ppm Pb<sup>2+</sup>.



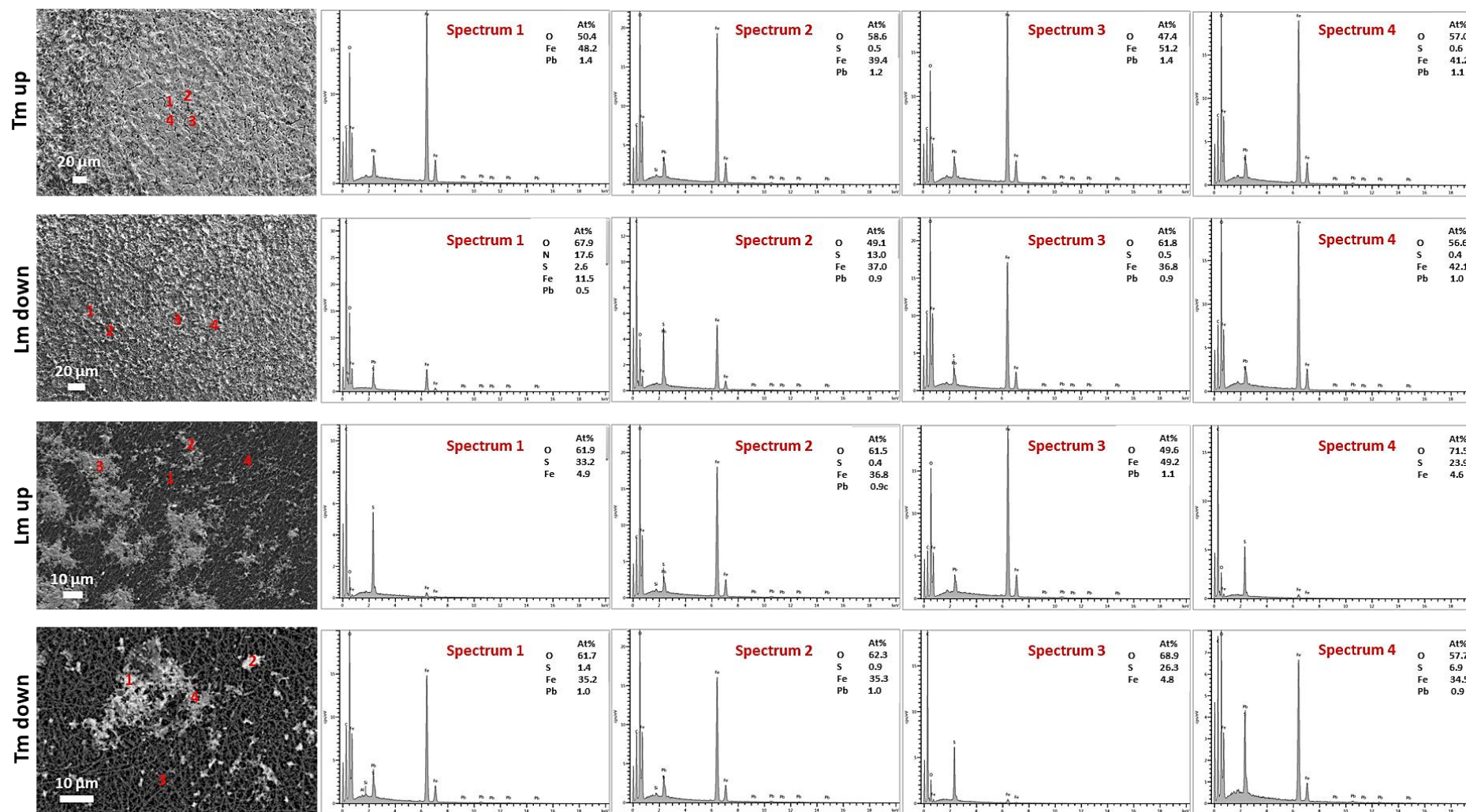


Figure S5. VP-FESEM micrographs and EDX elemental microanalysis of MESM, exposing their outer (Tm) or interior/limiting (Lm) surfaces up or down, incubated with 50 ppm Pb<sup>2+</sup>.

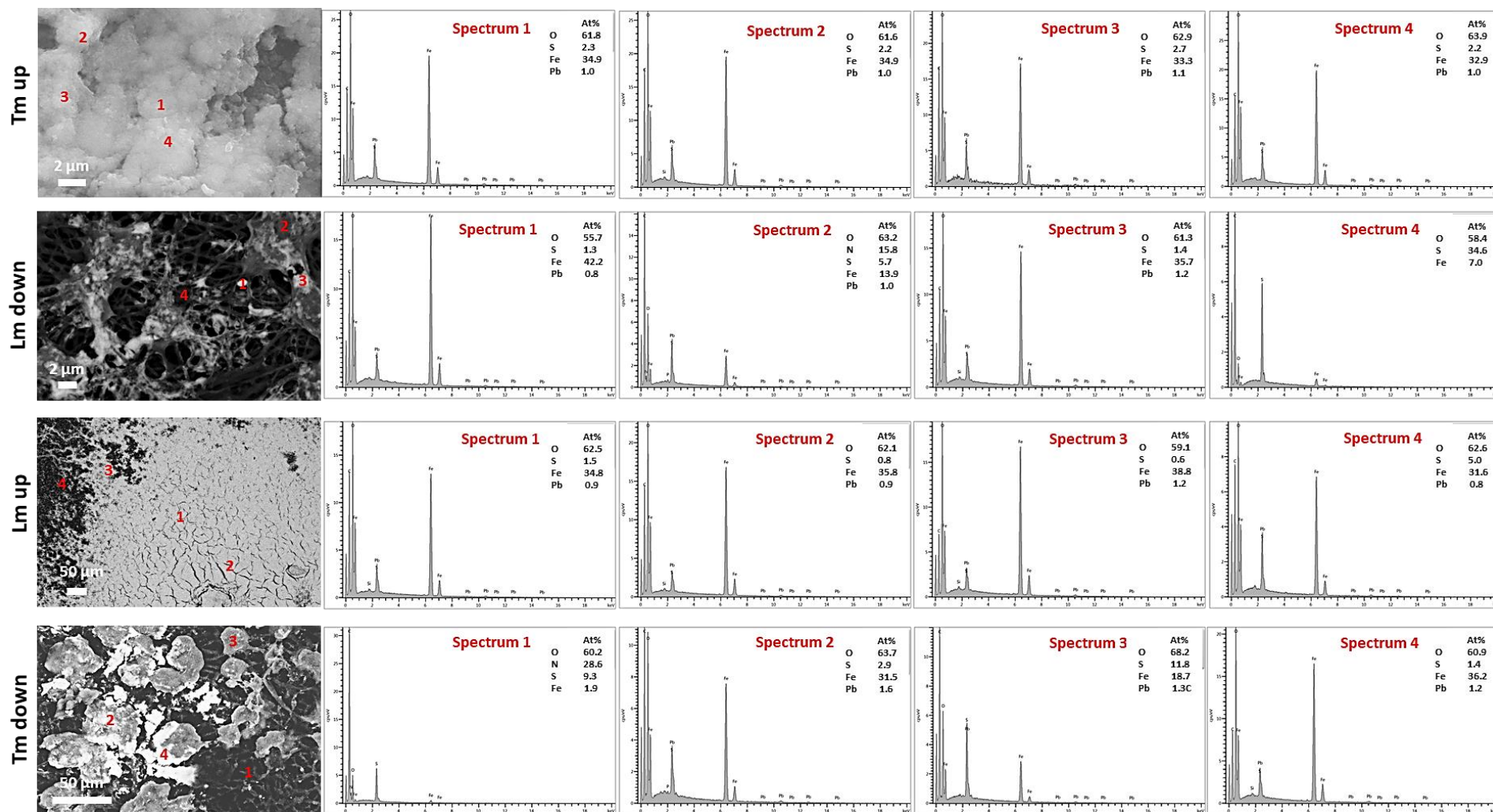
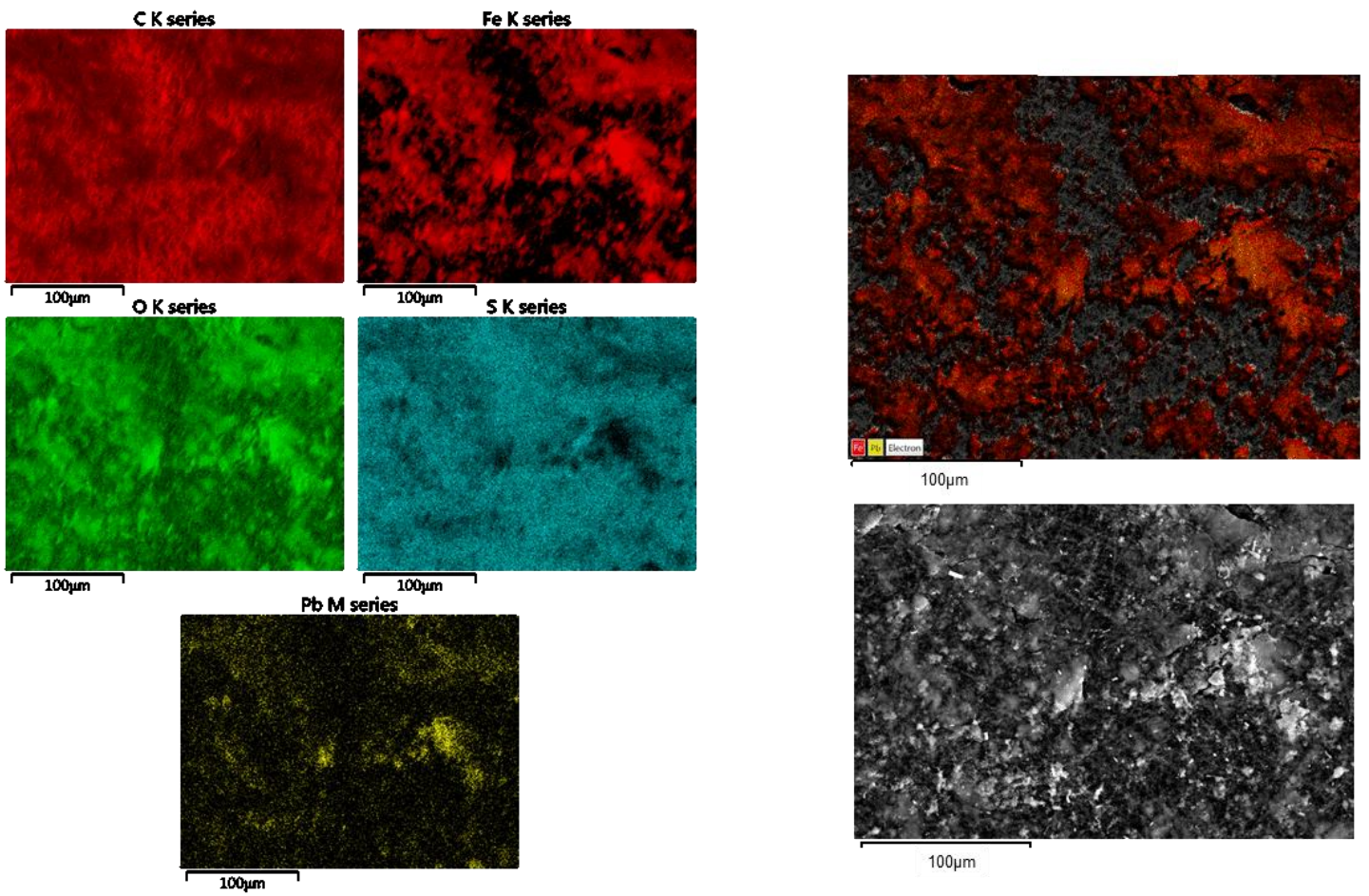
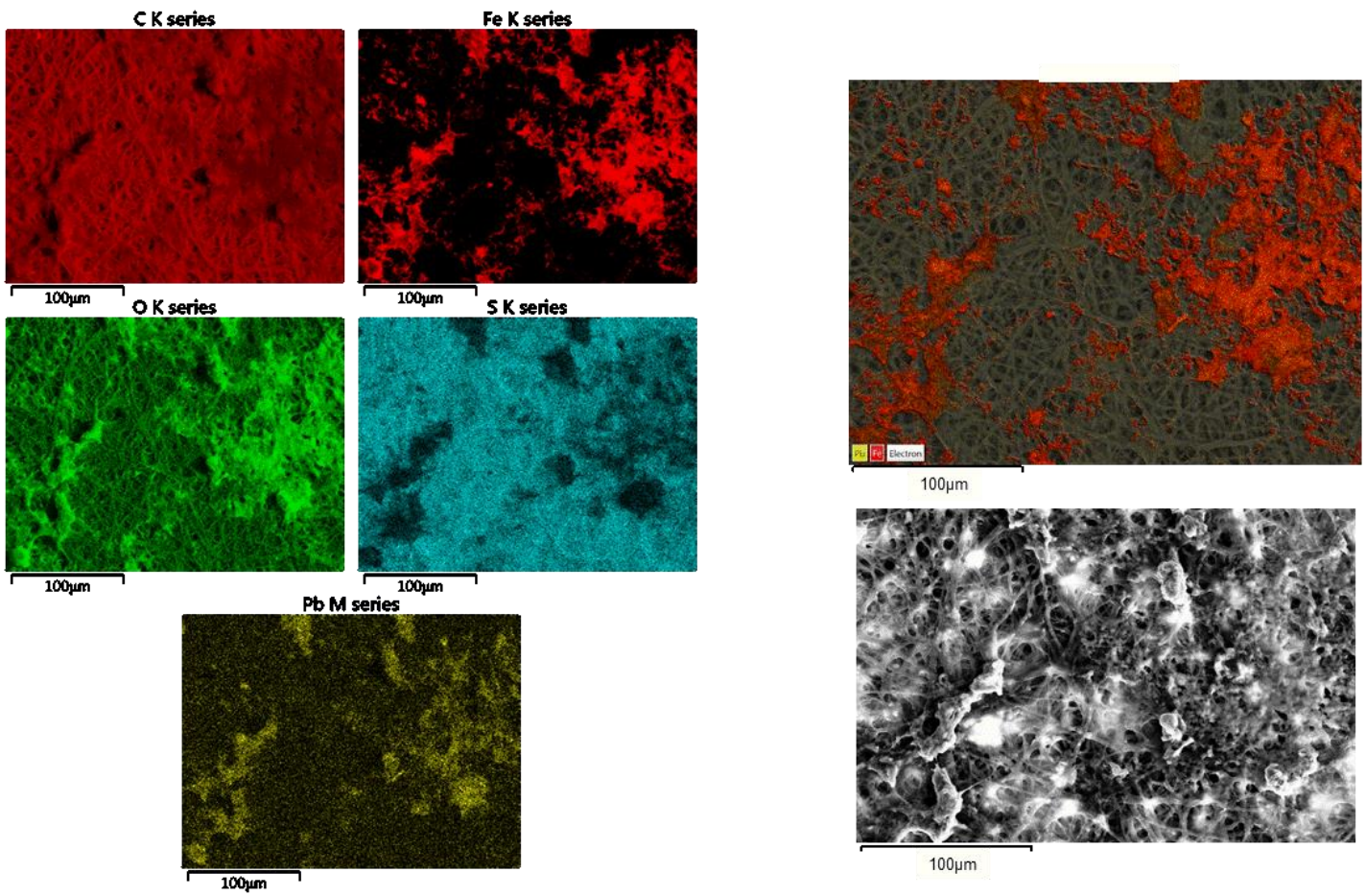


Figure S6. VP-FESEM micrographs and EDX elemental microanalysis of MESM, exposing their outer (Tm) or interior/limiting (Lm) surfaces up or down, incubated with 75 ppm  $Pb^{2+}$ .



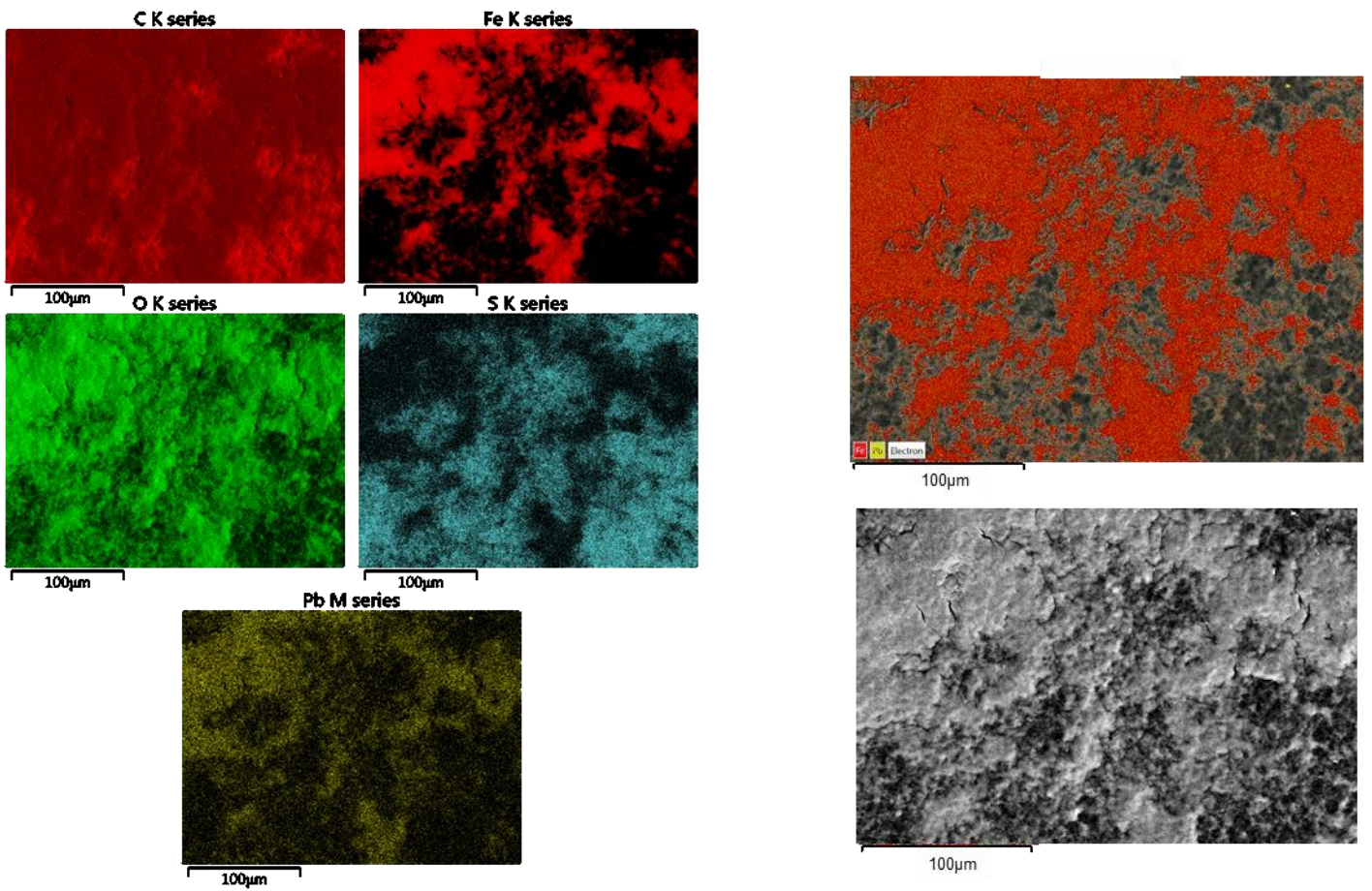


**Figure S7.** Elemental mapping by VP-FESEM-EDX of MESM, exposing its outer (Tm) surface up, incubated with 75 ppm  $Pb^{2+}$ .

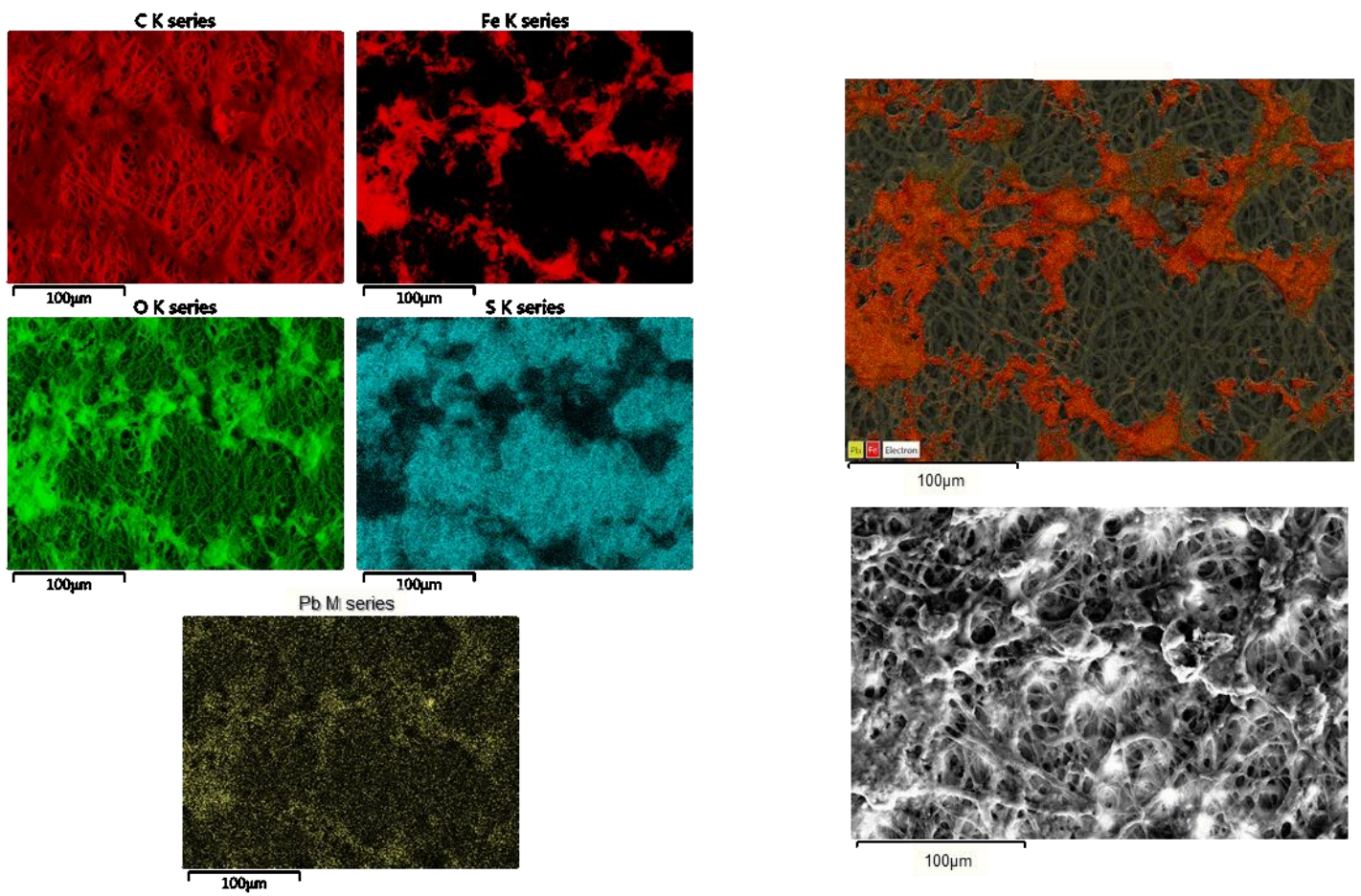


**Figure S8.** Elemental mapping by VP-FESEM-EDX of MESM, exposing its interior/limiting (Lm) surface down, incubated with 75 ppm  $Pb^{2+}$ .





**Figure S9.** Elemental mapping by VP-FESEM-EDX of MESM, exposing its interior/limiting (Lm) surface up, incubated with 75 ppm Pb<sup>2+</sup>.



**Figure S10.** Elemental mapping by VP-FESEM-EDX of MESM, exposing its outer (Tm) surface down, incubated with 75 ppm  $\text{Pb}^{2+}$ .



## **DISCUSIÓN**

El número de publicaciones científicas relacionadas con materiales magnéticos ha aumentado en los últimos años, indicando un creciente interés por la comunidad científica. Esto es debido las idóneas propiedades fisicoquímicas de las MNPs, como su alta estabilidad química, su alta relación/superficie volumen y sus propiedades magnéticas únicas, que permiten su uso en multitud de aplicaciones diferentes (Colombo *et al.*, 2012). Además, las MNPs se pueden recubrir o embeber en diferentes materiales para aumentar su estabilidad física y química (Biehl *et al.*, 2018). Por tanto, la combinación de la capacidad para responder a un campo magnético externo y las innumerables posibilidades de recubrimientos hacen de los materiales magnéticos una herramienta universal para la separación o el transporte magnético de diversas moléculas (Furlani, 2010). Lo difícil es encontrar las MNPs correctas para cada aplicación específica pues los requerimientos varían enormemente entre las distintas aplicaciones. En el campo de la biomedicina es imprescindible un riguroso control de las propiedades de las MNPs, especialmente del tamaño, la carga superficial y la respuesta magnética (McNeil, 2009; Nel *et al.*, 2009; Prozorov *et al.*, 2013), porque *in vivo* hay multitud de factores que pueden alterar el comportamiento de las MNPs, y cambiar drásticamente el resultado esperado. Por el contrario, para aplicaciones ecológicas como la nanorremediación estos requerimientos no son tan estrictos. Aunque las nanopartículas se definan generalmente como partículas con dimensiones de menos de 100 nm (Rauscher *et al.*, 2015), en la práctica, la nanorremediación puede aplicarse a partículas/materiales más grandes, por ejemplo, compuestos o materiales híbridos que incluyan actividades a dimensiones de nanoescala. En este caso, lo más importante es utilizar de materiales seguros para el ambiente, que permitan eliminar eficazmente el contaminante de interés y puedan recuperarse fácilmente sin pasos adicionales y costosos en el proceso. Uno de los métodos más recomendados, que se usa ampliamente debido a su eficiencia, es la adsorción de los contaminantes en materiales sólidos, fáciles de manejar y de bajo coste (Crini, 2005; Karami, 2013; Burakova *et al.*, 2018). En este sentido, las MNPs han mostrado gran estabilidad ambiental, elevada capacidad de adsorción, debido a su alta relación superficie/tamaño, eficiencia de eliminación, y fácil y rápido manejo (Crane y Scott, 2012; Tang *et al.*, 2013). Asimismo, su naturaleza no tóxica permite que puedan utilizarse directamente en los lugares contaminados sin riesgo de contaminación secundaria (Li *et al.*, 2003a, b), y sus propiedades magnéticas facilitan el proceso de separación, evitando el uso de técnicas de separación adicionales, como filtración o centrifugación. Además, cuando las MNPs se combinan con

polímeros pueden reunir propiedades específicas deseadas de cada uno de los componentes, siendo potencialmente más eficientes, selectivos, y estables que los métodos basados en un único nanocompuesto (Xu *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2016; Guerra *et al.*, 2018). En este contexto, la membrana de la cáscara de huevo (ESM) es un residuo biológico abundante de la industria del procesamiento de alimentos que podría utilizarse como adsorbente verde. Las ESM son un biomaterial a base de colágeno con un gran área superficial formado por una red estable de fibras reticuladas insolubles en agua (Cordeiro y Hincke, 2011; Hincke *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2017, 2019). Además, diversos estudios han demostrado la capacidad de las MNPs (Nassar, 2010; Petrova *et al.*, 2011; Ahmed y Rodrigues, 2013; Karami, 2013; Wang *et al.*, 2014; Rajput *et al.*, 2016) y de la ESM (Suyama *et al.*, 1994; Ishikawa *et al.*, 2002a, b; Chen *et al.*, 2013b) para la adsorción de metales pesados de soluciones acuosas. Por ello, en esta Tesis Doctoral, proponemos una nueva estrategia para transformar las ESM en ESM magnéticas (MESM), decorando las fibras de la membrana con MNPs para facilitar su recolección utilizando un campo magnético externo consistente en un imán de neodimio de 1.8 kg de tracción (Magnet Expert Ltd) que permite su recolección en solo 2 segundos, y sin ningún tratamiento adicional.

En el proceso de síntesis de las MESM se observó que, aunque las MNPs recubrieron ambas superficies de la ESM, la cantidad de MNPs en la superficie interna fue menor que en la externa. Esto es debido a que las fibras de la ESM interna están cubiertas por una capa de material proteico rico en azufre, previamente identificada como membrana limitante (Hincke *et al.*, 2000), que posiblemente impide la penetración de los reactivos de mineralización, inhibiendo o reduciendo el crecimiento de magnetita en estas fibras. Además, la mineralización de las fibrillas más delgadas de la ESM interna es probablemente desfavorable en comparación con las más gruesas de la ESM externa (Wong *et al.*, 1984). Estos resultados son similares a hallazgos previos sobre la nucleación de nanopartículas en fibras que actúan como sitios de nucleación (Sourty *et al.*, 1998; Galland *et al.*, 2013). Además, como ocurre en las MESM, Galland *et al.* (2013) detectaron menos nanopartículas y más pequeñas asociadas a fibras de celulosa más delgadas (y raramente entre las fibras) posiblemente porque proporcionaron sitios de nucleación inestables o pobres en comparación con los disponibles en los haces de fibrillas más gruesas. Es interesante destacar que las MNPs se encontraban embebidas dentro de las fibras de la ESM, y no solo depositadas en sus superficies. Otros autores también observaron la formación de MNPs dentro de las

fibras reticuladas de la ESM (Naghizadeh *et al.*, 2018). Esto indica que la formación de las MESM no es una simple precipitación de las MNPs de la solución con posterior depósito por sedimentación en las ESM, sino que la nucleación y el crecimiento de las MNPs se favorecen en la ESM porque ésta proporciona una superficie adecuada para el crecimiento de los cristales y/o una afinidad específica por los cationes de Fe. Para confirmar esta hipótesis, la ESM se incubó en soluciones de FeCl<sub>3</sub> (utilizadas en la reacción de mineralización de magnetita para producir las MESM) y el contenido elemental de las membranas resultantes se determinó mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR). Esta técnica mostró picos característicos de sales de hidroxloruro ferroso (Veneranda *et al.*, 2018) en las membranas, lo que es consistente con el hecho de que las ESM se incubaron en FeCl<sub>3</sub>, y confirma que el Fe interactúa con la ESM.

Una vez demostrado que las MNPs se forman en la ESM mediante la asociación específica Fe-ESM, caracterizamos las MESM mediante diferentes técnicas, a fin de analizar qué cambios se producen en relación a las ESM. Mediante FT-IR observamos que los picos principales de la ESM se mantienen en la MESM con pocos cambios. Estos cambios consistieron, en primer lugar, en la aparición de un pico característico del enlace Fe-O de la magnetita (Bagbi *et al.*, 2016) en la MESM que no se detecta en la ESM, y que tampoco aparece en otros óxidos de hierro/minerales de hidróxido, como la hematita, goethita, o maghemita, lo que confirma la formación de magnetita durante la síntesis de las MESM. Además, los análisis de difracción de rayos X (XRD) y de Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) realizados en las MESM corroboraron la presencia de magnetita como única fase mineral presente en la MESM. En segundo lugar, otro de los cambios que se observaron es que los picos correspondientes a las Amidas II y III en la MESM se desplazan ligeramente y se produce una disminución general en su intensidad en comparación con la ESM. Esto puede estar relacionado con cambios en la estructura secundaria de proteínas (Parikh y Chorover, 2006) de la ESM, y con la unión de los iones de Fe procedentes de las MNPs a los grupos amino de las proteínas a través de enlaces de hidrógeno (Ma *et al.*, 2015). Esta interacción podría concentrar los iones de Fe en la superficie de las fibras de la ESM, como habíamos observado también al incubar la ESM con soluciones de FeCl<sub>3</sub>, y favorecer la nucleación de magnetita (es decir, el efecto ionotrópico), o producir un efecto molde si existiera una correspondencia entre la disposición de los grupos moleculares de las proteínas y los iones de Fe en la superficie de la magnetita (Bereczk-Tompa *et al.*, 2017).

Finalmente, en relación a la caracterización de las MESM, también analizamos la influencia de un campo magnético externo en la formación de las MNPs en la ESM. Al exponer la solución de mineralización de magnetita, donde estaba sumergida la ESM, al campo magnético se formó una mayor densidad de nanopartículas, de aproximadamente 50 nm de diámetro, organizadas en hebras a lo largo de la superficie de las fibras de la ESM. Por el contrario, se producían aglomerados de partículas más pequeñas con una disposición aleatoria en ausencia del campo magnético. Otros autores (Wei-Ting *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018) también observaron la alineación de MNPs sobre otras membranas híbridas como consecuencia del efecto de un campo magnético, a diferencia de la agrupación aleatoria observada en ausencia de campo magnético.

Posteriormente, evaluamos el potencial de las MESM sintetizadas en presencia del campo magnético, debido a que presentaban una mejor exposición de las MNPs en la ESM, para eliminar metales pesados y, en concreto Pb como modelo, de aguas contaminadas. Para ello, volvimos a caracterizar mediante diferentes técnicas las MESM, pero en este caso después de su incubación en soluciones que contenían Pb (soluciones de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ). Los análisis de XRD revelaron que no había modificación en el espaciado-d de la magnetita de la MESM ni tampoco en las intensidades de sus picos después de la adsorción de Pb a las MESM. Esto indica que la eliminación de Pb de la solución se produce a través de un proceso de adsorción en las MNPs y no por la formación de una fase mineral nueva o modificada dopada con Pb. Estos datos son consistentes con los resultados de XPS del estado de oxidación del Pb unido a la MESM, que muestran que está formando óxidos metálicos, asociándose a los oxígenos de la magnetita sin modificar su estructura.

En cuanto a la capacidad de adsorción de Pb, aunque las ESM también lo adsorben, las MESM exhibieron una eficiencia de eliminación de Pb diez veces mayor, lo que sugiere que la mayor parte del Pb en solución es eliminado por las MNPs. Las MNPs embebidas en la ESM mostraron una capacidad máxima para absorber iones de Pb de entre 1 a 29 veces mayor que la mostrada para otros adsorbentes magnéticos de bajo coste (Nassar *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010, 2014; Karami, 2013; Rajput *et al.*, 2016). Esto puede ser debido al efecto de la distribución de las partículas diseminadas en la ESM y su consecuente alto grado de exposición. Además, los mapas elementales realizados por espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) de las Pb-MESM mostraron que la distribución de la mayor parte del Pb coincide con la del Fe procedente de las MNPs, lo que nuevamente indica que el Pb se absorbe

principalmente a las MNPs. Esto puede deberse a la alta relación superficie/volumen y a los sitios específicos cargados en la superficie de las MNPs, que favorecen la adsorción de iones metálicos, como también han demostrado otros autores (Petrova *et al.*, 2011). Así, los iones metálicos se unen a los grupos de superficie Fe-OH de las MNPs, que pueden estar cargados negativa o positivamente dependiendo del pH del agua que se quiere tratar, ya sea por disociación ( $\equiv \text{FeOH} \rightarrow \equiv \text{FeO}^- + \text{H}^+$ ) o asociación ( $\equiv \text{FeOH} + \text{H}^+ \rightarrow \equiv \text{FeOH}^+$ ) de los protones, respectivamente. Por tanto, el pH al que se produce la adsorción del metal es de gran importancia, ya que podría cambiar la especiación superficial de la magnetita y, por tanto, su capacidad para unir cationes (Petrova *et al.*, 2011). De hecho, otros autores han observado que a medida que el pH aumenta de 2 a 4, la eliminación de  $\text{Pb}^{2+}$  por nanopartículas de magnetita aumenta, mientras que por encima de pH 5, la eliminación de  $\text{Pb}^{2+}$  se mantiene constante. En nuestro caso, el pH (4.35) no tamponado de la solución de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , utilizada para imitar las condiciones del agua contaminada con Pb, parece favorable para la adsorción química de Pb en la superficie de la magnetita (Naiya *et al.*, 2009). Como consecuencia, en futuras aplicaciones potenciales de las MESM, el pH del agua contaminada debe tenerse en cuenta para garantizar la eficiencia del proceso de eliminación de metales pesados. En cualquier caso, en conjunto estos resultados indican que existe una sinergia en términos de adsorción de Pb entre las ESM y las MNPs embebidas en sus fibras, que resulta en una eficiencia mayor de las MESM para eliminar Pb.

Por otro parte, como ya hemos comentado previamente, el campo de la biomedicina muestra mayores exigencias en cuanto al control de las características de las MNPs en comparación con las aplicaciones ecológicas. En la liberación controlada de fármacos, uno de los requisitos más importantes es que las MNPs utilizadas como nanotransportadores respondan, de la manera más eficiente posible, a un campo magnético aplicado externamente para así poder guiar los nanotransportadores al sitio diana (Pankhurst *et al.*, 2003; Prozorov *et al.*, 2013). Esta respuesta depende del momento magnético por partícula que, a su vez, depende del tamaño de las MNPs (Li *et al.*, 2002). Para aplicaciones biomédicas, se prefiere el uso de nanopartículas superparamagnéticas que presenten un dominio único magnético (30-100 nm) porque muestran mayor coercitividad que partículas más pequeñas (Thomas-Keprta *et al.*, 2000; Bennet *et al.*, 2015). Además, el comportamiento superparamagnético garantiza que no haya magnetización remanente en ausencia de campo magnético, lo que reduce la aglomeración de las partículas *in vivo* y facilita su excreción (Williams *et al.*, 2009;

Mody *et al.*, 2014). El tamaño de las MNPs también es esencial para permitir su penetración en el tumor mediante el efecto mejorado de permeabilización y retención (EPR) (Maeda, 2001). La mayoría de los procesos de síntesis inorgánica de magnetitas producen distribuciones de tamaños no homogéneas y, generalmente, muy pequeñas (<30 nm) o demasiado grandes (>120 nm), no apropiadas para consuir una respuesta magnética eficiente. La descomposición térmica de precursores organometálicos en solventes orgánicos a temperaturas elevadas (~200 –360 °C) si permite controlar el tamaño de las MNPs, su monodispersidad y uniformidad (El-Boubbou *et al.*, 2018a). Sin embargo, este método tiene importantes desventajas asociadas, por un lado, a las altas temperaturas utilizadas que conllevan un aumento en los costes de producción y, por otro lado, a los solventes orgánicos utilizados que son altamente citotóxicos y son generalmente los únicos en los que se consigue la monodispersidad de las nanopartículas, presentando escasa dispersión en medios acuosos (como el torrente sanguíneo). Muchos de estos inconvenientes se evitarían con la utilización de magnetosomas, es decir, nanopartículas de magnetita, recubiertas por una bicapa lipídica, sintetizadas por las bacterias magnetotácticas (Prozorov *et al.*, 2013). Esto es consecuencia de su estructura cristalina perfecta, su alta pureza química, su morfología alejada del equilibrio y su estrecha distribución de tamaños, que las convierte en nanopartículas de dominio magnético único, mostrando así un alto momento magnético por partícula (Bazylinski y Frankel, 2004; Amemiya *et al.*, 2007; Prozorov *et al.*, 2013). Sin embargo, estas MNPs biológicamente controladas tienen un inconveniente crucial, que es el extremadamente bajo rendimiento en el que se pueden obtener de cultivos bacterianos, debido a su lento crecimiento y sus estrictos requisitos fisiológicos (Bazylinski *et al.*, 2013). Como consecuencia, los cultivos de bacterias magnetotácticas no pueden escalar a niveles industriales, y por lo tanto, aunque los magnetosomas sean las MNPs ideales, no puedan utilizarse en clínica. Para intentar resolver este problema, se están explorando diferentes alternativas, una de ellas es la biomimética, es decir, la producción *in vitro* de nanopartículas magnéticas similares a los magnetosomas mediante el uso de proteínas asociadas a los magnetosomas (MAPs), que son imprescindibles para la formación de magnetosomas *in vivo* (Mann, 2001). Además, la producción *in vitro* de nanopartículas biomiméticas es potencialmente escalable y rentable, dado que los experimentos de coprecipitación de magnetita se realizan a temperatura ambiente y 1 atm de presión mediante la simple adición de la proteína recombinante. En este contexto, se han probado varias MAPs y péptidos sintéticos en

diferentes experimentos de precipitación de magnetita *in vitro* para producir nanopartículas de magnetita biomiméticas (BMNPs) similares a los magnetosomas (Arakaki *et al.*, 2003, 2010; Amemiya *et al.*, 2007; Galloway *et al.*, 2012a, b; Rawlings *et al.*, 2014; Valverde-Tercedor *et al.*, 2015; Nudelman *et al.*, 2016, 2018). Estos autores han demostrado que las MAPs controlan la morfología, las propiedades superficiales y el tamaño de las nanopartículas y, por tanto, el momento magnético por partícula. En este contexto, esta Tesis Doctoral pretende caracterizar las BMNPs formadas *in vitro* en presencia de las proteínas MamC y Mms6 de *Magnetococcus marinus* MC-1. Esta caracterización incluye un análisis más exhaustivo de las MamC-BMNPs, ya que se evalúan particularidades que determinan su potencial eficacia como nanotransportadores dirigidos de fármacos.

En primer lugar, es importante comprender los procesos que se producen durante la mineralización de magnetita *in vitro*, así como las diferencias entre la ausencia y presencia de MAPs en la reacción. En los experimentos sin proteínas, y dado que el sistema está sobresaturado con respecto a la magnetita [ $\log\Omega_{\text{magnetite}} = 22.57$  (Valverde-Tercedor *et al.*, 2015)] se produce la nucleación en masa, que da lugar a la formación de una gran cantidad de cristales de pequeño tamaño debido, probablemente, a la concentración restringida de Fe, que es el paso limitante para el crecimiento de los cristales. El escenario es diferente cuando las proteínas están presentes ya que, al proporcionar sitios de nucleación, la nucleación de magnetita se favorece cinéticamente con respecto a la nucleación en masa (ya sea debido a los efectos ionotrópicos y/o molde) (Mann, 2001) y, por tanto, se forman menos núcleos que pueden crecer a tamaños más grandes en comparación con los formados en el experimento sin proteínas. Sin embargo, y dado que la concentración de Fe en solución es limitada, dicho fenómeno podría revertirse si el número de sitios de nucleación es demasiado grande. Esto explica por qué los cristales de magnetita producidos en los experimentos que contienen las concentraciones de proteína más altas fueron más pequeños que los que crecieron a concentraciones de proteína más bajas. Estos resultados están de acuerdo con la tendencia observada por Valverde-Tercedor *et al.* (2015).

En segundo lugar, sabiendo que la presencia de las MAPs favorece cinéticamente la nucleación de magnetita con respecto a la nucleación en masa, es necesario analizar las propiedades físico-químicas de estas MAPs y determinar qué efectos (ionotrópico y/o molde) producen de manera individual y combinada en la reacción de mineralización de magnetita *in vitro*. Esto, desde un punto de vista biológico, da



indicios sobre la posible función *in vivo* de estas MAPs y, desde un punto de vista aplicado, aporta información para sintetizar *in vitro* nanopartículas de magnetita similares a los magnetosomas.

En relación al efecto individual de Mms6, su análisis de secuencia múltiple mostró que el C-terminal está relativamente conservado en diferentes especies. En el caso de MC-1, el C-terminal de Mms6 contiene 3 tirosinas, 4 ácidos glutámicos, 1 ácido aspártico y 1 serina que pueden unir cationes metálicos (Lippard y Berg, 1995). Los aminoácidos ácidos (ácidos glutámico y aspártico) están presentes en el C-terminal de todas las proteínas Mms6 secuenciadas, variando únicamente el número de ellos (entre 5 y 7) entre las diferentes proteínas homólogas. Nudelman y Zarivach (2014) predijeron que la estructura secundaria de Mms6 de *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 muestra un N-terminal no estructurado con una región transmembrana y un C-terminal, con estructura hélice  $\alpha$  y alta concentración en aminoácidos ácidos, que están expuestos al lumen del magnetosoma y, que por tanto, podrían interactuar con el cristal de magnetita. De hecho, varios estudios han demostrado que el C-terminal de Mms6 de AMB-1 controla el tamaño y la morfología de la magnetita sintetizada *in vitro* (Amemiya *et al.*, 2007; Arakaki *et al.*, 2010; Bird *et al.*, 2016a, b). Se ha demostrado que los aminoácidos Asp123, Glu124, Glu125 (Yamagishi *et al.*, 2016) son responsables de tal control a través de su unión al hierro. Algunos de estos aminoácidos también se han identificado en péptidos sintéticos del C-terminal de Mms6 y han mostrado bajas constantes de disociación (Kd) al Fe, lo que indica una fuerte asociación a este catión (Nudelman *et al.*, 2018b). Por tanto, la unión de estos aminoácidos ácidos a Fe da como resultado un aumento local de la sobresaturación del sistema con respecto a la magnetita, induciendo la nucleación de tal fase en esas áreas específicas de la proteína debido a un efecto ionotrópico (Arakaki *et al.*, 2003, 2010; Amemiya *et al.*, 2007; Bird *et al.*, 2016a, b; Yamagishi *et al.*, 2016; Rawlings *et al.*, 2016). Además, algunas de las caras identificadas en los cristales formados en presencia de Mms6 en la presente Tesis Doctoral habían sido descritas previamente por otros autores en magnetitas sintetizadas *in vitro* en presencia de las proteínas Mms6 de AMB-1. Por ejemplo, Arakaki *et al.* (2010) observaron la expresión de las caras de cristal (400) y (311), y Amemiya *et al.* (2007) la de la cara (100).

En relación al efecto individual de MamC, Nudelman y Zarivach (2014) predijeron la estructura secundaria de MamC con dos hélices transmembrana integrales, conectadas por un bucle ácido en estructura hélice  $\alpha$ , expuesto hacia el lumen del

magnetosoma, y un C-terminal hidrofílico también rico en aminoácidos ácidos. Estas regiones confieren a MamC un valor de punto isoelectrico (iep) de 4,47 (calculado a través de la herramienta ExPASy ProtParam, Valverde-Tercedor *et al.*, 2015), que es muy similar al determinado experimentalmente para las BMNPs (4,4) producidas en su presencia, pero diferente al iep (~ 7) de las MNPs producidas por síntesis inorgánica (en ausencia de cualquier proteína). Este cambio en el valor del potencial  $\zeta$  de las BMNPs con respecto al de las MNPs debe atribuirse a la presencia de MamC en la superficie de la magnetita durante el crecimiento del cristal. Esto se ha corroborado mediante análisis del potencial  $\zeta$  y termogravimétricos (TGA) que muestran que MamC está fuertemente unida (o quizás incorporada) a los cristales de magnetita, ya que incluso después de autoclavar y lavar cuidadosamente las nanopartículas, con el objetivo de eliminar la proteína del cristal, la cantidad de MamC es solo ligeramente menor, y la carga superficial de las BMNPs no es comparable a la de las MNPs. La unión de MamC al cristal de magnetita también ha sido investigada por otros autores (Nudelman *et al.*, 2016; Lopez-Moreno *et al.*, 2017) que demostraron que MamC forma principalmente monómeros y dímeros, probablemente a través de sus dominios hidrofóbicos (transmembrana) en solución y que el bucle es responsable de la unión a la superficie de magnetita. De acuerdo con estas observaciones, se podría plantear la hipótesis de que tanto una mezcla de poblaciones de monómeros como dímeros están unidas a la superficie de magnetita, principalmente a través del bucle, exponiendo así el C-terminal (monómeros) y el bucle del dímero adjunto en la capa exterior. Además, Nudelman *et al.* (2018a) analizaron la estructura del bucle de MamC en péptidos sintéticos que contenían la secuencia del bucle e identificaron dos residuos con especial afinidad por  $\text{Fe}^{2+}$ : Asp14, que corresponde al Asp70 de la proteína de longitud completa de AMB-1 (referencia NCBI: WP\_011383388.1), y que ya se sabía que tenía un papel en la nucleación y unión de magnetita (Nudelman *et al.*, 2016), y Glu66. Por lo tanto, como en el caso de Mms6, MamC también podría tener un efecto ionotrópico que induciría la nucleación de magnetita en esas áreas específicas cargadas negativamente. Sin embargo, algunos autores (Nudelman *et al.*, 2016, 2018a; Lopez-Moreno *et al.*, 2017; Ubago-Rodríguez *et al.*, 2019) han demostrado también un efecto molde que gobierna la nucleación y/o el crecimiento de la magnetita basado en: (a) la función esencial de Glu66 y Asp70 como molde para el crecimiento de la magnetita, ya que la doble mutación de estos aminoácidos (E66A y D70A), que todavía podrían ejercer el efecto ionotrópico, produce cristales similares a los de las MNPs sintetizadas en ausencia de

proteína; (b) la distancia entre Glu66 y Asp70 (8 Å) es similar (dentro de la elasticidad de la hélice) a la distancia de 6 Å entre los cationes de Fe en las caras cristalinas (111), (100), (110) y (311), que se expresan en la morfología final de las magnetitas producidas en presencia de MamC; y (c) cuando MamC no se pliega correctamente, el tamaño de los cristales resultantes son iguales a los de los cristales precipitados en experimentos sin proteínas, de donde se deduce que la estructura de la proteína es necesaria para que ejerza su función. Probablemente, la proteína se adhiera a las caras específicas enumeradas anteriormente, inhibiendo o ralentizando su crecimiento, y por lo tanto, estas caras se expresan en la morfología final de la magnetita mediada por MamC.

En base a todos estos resultados, nuestro modelo de cómo ocurre la nucleación y el crecimiento de magnetita en presencia de Mms6 y MamC sería el siguiente: (a) Primero, los aminoácidos ácidos de Mms6 y MamC unen los cationes de Fe de la solución por un efecto ionotrópico, también confirmado por los resultados de Nudelman *et al.* (2018b), reduciendo así la sobresaturación del sistema con respecto a la magnetita y evitando la nucleación en masa. Posteriormente, la nucleación se produce en la superficie proporcionada por el bucle MamC impulsada, principalmente por un efecto molde. MamC controla fuertemente la cinética de la nucleación determinando el número de núcleos que se forman, lo que depende de la concentración de MamC y su adecuada configuración estructural. (b) En su lugar, los núcleos previamente formados crecen, primero a expensas de los cationes de Fe en solución y luego a partir de los cationes de Fe concentrados en los aminoácidos ácidos, primero de MamC y luego de Mms6, según el Kd calculado por Nudelman *et al.* (2018b). El hecho de que se obtengan cristales mejor facetados cuando Mms6 está presente en la solución apoya esta hipótesis, e indica que el efecto de Mms6 se dirige principalmente a controlar la cinética del crecimiento de los cristales al disminuir la sobresaturación del sistema con respecto a la magnetita. (c) El cristal de magnetita crece más lentamente, dado que Mms6 controla la liberación de los cationes de Fe, por lo que los cristales de magnetita resultantes acumulan un menor número de defectos. (d) Este crecimiento se produce mientras el sistema está sobresaturado con respecto a la magnetita, siendo probablemente los cationes de Fe el componente limitante para un mayor crecimiento de cristales. Además, curiosamente, y aunque somos conscientes de que la extrapolación directa de los resultados obtenidos *in vitro* al escenario *in vivo* no es posible, las caras de los cristales observadas para las

magnetitas formadas en presencia de ambas proteínas son idénticas a las determinadas por Mann *et al.* (1984a) para los magnetosomas de MC-1.

En relación a las propiedades magnéticas de las nanopartículas sintetizadas en presencia y ausencia de MamC y/o Mms6, todas ellas presentan magnetización remanente a 5 K en ausencia de campo externo, pero no a 300 K, lo que confirma que ambas partículas son superparamagnéticas. Por otra parte aunque el tamaño de todas las partículas sintetizadas en presencia de MamC y/o Mms6 está dentro del rango del dominio magnético único (Prozorov *et al.*, 2013), la temperatura de bloqueo (TB <300 K en todos los casos) indica que no muestran magnetización neta en ausencia de campo magnético externo, debido a que los cristales tienen sus momentos magnéticos distribuidos aleatoriamente a dicha temperatura (Prozorov *et al.*, 2013). Los cristales más grandes y mejor facetados obtenidos en presencia de MamC y Mms6 presentaron la TB más alta y un aumento de magnetización más lento, que son característicos de partículas de mayor cristalinidad, así como mayor tamaño y un mayor momento magnético por partícula (Prozorov *et al.*, 2013). No obstante, todas las BMNPs sintetizadas en presencia de MamC y/o Mms6 mostraron una TB más alta en comparación con la de las MNPs. Esto es importante para aplicaciones clínicas, ya que en ausencia de un campo magnético externo las partículas no muestran magnetización lo que previene su agregación magnética, mientras que una vez que se aplique el campo responderán de manera eficiente.

Además de propiedades magnéticas óptimas, MamC proporciona a las BMNPs sintetizadas en su presencia (a partir de ahora denominadas únicamente BMNPs) nuevas propiedades de superficie, que son particularmente importantes para su utilización como nanotransportadores, ya que evita la adición de otras moléculas de recubrimiento. Para evaluarlo se seleccionó la doxorubicina (DOXO) como agente quimioterapéutico modelo (Guo *et al.*, 2008; Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Curry *et al.*, 2015) debido a su amplio espectro de actividad antitumoral (Beretta y Zunino, 2008). Como hemos comentado previamente, el iep de estas BMNPs (4,4) es muy próximo al de MamC (iep 4,47), por tanto, el iep de las BMNPs se convierte en el de los dominios expuestos, es decir, el del bucle (4,31) en los dímeros, y el C-terminal (4,25) en los monómeros y dímeros (calculados a través de la herramienta Expasy ProtParam). Los iep de estos dominios están determinados predominantemente por los aminoácidos cargados negativamente [aminoácidos ácidos (Asp y Glu), y un menor número de aminoácidos cargados positivamente (Lys y Arg)] presentes en estas regiones. En

particular, el bucle contiene 5 aminoácidos ácidos y 2 aminoácidos básicos. Del mismo modo, el C-terminal contiene 10 aminoácidos ácidos y 3 aminoácidos básicos. El pKa correspondiente al grupo carboxílico (-COOH) de los aminoácidos ácidos es 3,86 para el Asp y 4.25 para el Glu, mientras que el correspondiente al grupo amino (-NH<sub>2</sub>) de los aminoácidos básicos es 10,79 para la Lys y 12,48 para la Arg. A pH fisiológico, el número de grupos funcionales en la forma negativa (-COO<sup>-</sup>) es mayor que el de los grupos en la forma positiva (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) y, por tanto, las BMNPs muestran un valor de potencial  $\zeta$  negativo. Esto es importante porque permite la funcionalización de las BMNPs con moléculas que muestran grupos funcionales cargados positivamente a estos valores de pH (como la DOXO) mediante simples interacciones electrostáticas. En este contexto, dentro de los rangos de concentración utilizados en esta Tesis Doctoral, DOXO forma dímeros con conformación antiparalela en la que sus grupos amino se dirigen en direcciones opuestas (Agrawal *et al.*, 2009). La mayoría de estos grupos, con un pKa 8,2 (Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2013), están protonados (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) a pH 7,4, lo que hace que los dímeros de DOXO muestren una carga positiva neta. Dado que, al mismo pH, las BMNPs muestran carga neta negativa, la adsorción de DOXO a las BMNPs estará impulsada por interacciones electrostáticas entre los aminoácidos ácidos ubicados en el C-terminal o en el bucle. En las caras de magnetita libres de MamC (que son una minoría), la adsorción de DOXO también podría tener lugar a través de enlaces covalentes, formando ésteres, o por enlaces de hidrógeno. Dado que en la morfología final de las BMNPs se expresan distintas caras del cristal con diferentes configuraciones iónicas y, por lo tanto, diferentes cargas superficiales netas, se esperan diferentes concentraciones de MamC y distintas interacciones electrostáticas entre la partícula y DOXO. Esto resulta en una distribución no homogénea de DOXO a lo largo de la superficie del cristal. De hecho, la isoterma de adsorción y su adaptación al modelo Langmuir-Freundlich sugieren fuertemente que la superficie de la magnetita no es energéticamente homogénea. Por otro lado, el valor  $r$  del modelo Langmuir-Freundlich indica una cooperatividad positiva entre las moléculas de DOXO durante su adsorción. Este fenómeno hace que las moléculas de DOXO adsorbidas no solo interactúen con las nanopartículas sino también entre sí, como vía para disminuir la energía de adsorción, también de acuerdo con la forma de S de la isoterma de adsorción. En consecuencia, la adsorción de moléculas de DOXO favorece la adsorción de más moléculas hasta que se alcanza la cantidad máxima (Q<sub>max</sub>). Este modelo de interacciones electrostáticas e

incluso el efecto cooperativo positivo también se observó en la adsorción de DOXO en nanocristales de apatita recubiertos de citrato (Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2013).

Estas BMNPs funcionalizadas con DOXO pueden mejorarse para conseguir una quimioterapia dirigida más eficiente, no solo mediada por un campo magnético externo. Un paso más es conjugar las BMNPs con motivos/ligandos, tales como anticuerpos monoclonales (mAbs) o sus fragmentos, que se unen específicamente a los biomarcadores sobreexpresados en células tumorales (Allen, 2002, Pietronave *et al.*, 2009). La mayoría de estos biomarcadores son receptores de superficie para factores de crecimiento como los receptores de ácido fólico, transferrina y tirosina quinasa (Allen, 2002; Pietronave *et al.*, 2009; Kaczor-Urbanowicz *et al.*, 2017). En particular, Met es el receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento de hepatocitos (receptor HGF), que se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer ([www.vai.org/met](http://www.vai.org/met)) y está involucrado tanto en carcinogénesis (Trusolino *et al.*, 2010; Gherardi *et al.*, 2012) como en procesos metastásicos (Cortesina *et al.*, 2000). En consecuencia, las BMNPs se funcionalizaron, además de con DOXO, con el mAb DO-24, producido contra el ectodominio de Met humano, produciéndose los llamados nanoensamblajes binarios, es decir, BMNPs unidas a DOXO (DOXO-BMNPs) o al mAb DO-24 (mAb-BMNPs) y nanoensamblajes ternarios (DOXO-mAb-BMNPs). El acoplamiento de este mAb (iep 6,8) a las BMNPs a pH 7,4 también es posible por interacciones electrostáticas, aunque su afinidad es más débil en comparación con DOXO, lo que se tradujo en una menor adsorción. Iafisco *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares para estas dos moléculas en nanopartículas de hidroxiapatita recubiertas de citrato, que también tienen carga superficial negativa. Las diferencias en la adsorción entre DOXO y mAb no solo están relacionadas con la carga superficial, sino también con el impedimento estérico del mAb (la masa de mAb es aproximadamente 275 veces mayor que la de DOXO), que condiciona cuál de sus dominios interactúa con la superficie de las BMNPs. Hipotetizamos que el mAb se une preferentemente a las BMNPs a través de su dominio Fc, exponiendo los fragmentos Fab, de acuerdo con el trabajo teórico de Sidorov *et al.* (2007). Esto se corrobora con la actividad y especificidad de los mAbs después de su adsorción a las BMNPs. Además, la funcionalización adicional con DOXO después del acoplamiento de mAb no interfiere en la inmunocompetencia del mAb. Por tanto, los mAbs adsorbidos en las BMNPs deberían unirse exponiendo externamente sus dominios Fab. Estos hallazgos están en la misma línea de publicaciones similares (Shi *et al.*, 2009; Iafisco *et al.*, 2013). La especificidad de la interacción mediada por mAb se conserva hasta 1 h de incubación

*in vitro* con células Met<sup>+</sup>, y solo después de 2 h de incubación se producen interacciones inespecíficas de las BMNPs consecuencia de su precipitación. El hecho de que estos experimentos se hayan llevado a cabo en condiciones estáticas podría explicar parcialmente esta pérdida de selectividad. *In vivo* se espera un mayor nivel de especificidad en tiempos más largos, porque las células tumorales expresan niveles más altos del receptor Met y, por tanto, reclutarían a las mAb-BMNPs o DOXO-mAb-BMNPs en su superficie de manera más eficiente. Tal escenario dinámico, similar al que se encuentra en el torrente sanguíneo, debería contribuir a un mayor nivel de especificidad. Por otro lado, la adsorción de mAb y/o DOXO a las BMNPs no altera las propiedades magnéticas de las nanopartículas. Tanto los nanoensamblajes binarios como ternarios mostraron valores de TB (<300K en todos los casos) comparables a las BMNPs sin funcionalizar, lo que indica que la adsorción de estas moléculas no influye en su comportamiento supramagnético a temperatura ambiente y corporal y, por tanto, a estas temperaturas, no muestran una magnetización neta en ausencia de un campo magnético externo (Prozorov *et al.*, 2013), lo que es muy importante para su aplicación en clínica.

La liberación de DOXO de las BMNPs o de las mAb-BMNPs, a pH fisiológico (pH 7,4) es prácticamente insignificante, ya que su unión está favorecida por las interacciones electrostáticas y, además, es menor que la de las nanopartículas de óxido de hierro descritas anteriormente (Kievit *et al.*, 2011). Dado que a pH 5, que imita las condiciones del compartimento endosoma-lisosoma (Geisow y Evans, 1984), la superficie de las BMNPs es menos negativa que a pH 7,4, por estar más cerca de su iep, se debilitan las interacciones electrostáticas entre DOXO y los grupos -COO<sup>-</sup>, y las repulsiones electrostáticas entre las moléculas de DOXO adyacentes se vuelven más fuertes. Como resultado, DOXO se desorbe de la superficie de las nanopartículas, comenzando por las capas más externas, que son probablemente las que tienen los enlaces más débiles, hasta que la carga del nanoensamblaje se vuelve neutral. Esto es importante en la práctica clínica, ya que la unión entre el fármaco y la nanopartícula debe permanecer estable (en el torrente sanguíneo, pH 7,44) hasta que se alcance el sitio diana, por ejemplo, el microambiente tumoral (pH 5,8), los lisosomas (pH 4 - 5) o los endosomas (pH 5 - 6), donde el fármaco se debe liberar para ejercer su acción (Guo *et al.*, 2008). Por otro parte, a pH 5 las mAb-BMNPs permanecen ligeramente cargadas positivamente, debido al iep del mAb (iep DO-24 mAb = 6,8) y, por tanto, se desorbe de la nanopartícula más lentamente que DOXO.

Además, las BMNPs y los distintos nanoensamblajes pueden producir hipertermia al exponerse a un campo magnético alterno (AMF). De hecho, en menos de 3 minutos, los nanoensamblajes ternarios elevan la temperatura hasta valores de  $\sim 45$  °C, temperatura a la que las células tumorales alteran su metabolismo y finalmente sufren apoptosis (Ahmed *et al.*, 2015). La aplicación de este AMF añade un efecto importante, la aceleración de la cinética de la liberación de DOXO que es aún mayor que la producida únicamente por efecto del pH ácido. Como se discutió anteriormente, la liberación de DOXO a valores de pH ácidos se dispara debido a que la interacción electrostática entre esta molécula y las BMNPs se debilita, al estar las BMNPs cerca de su iep (4,4). No obstante, a pH 5, las BMNPs todavía están ligeramente cargadas negativamente y, por tanto, pueden mantener DOXO unida a sus superficies. La rotación de las BMNPs y el aumento de temperatura inducido por el AMF probablemente facilitan la liberación de más moléculas de DOXO. De hecho, se ha demostrado que si la superficie a la que se une la molécula se calienta (en este caso, como resultado de la hipertermia magnética), la energía transferida a la especie adsorbida promueve su desorción (Iglesias *et al.*, 2018).

Otro aspecto fundamental de los nanotransportadores para su potencial aplicación clínica es su cito- y hemocompatibilidad, ya que generalmente se administran mediante inyección intravenosa. En este sentido, las BMNPs y/o mAb-BMNPs no resultaron tóxicas en un amplio rango de concentraciones tras su incubación con suspensiones de glóbulos rojos y diferentes líneas celulares. Por el contrario, la misma cantidad de BMNPs/mAb-BMNPs funcionalizadas con distintas concentraciones de DOXO, mostraron citotoxicidad dependiente de la dosis en todos los casos. La presencia del mAb en las DOXO-BMNPs aumentó la cantidad de DOXO internalizada por células Met<sup>+</sup>, aumentando su toxicidad en comparación con DOXO-BMNPs, pero no tuvo un efecto significativo en las células Met<sup>-</sup>. Esto sugiere que la toxicidad de DOXO-mAb-BMNPs esta mediada específicamente por la interacción de mAb. Por otro lado, DOXO soluble, utilizada como control positivo, ejerció una toxicidad comparable o más alta en todos los casos, de acuerdo con otros estudios (Iafisco *et al.*, 2013; Hematyaret *et al.*, 2018). Estos resultados pueden estar relacionados con la cinética de captación celular de DOXO. Las moléculas de DOXO adsorbidas a las BMNPs reducen su carga negativa y esto favorece su interacción con células al disminuir la repulsión entre las BMNPs y la membrana celular, que también tiene carga negativa. Pero para que DOXO ejerza su acción primero tiene que ser liberada, ya sea extracelularmente en



nanoensamblajes no internalizados o intracelularmente en orgánulos como los endosomas o lisosomas. Esto se traduce en una cinética de internalización más lenta y mayor tiempo requerido para su acumulación nuclear en relación con la DOXO soluble. Sin embargo, en un escenario *in vivo* puede verse como una ventaja ya que el fármaco se adsorbe en las nanopartículas hasta que se libera en un sitio específico, lo que reduce los efectos secundarios. Además, el sistema de administración de fármacos mediado por DOXO-mAb-BMNPs presentaría la ventaja añadida de estar restringido a las células reconocidas y seleccionadas por el mAb, no extendiéndose a células que no expresen el marcador asociado a tumor.

También se determinó el efecto combinado del ligando (DO-24 mAb) y la orientación magnética de la BMNPs en la internalización de DOXO en células Met<sup>+</sup>. El efecto combinado de ambos produjo la mayor cantidad de DOXO internalizada. Pero cuando la presencia del ligando y la orientación magnética se comparan, la última tiene mayor influencia en la acumulación celular de DOXO. Bajo la influencia de un campo magnético de gradiente, las BMNPs aumentan su internalización celular de las BMNPs en cortos períodos de tiempo, es decir, la fuerza magnética tiene una acción más rápida que la mediada por el mAb, y promueve una acumulación más rápida de DOXO en los núcleos celulares. La captación celular más rápida y mayor acumulación de nanopartículas en presencia de un campo magnético de gradiente ha sido investigada previamente (MacDonald *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2017; Garanina *et al.*, 2019), demostrándose que la alta concentración de partículas internalizadas no afecta la viabilidad celular (Domínguez *et al.*, 2009; Prijic *et al.*, 2010; Alieva *et al.*, 2016).

Sin embargo, el modelo *in vitro* es un sistema simplificado, en el que solo dos factores (células tumorales y nanopartículas, posiblemente modificadas para mejorar su actividad antitumoral específica) están presentes y, por tanto, es un escenario más sencillo que la situación real *in vivo*. En este caso, las nanopartículas encuentran un entorno altamente complejo donde entran en juego muchos factores, que generalmente interfieren en la interacción nanopartículas-células. Tras su administración sistémica, las nanopartículas deben superar múltiples barreras físicas, químicas y fisiológicas antes de llegar al tumor (Lane *et al.*, 2015). A nivel sistémico, las nanopartículas circulantes pueden ser absorbidas por las células del sistema retículoendotelial (RES), responsable de las respuestas inmunes innatas (Owens y Peppas, 2006; Jain *et al.*, 2008; Nel *et al.*, 2009; Edge *et al.*, 2016). Las nanopartículas también pueden adsorber proteínas y otras moléculas del plasma y formar la llamada biocorona o proteínas corona en su superficie

(Rahman *et al.*, 2013), que presentar desventajas, como impedir la interacción de las nanopartículas con sus células diana o facilitar su opsonización (Owens y Peppas, 2006; Kokkinopoulou *et al.*, 2017), o ventajas, como aumentar su estabilidad coloidal facilitando su internalización celular (Thiele *et al.*, 2003; Ritz *et al.*, 2015) o incrementar su tiempo de circulación (Peng *et al.*, 2013). Por tanto, para traducir la eficacia terapéutica *in vitro* de un nanomaterial específico a modelos *in vivo*, previamente es imprescindible comprender su interacción con las diferentes proteínas plasmáticas. De esta manera se pueden identificar posibles efectos secundarios ocasionados tras la inyección de las nanopartículas en el torrente sanguíneo. En este contexto, las BMNPs y DOXO-BMNPs se incubaron con plasma humano hasta 24 h para imitar su exposición a la sangre y desencadenar la formación de proteínas corona (PC). La formación de PC no tuvo efecto sobre las propiedades magnéticas de las BMNPs, ya que todos los nanoensamblajes que contenían PC mostraron una TB similar entre sí y a las BMNPs, como también se había observado previamente con la adsorción de DOXO y el mAb DO-24. El patrón de proteínas adsorbidas, tanto en las BMNPs como en las DOXO-BMNPs, fue el mismo después de 1 y 24 h de incubación en plasma humano. Por tanto, no se espera que ocurra el efecto Vroman (Vroman *et al.*, 1980), es decir, el intercambio de proteínas en la superficie de las partículas a lo largo del tiempo. Esto puede representar una ventaja para las partículas que son inyectadas por vía intravenosa, ya que no se espera que se produzca ningún intercambio de proteínas adsorbidas en los nanoensamblajes, o solo en períodos muy cortos de tiempo (menos de 1 h), lo que puede ayudar a predecir su biodistribución sin cambios dependientes del tiempo. En cuanto a la composición de proteínas, curiosamente, no se encontró albúmina adsorbida en ninguno de los nanoensamblajes, a pesar de ser una proteína mayoritaria en el plasma que se suele unir a nanopartículas. Eso puede deberse a que la albúmina muestra mayor abundancia en superficies hidrofóbicas (Aggarwal *et al.*, 2009). Otro hallazgo interesante es que se encontró un enriquecimiento de fibrinógeno - $\beta$  y - $\gamma$  tanto en PC-DOXO-BMNPs como en PC-BMNPs. El fibrinógeno es otra proteína plasmática muy abundante que se adsorbe preferentemente a las nanopartículas hidrofílicas (Gessner *et al.*, 2000; Cedervall *et al.*, 2007), como las BMNPs, y su adsorción puede tener diferentes implicaciones fisiológicas. Por un lado, los niveles elevados de fibrinógeno en plasma están involucrados en la resistencia celular a la quimioterapia y en el aumento del crecimiento tumoral (Meehan *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2000) en diferentes tipos de tumores (Sheng *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2016; Zhang y Long,

2017). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la unión preferencial de fibrinógeno a las DOXO-BMNPs puede representar una ventaja para el tratamiento del tumor, como mecanismo para la eliminación del exceso de fibrinógeno plasmático. Por otro lado, el fibrinógeno actúa como opsonina cuando se adhiere a la superficie de las nanopartículas en bajas concentraciones induciendo el reconocimiento de nanopartículas por las células del RES (Owens y Peppas, 2006). Sin embargo, adsorbidas en alta concentración, las moléculas de fibrinógeno forman una matriz multicapa (Yermolenko *et al.*, 2012; Safiullin *et al.*, 2015), que disminuye drásticamente la asociación celular (Lishko *et al.*, 2007; Yermolenko *et al.*, 2010). Por lo tanto, el fibrinógeno como recubrimiento superficial previo en alta concentración brinda oportunidades para proteger a las partículas de la fagocitosis y prolongar su tiempo de circulación.

Otro aspecto importante se refiere a la estabilidad de las MNPs en suspensión, que puede estar comprometida no solo por las interacciones coloidales sino también por las dipolares magnéticas. La estabilidad es imprescindible para impedir que las nanopartículas agreguen y puedan penetren en el tumor mediante el efecto EPR (Maeda, 2001). Además, capacidad de producir hipertermia de las MNPs, durante la aplicación de un campo magnético alterno, se ve drásticamente reducida cuando los sistemas se encuentran agregados (Iglesias *et al.*, 2016) o cuando se supera el rango de dominio magnético único (Fortin *et al.*, 2007; Mehdaoui *et al.*, 2011). El hecho de que las BMNPs y todos los nanoensamblajes estén cargados a pH fisiológico, a diferencia de las MNPs inorgánicas, es favorable en términos de estabilidad coloidal, ya que se producen repulsiones estéricas y electrostáticas entre las BMNPs por su recubrimiento de MamC. Sin embargo, al ser MamC una proteína de membrana altamente hidrofóbica, puede interactuar con otras moléculas de MamC en las BMNPs a través de dominios hidrofóbicos para ganar estabilidad (Lopez-Moreno *et al.*, 2007). En consecuencia, la mayoría de BMNPs agregan en solución, aumentando su radio hidrodinámico y la polidispersidad de la muestra. Solo hay una pequeña población con un tamaño  $\leq 150$  nm que podría penetrar en el tumor por el efecto EPR. No obstante, la adsorción de DOXO y/o proteínas plasmáticas a las BMNPs mejora su estabilidad, ya que todos los nanoensamblajes muestran una distribución de tamaños más estrecha y un porcentaje de aglomerados menor en comparación con las BMNPs. Esto puede explicarse porque al unirse MamC a otras moléculas (como DOXO o proteínas), las interacciones hidrofóbicas entre moléculas de MamC se ven impedidas estéricamente, lo que favorece la estabilidad coloidal de las BMNPs. Esto es especialmente significativo para las

BMNPs incubadas con plasma durante 24 h donde el 91.9% de las partículas son  $\leq 100$  nm y el 54% de las partículas  $\leq 50$  nm, que es el tamaño de las BMNPs individuales (tamaño promedio de BMNPs:  $36 \pm 12$  nm según análisis de TEM). Estos hallazgos son consistentes con los de estudios previos (Monopoli *et al.*, 2011; Tedja *et al.*, 2012; Wells *et al.*, 2012; Dominguez-Medina *et al.*, 2013; Zaloga *et al.*, 2014) que demostraron una mejor estabilidad coloidal de diferentes tipos de nanopartículas, incluidas las magnéticas. Sin embargo, se observaron efectos menos significativos sobre la estabilidad coloidal para las PC-DOXO-BMNPs en comparación con DOXO-BMNPs. Esto puede sugerir un aumento de la floculación entre partículas debido a una mayor adsorción de proteínas plasmáticas, principalmente cargadas negativamente (Rügheimer *et al.*, 2008), a las DOXO-BMNPs cargadas positivamente (Moore *et al.*, 2015). Sin embargo, el 30,4% y el 35,8% de las PC-DOXO-BMNPs incubadas en plasma durante 1 y 24 h, respectivamente, muestran tamaños de hasta 50 nm, lo que claramente representa una mejora con respecto a su estabilidad coloidal en comparación con las BMNPs (1,9%). La adsorción de PC también tuvo repercusión en la internalización de los nanoensamblajes en diferentes tipos celulares. La captación celular de PC-BMNPs aumentó significativamente en comparación con la internalización de las BMNPs, que en su mayoría permanecieron extracelulares, de acuerdo con la reducción del radio hidrodinámico de los aglomerados después de la incubación con plasma. Este resultado muestra que las PC proporcionan una ventaja para los mecanismos de captación celular, como la endocitosis (Rahman *et al.*, 2013), que es consistente con estudios previos que utilizaron nanopartículas con ApoH (Ritz *et al.*, 2015), partículas que contienen alpha2GP, IgG y albúmina (Thiele *et al.*, 2003) y MNPs incubados en suero humano (Yallapu *et al.*, 2015).

En cuanto al impacto biológico, las BMNPs recubiertas por PC no mostraron toxicidad significativa en diferentes líneas celulares, de acuerdo con la citocompatibilidad observada para las BMNPs. Sin embargo, la viabilidad de macrófagos primarios humanos disminuyó especialmente cuando se trataron con BMNPs. Por ejemplo, a  $10 \mu\text{g/mL}$  de BMNPs, la viabilidad celular se redujo drásticamente al 20,6%, mientras que las PC-BMNPs incubadas 24 h en plasma tuvieron el menor efecto sobre la viabilidad celular (69,8%). Se observó una tendencia similar para la concentración más alta de BMNPs. Este efecto protector de las proteínas adsorbidas contra el daño celular inducido por las nanopartículas desnudas está descrita en diversos estudios previos (Petri-Fink *et al.*, 2008; Clift *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2011;

Tedja *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Zaloga *et al.*, 2014; Obst *et al.*, 2017). De hecho, Wang *et al.*, (2013) lo describen como un efecto "caballo de Troya", ya que el recubrimiento con PC promueve la internalización de los nanoensamblajes evitando el daño de la membrana celular. La menor agregación de PC-BMNPs en comparación con BMNPs también puede contribuir a la menor toxicidad de los primeros durante su incubación con los cultivos de macrófagos. Las BMNPs aglomeradas pueden causar la mortalidad de macrófagos a través de la interrupción mecánica de la integridad de la membrana plasmática, pero son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis. De los estudios de los nanoensamblajes que contienen DOXO, en todas las líneas celulares analizadas, se puede inferir que el recubrimiento de PC no interfiere en la actividad DOXO. Además, el número de células que quedaron después de su incubación con PC-DOXO-BMNPs fue considerablemente menor y estaban más vacuoladas y degeneradas en comparación con las observadas después del tratamiento con DOXO-BMNPs. Tal grado de vacuolización y degeneración es propio de células apoptóticas o necróticas. Además, el menor número de células detectadas también es coherente con la eliminación de las células muertas (ya no adherentes) durante los lavados después de su incubación con las partículas. Estos resultados indican que la adsorción de PC a las DOXO-BMNPs provoca una mayor internalización por las células y, por tanto, una mayor citotoxicidad de DOXO.

El estudio preliminar sobre las interacciones suras y ventajosas que se producen entre las BMNPs/DOXO-BMNPs y el plasma humano permitió la evaluación *in vivo* de la orientación magnética de fármacos y la hipertermia magnética producidas por las BMNPs y DOXO-BMNPs. Estas nanopartículas respondieron de manera eficiente a campos magnéticos externos *in vivo*. Después de la inyección intravenosa de DOXO-BMNPs en ratones BALB/c con carcinomas mamarios y la aplicación del campo magnético de gradiente, una alta concentración de nanopartículas se acumularon en el tumor, a diferencia de lo que ocurrió en los no tratados con el imán, y el crecimiento tumoral se inhibió significativamente. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de Cheng *et al.* (2012), que demuestran que las MNPs inyectadas por vía intravenosa se acumulan aproximadamente 8 veces más en el sitio del tumor cuando se aplica un campo magnético. Este tratamiento dirigido reduciría el efecto secundario del fármaco sobre las células sanas del resto del cuerpo, ya que favorece la acumulación de nanopartículas y, por tanto de la DOXO unida en el propio tumor, donde puede ejercer su efecto citotóxico. De hecho, tras la inyección intravenosa de 10 µg de BMNPs/g de

peso de ratón, no se encontraron evidencias de alteraciones en los órganos hasta un tiempo máximo de 2 meses, demostrando una alta biocompatibilidad. Únicamente se observó disminución de los depósitos endógenos de hierro del bazo, que fueron indetectables tanto a las 4 h como 1 día después de la inyección de las BMNPs, pero se restauraron 1 semana después, si no antes. Las BMNPs no quedaron retenidas en los diferentes órganos, con excepción de una pequeña cantidad en los pulmones y en el hígado. Otros autores también detectaron nanopartículas magnéticas en el bazo, el hígado (Tate *et al.*, 2011; Mejías *et al.*, 2011) y en los pulmones (Chaves *et al.*, 2005; Edge *et al.*, 2016) después de su administración intravenosa, pero sin toxicidad asociada. Esto se debe a que son órganos muy vascularizados, y a que forman parte del RES y, por tanto, están involucrados en la eliminación de las nanopartículas circulantes después de ser fagocitadas por macrófagos (Owens y Peppas, 2006; Jain *et al.*, 2008; Nel *et al.*, 2009; Edge *et al.*, 2016). De hecho, varios estudios han demostrado que diferentes MNPs muestran una toxicidad baja o nula en humanos debido a su posible degradación en el hígado y el bazo, lo que resulta en la liberación de iones  $Fe^{3+}$  que pasan a participar en el metabolismo del hierro (Mou *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2016). Esto representa una ventaja respecto a otros sistemas de suministro que incluyen cerámicas, polímeros y metales, que presentan inconvenientes relacionados con su biodegradabilidad, la toxicidad de sus subproductos de degradación o simplemente la toxicidad de las nanopartículas (Doane y Burda, 2012).

Finalmente, en relación a la producción de hipertermia magnética, cuando se aplicó un AMF *in vivo*, *in situ* en carcinomas mamarios inducidos en ratones BALB/c, la producción de hipertermia se observó sólo en los ratones inyectados con las nanopartículas. La temperatura del tumor aumentó rápidamente y se mantuvo a 42-45 °C durante 20 minutos en presencia del AMF. Este aumento de temperatura tuvo efecto en la reducción del tamaño del tumor porque el calor generado por las BMNPs en contacto con la membrana plasmática, tanto interna como externamente, puede alterar la estructura de la membrana produciendo necrosis celular (Guardia *et al.*, 2012). Además, por encima de 42 °C, los vasos tumorales pueden colapsar, atrapando el calor aplicado y provocando necrosis o apoptosis (Spirou *et al.*, 2018). Además, cuando la hipertermia se combina con la citotoxicidad de DOXO, es decir, en los nanoensamblajes DOXO-BMNPs + AMF, se observa un efecto sinérgico, que produce una mayor reducción del tumor en comparación con BMNPs + AMF. Esto se debe a que la hipertermia magnética no sólo aumenta la temperatura local, sino que también produce la rotación

de partículas, siendo un estímulo capaz de desencadenar la desorción de DOXO de las BMNPs, como se ha demostrado *in vitro*. Además, algunos autores (Hahn, 1979; van der Zee, 2002) observaron que el aumento de temperatura puede hacer a las células tumorales más sensibles a las moléculas terapéuticas. Por tanto, estos datos *in vivo* representan la base para la aplicación sura y eficiente de las BMNPs como doble terapia antitumoral, combinando la orientación magnética de fármacos con el tratamiento de hipertermia magnética para aumentar su eficiencia.

## **CONCLUSIONES**



De acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se presentan las siguientes conclusiones:

- El efecto combinado *in vitro* de MamC y Mms6 de *Magnetococcus marinus* MC-1 produce cristales bien facetados de  $30 \pm 10$  nm, con mayor momento magnético por partícula que los sintetizados en su ausencia o en presencia de solo una de ellas. MamC parece controlar la cinética de la nucleación de los cristales debido a efectos ionotrópicos y molde, mientras que Mms6 controla preferiblemente la cinética del crecimiento de los cristales al actuar como reservorio de Fe.
- Se ha obtenido la unión estable a pH fisiológico de doxorubicina (DOXO) a las nanopartículas biomiméticas producidas en presencia de MamC (BMNPs) mediante interacciones electrostáticas. La liberación de DOXO se logra al debilitar esta interacción a medida que el pH disminuye y se acerca al punto isoeléctrico (iep) de las BMNPs (iep 4.4). Además, esta liberación se incrementa mediante la hipertermia generada por las BMNPs al exponerse a un campo magnético alterno (AMF).
- Las DOXO-BMNPs funcionalizadas de manera estable con anticuerpos monoclonales (mAb), que reconocen selectivamente el receptor Met sobreexpresado en muchos tumores, muestran una unión específica a células tumorales Met<sup>+</sup> y descargan DOXO dentro de sus núcleos de manera más eficiente que las DOXO-BMNPs.
- La exposición *in vitro* de las BMNPs a un gradiente de campo magnético (GMF) conduce a su mayor captación celular en cortos periodos de tiempo. Esto se traduce en una acumulación más rápida de DOXO, procedente de DOXO-BMNPs o DOXO-mAb-BMNPs, en los núcleos de las células, lo que mejora su toxicidad.
- La inmersión de BMNPs o DOXO-BMNPs en plasma humano produce una cubierta de proteínas corona (PC) que reduce su polidispersidad y mejora su estabilidad coloidal. Esto disminuye la toxicidad de las BMNPs en macrófagos humanos y mejora su internalización en diferentes líneas celulares.
- Los diferentes nanoensamblajes que contienen DOXO ejercen citotoxicidad *in vitro* dependiente de la DOXO adsorbida, ya que las BMNPs, mAb-BMNPs y PC-BMNPs son cito y hemocompatibles. Además, la adsorción de estas moléculas no interfiere en las propiedades magnéticas de las BMNPs.

- La inyección intravenosa de BMNPs en ratones BALB/c no produce ninguna alteración morfológica de los órganos al menos hasta un periodo máximo de 2 meses, demostrando una alta biocompatibilidad.
- Después de la inyección intravenosa de DOXO-BMNPs en ratones BALB/c portadores de carcinomas mamarios, y de la aplicación de un GMF en la zona tumoral, se observa una mayor acumulación de nanopartículas en el tumor y una mayor reducción del mismo en comparación con los ratones no tratados con el campo magnético.
- La inyección de DOXO-BMNPs *in situ* en carcinomas mamarios inducidos en ratones BALB/c junto con la aplicación de un AMF produce una disminución significativa del volumen del tumor, mayor que la obtenida en los ratones inyectados solo con DOXO soluble, solo con DOXO-BMNPs o inyectados con BMNPs y tratados con el AMF.
- La influencia de un campo magnético externo durante la producción de membranas de cáscara de huevo magnéticas (MESM) produce largas hebras de nanopartículas distribuidas a lo largo de las fibras de las membranas de la ESM. Por el contrario, en ausencia de campo, se forman aglomerados de partículas más pequeñas con una disposición aleatoria.
- Las MESMs tienen la capacidad de eliminar eficientemente  $Pb^{2+}$  de agua contaminada mediante la sinergia existente entre las MNPs y la ESM, que aumenta la eficiencia de la eliminación más de 10 veces en comparación con la del componente ESM solo.

## **CONCLUSIONS**

According to the results obtained during the development of this Doctoral Thesis, the following conclusions are presented:

- The combined effect *in vitro* of MamC and Mms6 of *Magnetococcus marinus* MC-1 produces well-faceted crystals of  $30 \pm 10$  nm, with a higher magnetic moment per particle than those synthesized in their absence or in the presence of only one of them. MamC seems to control the kinetics of crystal nucleation due to ionotropic and template effects, while Mms6 preferably controls the kinetics of crystal growth by acting as Fe reservoir.
- The stable physiological pH complexation of doxorubicin (DOXO) to the biomimetic nanoparticles produced in the presence of MamC (BMNPs) by electrostatic interactions has been obtained. DOXO release is achieved by weakening this interaction as pH decreases and approaches the isoelectric point (iep) of the BMNPs (iep 4.4). In addition, this release is increased by the hyperthermia generated by BMNPs exposed to an alternating magnetic field (AMF).
- DOXO-BMNPs stably functionalized with monoclonal antibodies (mAb), which selectively recognize Met receptor overexpressed in many tumors, show a specific binding to Met<sup>+</sup> tumor cells, and discharge DOXO within their nuclei more efficiently than DOXO-BMNPs.
- The *in vitro* exposure of the BMNPs to a gradient magnetic field (GMF) leads to higher cellular uptake at early time points. This is translated into a faster accumulation of DOXO, from DOXO-BMNPs or DOXO-mAb-BMNPs in cell nuclei, thus, enhancing its toxicity.
- The immersion of BMNPs or DOXO-BMNPs in human plasma produces a protein corona (PC) cover that reduces their polydispersity and improves their colloidal stability. This decreases BMNPs toxicity in human macrophages and enhances their internalization in different cell lines.
- The different nanoassemblies containing DOXO exert *in vitro* cytotoxicity dependent on the DOXO adsorbed, since BMNPs, mAb-BMNPs, and PC-BMNPs are cyto- and hemocompatible. In addition, the adsorption of these molecules do not interfere with the magnetic properties of the BMNPs.

- The intravenous injection of BMNPs in BALB/c mice does not cause any morphological alterations of the organs at least up to 2 months, showing a high biocompatibility.
- After intravenous injection of DOXO-BMNPs in BALB/c mice bearing mammary carcinomas and the application of a GMF in the tumor area, higher concentration of nanoparticles accumulated at the tumor site and a higher reduction is produced in comparison to mice in which no magnetic field is applied.
- The injection of DOXO-BMNPs *in situ* in mammary carcinomas induced in BALB/c mice, together with the application of an AMF, resulted in a significant tumor volume decrease, higher than that obtained in mice injected only with soluble DOXO, only with DOXO-BMNPs or injected with BMNPs and treated with the AMF.
- The influence of an external magnetic field during the production of magnetic eggshell membranes (MESM) generates long strands of nanoparticles distributed along the fibers of the ESM. In contrast, agglomerates of smaller particles are formed with a random arrangement in the absence of the magnetic field.
- The MESMs have the capacity to efficiently remove  $Pb^{2+}$  from contaminated water, through the synergy existing between the MNPs and the ESM that increase the efficiency of the removal more than 10 times compared to that of the ESM component alone.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Adriano, D.C. Trace elements in the terrestrial environment: Biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. Springer-Verlag, New York, 2001.
- Aggarwal, P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, 61, 428-437.
- Agrawal, P., Barthwal, S.K., Barthwal, R. Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, 44, 1437-1451.
- Ahmed, F., Rodrigues, D.F. Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: a case study. *J. Hazard. Mater.*, 2013, 256–257, 33-39.
- Ahmed, K., Tabuchi, Y., Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*, 2015, 20, 1411-1419.
- Ahmed, T.A., Suso, H.P., Hincke, M.T. In-depth comparative analysis of the chicken eggshell membrane proteome. *J. Proteomics*, 2017, 155, 49-62.
- Ahmed, T.A.E., Kulshreshtha G., Hincke, M.T. Value added uses of eggshell and eggshell membranes. Chapter 19 in *Eggs as functional foods and nutraceuticals for human health*. Royal Society of Chemistry, 2019, 359-397.
- Allen, T.M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, 750-763.
- Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R.J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S., Lübke, A.S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.*, 2000, 60, 6641-6648.
- Alexiou, C., Jurgons, R., Schmid, R.J., Bergemann, C., Henke, J., Erhardt, W., Huenges, E., Parak, F. Magnetic drug targeting-biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J. Drug. Target.*, 2003, 11, 139-149.
- Ali, A., Zafar, H., Zia, M., U., Haq, I., Phull, A.R., Ali, J.S., Hussain, A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.*, 2016, 9, 49-67.
- Ali, N., Zaman, H., Bilal, M., Shah, A.A., Nazir, M.S., Iqbal, H.M.N. Environmental perspectives of interfacially active and magnetically recoverable composite materials - A review. *Sci. Total Environ.*, 2019, 670, 523-538.
- Alieva, I.B., Kireev, I., Garanina, A.S., Alyabyeva, N., Ruyter, A., Strelkova, O.S., Zhironkina, O.A., Cherepaninets, V.D., Majouga, A.G., Davydov, V.A., Khabashesku, V.N., Agafonov, V., Uzbekov, R.E. Magnetocontrollability of Fe<sub>3</sub>C<sub>2</sub>@C superparamagnetic nanoparticles in living cells. *J. Nanobiotechnology*, 2016, 14, 67.
- 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.
- Alphandéry, E. Perspectives of breast cancer thermotherapies. *J. Cancer*, 2014, 5, 472-479.

- 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.
- 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.
- 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.
- Arakaki, A., Yamagishi, A., Fukuyo, A., Tanaka, M., Matsunaga, T. Coordinated functions of Mms proteins define the surface structure of cubo-octahedral magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Mol. Microbiol.*, 2014, 93, 554-567.
- Arató, B., Szányi, Z., Flies, C., Schüler, D., Frankel, R.B., Buseck, P.R., Pósfai, M. Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker. *Am. Miner.*, 2005, 90, 1233-1241.
- Babel, S., Kurniawan, T.A. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. *J. Hazard. Mater.*, 2003, 97, 219-243.
- Bagbi, Y., Sarswat, A., Mohan, D., Pandey, A., Solanki, P.R. Lead (Pb<sup>2+</sup>) adsorption by monodispersed magnetite nanoparticles: Surface analysis and effects of solution chemistry. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2016, 4, 4237-4247.
- Barber-Zucker, S., Keren-Khadmy, N., Zarivach, R. From invagination to navigation: The story of magnetosome-associated proteins in magnetotactic bacteria. *Protein Sci.*, 2015, 25, 338-351.
- Bardos, P., Merly, C., Kvapil, P., Koschitzky, H.P. Status of nanoremediation and its potential for future deployment: Risk-benefit and benchmarking appraisals. *Remediation*, 2018, 28, 43-56.
- Bazak, R., Houri, M., El Achy, S., Kamel, S., Refaat, T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2015, 141, 769-784.
- 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.
- Bazylinski, D.A. Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News*, 1995, 61, 337-343.
- Bazylinski, D.A., Moskowitz, B.M. Microbial biomineralization of magnetic iron minerals: Microbiology, magnetism and environmental significance. *Rev. Mineral.*, 1997, 35, 181-223.
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. Biologically controlled mineralization in prokaryotes. *Rev. Mineral. Geochem.*, 2003, 54, 217-247
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, 2, 217-230.
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., Konhauser, K.O. Modes of biomineralization of magnetite by microbes. *Geomicrobiol. J.*, 2007, 24, 465-475.



- Bazylnski, D.A., Schübbe, S. Controlled biomineralization by and applications of magnetotactic bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2007, 62, 21-62.
- Bazylnski, D.A., Williams, T.J., Lefèvre, C.T., Berg, R.J., Zhang, C.L., Bowser, S.S., Dean, A.J., Beveridge, T.J. *Magnetococcus marinus* gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (*Magnetococcaceae* fam. nov.; *Magnetococcales* ord. nov.) at the base of the *Alphaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, 63, 801-808.
- Beduneau, A., Saulnier, P., Benoit, J.P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials*, 2007, 28, 4947-4967.
- Bell, P.E., Mills, A.L., Herman, J.S. Biogeochemical conditions favoring magnetite formation during anaerobic iron reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53, 2610-2616.
- Bennet, M., Bertinetti, L., Neely, R.K., Schertel, A., Körniwei, A., Flors, C., Müller, F.D., Schüler D., Klumppf, S., Faivre, D. Biologically controlled synthesis and assembly of magnetite nanoparticles. *Faraday Discuss.*, 2015, 181, 71-83.
- Bereczk-Tompa, É., Vonderviszt, F., Horváth, B., Szalai, I., Pósfai, M. Biotemplated synthesis of magnetic filaments. *Nanoscale*, 2017, 9, 15062-15069.
- Beretta, G.L., Zunino, F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. *Top Curr. Chem.*, 2008, 283, 1-19.
- Biehl, P., von der Lühe, M., Dutz, S., Schacher, F.H. Synthesis, characterization, and applications of magnetic nanoparticles featuring polyzwitterionic coatings. *Polymers*, 2018, 10, 91.
- 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.*, 2016a, 6, 7356-7363.
- Bird, S.M., El-Zubir, O., Rawlings, E., Leggetta, J., Staniland, S.S. A novel design strategy for nanoparticles on nanopatterns: interferometric lithographic patterning of Mms6 biotemplated magnetic nanoparticles. *J. Mater. Chem. C*, 2016b, 4, 3948-3955.
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., Birchmeier, C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, 1995, 376, 768-771.
- Blakemore, R.P. Magnetotactic Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1982, 36, 217-238.
- Blaney, L. Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): Properties, synthesis, and applications. *Lehigh Preserve*, 2007, 15, 5.
- Bobo, D., Robinson, K.J., Islam, J., Thurecht, K.J., Corrie, S.R. Nanoparticle-based medicines: A review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm. Res.*, 2016, 33, 2373-2387.
- Bouattour, M., Raymond, E., Qin, S., Cheng, A.L., Stammberger, U., Locatelli, G., Faivre, S. Recent developments of c-Met as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2018, 67, 1132-1149.
- Boucher, Y., Jain, R.K. Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Res.*, 1992, 52, 5110-5114.

- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248-254.
- Bragg, W.H. The structure of magnetite and the spinels. *Nature*, 1915, 95, 561.
- Braun, V., Hantke, K., Koster, W. Bacterial iron transport: Mechanisms, genetics, and regulation. *Met. Ions in Biol. Syst.*, 1998, 35, 67-145.
- Brumfiel, G. Nanotechnology: A little knowledge. *Nature*, 2003, 424, 246-248.
- Bruvera, I.J., Mendoza Zélis, P., Pilar Calatayud, M., Goya, G.F., Sánchez F.H. Determination of the blocking temperature of magnetic nanoparticles: The good, the bad, and the ugly. *J. Appl. Phys.* 2015, 118, 184304.
- Bulte, J.W., Douglas, T., Witwer, B., Zhang, S.C., Strable, E., Lewis, B.K., Zywicke, H., Miller, B., van Gelderen, P., Moskowitz, B.M., Duncan, I.D., Frank, J.A. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 1141-1147.
- Burakova, A.E., Galunina, E.V., Burakova, I.V., Kucherova, A.E., Agarwal, S., Tkacheva, A.G., Gupta, V.K. Adsorption of heavy metals on conventional and nanostructured materials for wastewater treatment purposes: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2018, 148, 702-712.
- Busch, C.J. Einfluss heftiger Erysipeln auf organisierte Neubildungen [Influence of severe erysipelas on organised neoformation]. In: Andrä, C.J., ed. *Verhandlungen des naturhistorischen Vereins der preussischen Rheinlande und Westphalens* [Proceedings of the Natural Historical Society of Prussian Rhineland and Westphalia]. Max Cohen, Bonn, 1866, 28-33.
- Calugay, R.J., Miyashita, H., Okamura, Y., Matsunaga, T. Siderophore production by the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, 218, 371-375.
- Camner, P., Lundborg, M., Lastbom, L., Gerde, P., Gross, N., Jarstrand, C. Experimental and calculated parameters on particle phagocytosis by alveolar macrophages, *J. Appl. Physiol.*, 2002, 92, 2608-2616.
- Carr, C., Ng, J., Wigmore, T. The side effects of chemotherapeutic agents. *Curr. Anaesth. Crit. Care*, 2008, 19, 70-79.
- Caracciolo, G., Callipo, L., De Sanctis, S.C., Cavaliere, C., Pozzi, D., Laganà, A. Surface adsorption of protein corona controls the cell internalization mechanism of DC-Chol-DOPE/DNA lipoplexes in serum. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1798, 536-543.
- Carstensen, H., Muller, R.H., Muller, B.W. Particle-size, surface hydrophobicity and interaction with serum of parenteral fat emulsions and model-drug carriers as parameters related to RES uptake. *Clin. Nutr.*, 1992, 11, 289-297.
- Cataldi, M., Vigliotti, C., Mosca, T., Cammarota, M., Capone, D. Emerging role of the spleen in the pharmacokinetics of monoclonal antibodies, nanoparticles and exosomes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18, 1249.
- Cedervall, T., Lynch, I., Foy, M., Berggård, T., Donnelly, S.C., Cagney, G., Linse, S., Dawson, K.A. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 5754-5756.

- Chakraborty, S., Joshi, P., Shanker, V., Ansari, Z.A., Singh, S.P., Chakrabarti, P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir*, 2011, 27, 7722-7731.
- Chan, B.K.C., Dudeney, A.W.L. Reverse osmosis removal of arsenic residues from bioleaching of refractory gold concentrates. *Miner. Eng.*, 2008, 21, 272-278.
- Chang, S.S., Reuter, V.E., Heston, W.D.W., Bander, N.H., Grauer, L.S., Gaudin, P.B. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res.*, 1999, 59, 3192-3198.
- Chatterjee, D.K., Diagaradjane, P., Krishnan, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther. Deliv.*, 2011, 2, 1001-1014.
- Chavanpatil, M.D., Khdair, A., Panyam, J. Nanoparticles for cellular drug delivery: mechanisms and factors influencing delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, 6, 2651-2663.
- Chaves, S., Silva, L.P., Lacava, Z.G.M., Morais, P.C., Azevedo, R.B. Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lungs induced by 2, 3 meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles. *J. Appl. Phys.*, 2005, 97, 10Q915.
- Crane, R., Scott, T. Nanoscale zero-valent iron: future prospects for an emerging water treatment technology. *J. Hazard. Mater.*, 2012, 211, 112-125.
- Chellat, F., Merhi, Y., Moreau, A., Yahia, L. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials*, 2005, 26, 7260-7275.
- Chen, L., Bazylinski, D.A., Lower, B. H. Bacteria that synthesize nano-sized compasses to navigate using earth's geomagnetic field. *Nature Education Knowledge*, 2010, 1, 14.
- Chen, D., Tang, Q., Li, X., Zhou, X., Zang, J., Xue, W.-Q., Xiang, J.-Y., Guo, C.-Q. Biocompatibility of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Int. J. Nanomedicine*, 2012, 7, 4973-4982.
- Chen, M.L., Gu, C.B., Yang, T., Sun, Y., Wang, J.H. A green sorbent of esterified egg-shell membrane for highly selective uptake of arsenate and speciation of inorganic arsenic. *Talanta*, 2013, 116, 688-694.
- Chen, N., Wang, D., Long, C., Li, Y., Lu, C., Wang, F., Zhu, H. Magnetic field-oriented ferroferric oxide/poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide) hybrid membranes for anion exchange membrane applications. *Nanoscale*, 2018, 10, 18680-18689.
- Cheng, L., Yang, K., Li, Y., Zeng, X., Shao, M., Lee, S.T., Liu, Z. Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy. *Biomaterials*, 2012, 33, 2215-2222.
- Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klok, H.A., Zhong, Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials*, 2013, 34, 3647-3657.
- Chiavenna, S.M., Jaworski, J.P., Vendrell, A. State of the art in anti-cancer mAbs. *J. Biomed. Sci.*, 2017, 24, 15.

- Chidambaram, M., Manavalan, R., Kathiresan, K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2011, 14, 67-77.
- Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.*, 2006, 6, 662-668.
- Choi, H.S., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J.P., Ity Ipe, B., Bawendi, M.G., Frangioni, J.V. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.*, 2007, 25, 1165-1170.
- Chunfu, Z., Jinquan, C., Duanzhi, Y., Yongxian, W., Yanlin, F., Jiajü, T. Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. *Appl. Radiat. Isot.*, 2004, 61, 1255-1259.
- Cinay, G.E., Erkoc, P., Alipour, M., Hashimoto, Y., Sasaki, Y., Akiyoshi, K., Kizilel, S. Nanogel-integrated pH-responsive composite hydrogels for controlled drug delivery. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017, 3, 370-380.
- Clift, M.J., Bhattacharjee, S., Brown, D.M., Stone, V. The effects of serum on the toxicity of manufactured nanoparticles. *Toxicol. Lett.*, 2010, 198, 358-365.
- ClinicalTrials.gov., 2019:
- Iron oxides:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=iron+oxide&cntry=&state=&city=&dist=>
  - Magnetic nanoparticles:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=magnetic+nanoparticle&cntry=&state=&city=&dist=>
  - Ferumoxytol in MRI:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Ferumoxytol+AND+MRI&cntry=&state=&city=&dist=>
  - Magnetic hyperthermia:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=magnetic+hyperthermia&cntry=&state=&city=&dist=>
  - MTC-Dox:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00034333?term=MTC-Dox&rank=2>  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00041808?term=MTC-Dox&rank=3>
- Cloete, T.E. *Nanotechnology in Water Treatment Applications*. Horizon Scientific Press, New York, U.S.A., 2010.
- Cole, A.J., David, A.E., Wang, J., Galbán, C.J., Hill, H.L., Yang, V.C. Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting. *Biomaterials*, 2011, 32, 2183-2193.
- Colombo, M., Carregal-Romero, S., Casula, M.F., Gutiérrez, L., Morales, M.P., Böhm, I.B., Heverhagen, J.T., Prospero, D., Parak, W.J. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 4306-4334.
- Comoglio, P.M., Giordano, S., Trusolino, L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008, 7, 504-516.

- Cordeiro C.M., Hincke, M.T. Recent patents on eggshell: shell and membrane applications. *Recent Pat. Food Nutr. Agriculture*, 2011, 3, 1-8.
- Cornell, R.M., Schwertmann, U. *The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrences and uses.* Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- Cortesina, G., Martone, T., Galeazzi, E., Olivero, M., De Stefani, A., Bussi, M., Valente, G., Comoglio, P.M., Di Renzo, M.F. Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases. *Int. J. Cancer*, 2000, 89, 286-292.
- Crini, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Prog. Polym. Sci.*, 2005, 30, 38-70.
- Curry, D., Cameron, A., MacDonald, B., Nganou, C., Scheller, H., Marsh, J., Beale, S., Lu, M., Shan, Z., Kaliaperumal, R., Xu, H., Servos, M., Bennett, C., MacQuarrie, S., Oakes, K.D., Mkandawire, M., Zhang, X. Adsorption of doxorubicin on citrate-capped gold nanoparticles: insights into engineering potent chemotherapeutic delivery systems. *Nanoscale*, 2015, 7, 19611-19619.
- Dąbrowskia, A., Hubickia, Z., Podkościelnya, P., Robens, E. Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method. *Chemosphere*, 2004, 56, 91-106.
- Dai, M., Wu, C., Fang, H.M., Li, L., Yan, J.B., Zeng, D.L., Zou, T. Thermo-responsive magnetic liposomes for hyperthermia-triggered local drug delivery. *J. Microencapsul.*, 2017, 34, 408-415.
- Dalwadi, C., Patel, G. Application of nanohydrogels in drug delivery systems: recent patents review. *Recent Pat. Nanotechnol.*, 2015, 9, 17-25.
- Dandamudi, S., Campbell, R.B. The drug loading, cytotoxicity and tumor vascular targeting characteristics of magnetite in magnetic drug targeting. *Biomaterials*. 2007, 28, 4673-4683.
- Datta, N.R., Krishnan, S., Speiser, D.E., Neufeld, E., Kuster, N., Bodis, S., Hofmann, H. Magnetic nanoparticle-induced hyperthermia with appropriate payloads: Paul Ehrlich's "magic (nano)bullet" for cancer theranostics? *Cancer Treat. Rev.*, 2016, 50, 217-227.
- Dave, P.N., Chopda, L.V. Application of iron oxide nanomaterials for the removal of heavy metals. *J. Nanotechnol.*, 2014, 2014, 1-14.
- Deirram, N., Zhang, C., Kermaniyan, S.S., Johnston, A.P.R., Such, G.K. pH-responsive polymer nanoparticles for drug delivery. *Macromol. Rapid Commun.*, 2019, 40, e1800917.
- Desai, M.P., Labhasetwar, V., Amidon, G.L., Levy, R.J. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm. Res.*, 1996, 13, 1838-1845.
- Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J., Amidon, G.L. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.*, 1997, 14, 1568-1573.
- Di Silvio, D., Maccarini, M., Parker, R., Mackie, A., Fragneto, G., Bombelli, F.B. The effect of the protein corona on the interaction between nanoparticles and lipid bilayers. *J. Colloid Interface Sci.*, 2017, 504, 741-750.

- Dixit, S., Hering, J.G. Comparison of arsenic (V) and arsenic (III) sorption onto iron oxide minerals: implications for arsenic mobility. *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 37, 4182-4189.
- Driscoll, C.F., Morris, R.M., Senyei, A.E., Widder, K.J., Heller, G.S. Magnetic targeting of microspheres in blood flow. *Microvasc. Res.*, 1984, 27, 353-369.
- Doane, T.L., Burda, C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2885-2911.
- Dobson, J. Magnetic micro- and nano-particle-based targeting for drug and gene delivery. *Nanomedicine (Lond)*, 2006, 1, 31-37.
- Domenech, M., Marrero-Berrios, I., Torres-Lugo, M., Rinaldi, C. Lysosomal membrane permeabilization by targeted magnetic nanoparticles in alternating magnetic fields. *ACS Nano*, 2013, 7, 5091-5101.
- Dominguez, G., Durand, L., De Rosa, J., Danguise, E., Arozamena, C., Ferraina, P.A. Retraction and triangulation with neodymium magnetic forceps for single-port laparoscopic cholecystectomy. *Surg. Endosc.*, 2009, 23, 1660-1666.
- Dominguez-Medina, S., Blankenburg, J., Olson, J., Landes, C.F., Link, S. Adsorption of a protein monolayer via hydrophobic interactions prevents nanoparticle aggregation under harsh environmental conditions. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2013, 1, 833-842.
- Dutta, D., Sundaram, S.K., Teeguarden, J.G., Riley, B.J., Fifield, L.S., Jacobs, J.M., Addleman, S.R., Kaysen, G.A., Moudgil, B.M., Weber, T.J. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol. Sci.*, 2007, 100, 303-315.
- 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. Hyperthermia*, 2013, 29, 790-800.
- Eder, J.P., Vande Woude, G.F., Boerner, S.A., LoRusso, P.M. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15, 2207-2214.
- Edge, D., Shortt, C.M., Gobbo, O.L., Teughels, S., Prina-Mello, A., Volkov, Y., MacEneaney, P., Radomski, M.W., Markos, F. Pharmacokinetics and biodistribution of novel super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) in the anaesthetized pig. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2016, 43, 319-326.
- Ehrenberg, M.S., Friedman, A.E., Finkelstein, J.N., Oberdörster, G., McGrath, J.L. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials*, 2009, 30, 603-610.
- El-Boubbou, K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery. *Nanomedicine (Lond)*, 2018a, 13, 929-952.
- El-Boubbou, K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: clinical relevance. *Nanomedicine (Lond)*, 2018b, 13, 953-971.
- Elouear, Z., Bouzid, J., Boujelben, N., Feki, M., Jamoussi, F., Montiel, A. Heavy metal removal from aqueous solutions by activated phosphate rock. *J. Hazard. Mater.*, 2008, 156, 412-420.

- El-Sherbiny, I.M., Elbaz, N.M., Sedki, M., Elgammal, A., Yacoub, M.H. Magnetic nanoparticles-based drug and gene delivery systems for the treatment of pulmonary diseases. *Nanomedicine (Lond)*, 2017, 12, 387-402.
- Faivre, D., Böttger, L.H., Matzanke, B.F., Schüler, D. Intracellular magnetite biomineralization in bacteria proceeds by a distinct pathway involving membrane-bound ferritin and an iron(II) species. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 8495-8499.
- Falk, M.H., Issels, R.D. Hyperthermia in oncology. *Int. J. Hyperthermia*, 2001, 17, 1-18.
- F.D.A. Highlights of prescribing information. Rituximab. Initial U.S. Approval: 1997. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf)
- Feng, Q., Liu, Y., Huang, J., Chen, K., Huang, J., Xiao, K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Sci. Rep.*, 2018, 8, 2082.
- 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.
- Franger, S., Berthet, P., Berthon, J. Electrochemical synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in alkaline aqueous solutions containing complexing agents. *J. Solid State Electrochem.*, 2004, 8, 218-223.
- Frankel, R.B., Blakemore, R.P., Wolfe, R.S. Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science*. 1979, 203, 1355-1356.
- Frankel, R.B., Blakemore, R.P. Precipitation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> in magnetotactic bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1984, 304, 567-574.
- Frankel, R.B., Bazylinski, D.A. Biologically induced mineralization by bacteria. *Rev. Mineral. Geochem.*, 2003, 54, 217-247.
- Fu, F., Wang, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *J. Environ. Manage.*, 2011, 92, 407-418.
- Fu, F., Xie, L., Tang, B., Wang, Q., Jiang, S. Application of a novel strategy-advanced fenton-chemical precipitation to the treatment of strong stability chelated heavy metal containing wastewater. *Chem. Eng. J.*, 2012, 189, 283-287.
- Furlani, E.P. Magnetic biotransport: analysis and applications. *Materials*, 2010, 3, 2412-2446.
- Gagner, J.E., Lopez, M.D., Dordick, J.S., Siegel, R.W. Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function. *Biomaterials*, 2011, 32, 7241-7252.
- Galland, S., Andersson, R.L., Salajková, M., Ström, V., Olsson, R.T., Berglund, L.A. Cellulose nanofibers decorated with magnetic nanoparticles – synthesis, structure and use in magnetized high toughness membranes for a prototype loudspeaker. *J. Mater. Chem. C*, 2013, 1, 7963-7972.
- Galloway, J.M., Arakaki, A., Masuda, F., Tanaka, T., Matsunaga, T., Staniland, S.S. Magnetic bacterial protein Mms6 controls morphology, crystallinity and magnetism of cobalt-doped magnetite nanoparticles *in vitro*. *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 15244-15254.

- Galloway, J.M., Bramble, J.P., Rawlings, A.E., Burnell, G., Evans, S.D., Staniland, S.S. Nanomagnetic arrays formed with the biomineralization protein Mms6. *J. Nano Res.*, 2012a, 2012, 127-146.
- Galloway, J.M., Bramble, J.P., Rawlings, A.E., Burnell, G., Evans, S.D., Staniland, S.S. Biotemplated magnetic nanoparticle arrays. *Small*, 2012b, 8, 204-208.
- Gao, J., Xie, J.P., Ding, J.N., Jian, K., Cheng, H.N., Qui, G.Z. Extraction and purification of magnetic nanoparticles from strain of *Leptospirillum ferriphilum*. *Trans. Nonferrous Metals Soc. China*, 2006, 16, 1417-1420.
- Garanina, A., Kireev, I., Zhironkina, O., Strelkova, O., Shakhov, A., Alieva, I., Davydov, V., Murugesan, S., Khabashesku, V., Majouga, A., Agafonov, V., Uzbekov, R. Long-term live cells observation of internalized fluorescent Fe@C nanoparticles in constant magnetic field. *J. Nanobiotechnology*, 2019, 17, 27.
- Garrels, R.M., Christ, C.L. *Solutions, minerals and equilibria*. Jones and Bartlett, Boston, 1990.
- Ge, C., Du, J., Zhao, L., Wang, L., Liu, Y., Li, D., Yang, Y., Zhou, R., Zhao, Y., Chai, Z., Chen, C. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108, 16968-16973.
- Ge, F., Li, M.-M., Ye, H., Zhao, B.-X. Effective removal of heavy metal ions  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  from aqueous solution by polymer-modified magnetic nanoparticles. *J. Hazard. Mater.*, 2012, 211, 366-372.
- Geisow, M.J., Evans, W.H. pH in the endosome. Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis. *Exp. Cell Res.*, 1984, 150, 36-46.
- Gessner, A., Waicz, R., Lieske, A., Paulke, B., Mader, K., Muller, R.H. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int. J. Pharm.*, 2000, 196, 245-249.
- Gessner, A., Lieske, A., Paulke, B., Müller, R. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2002, 54, 165-170.
- Ghasemzadeh, G., Momenpour, M., Omidi, F., Hosseini, M.R., Ahani, M., Barzegari, A. Applications of nanomaterials in water treatment and environmental remediation. *Front. Environ. Sci. Eng.*, 2014, 8, 471-482.
- Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., Vande Woude G.F. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat. Rev. Cancer*, 2012, 12, 89-103.
- Giordano, S., Ponzetto, C., Di Renzo, M.F., Cooper, C.S., Comoglio, P.M. Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature*, 1989, 339, 155-156.
- Giustini, A.J., Petryk, A.A., Cassim, S.M., Tate, J.A., Baker, I., Hoopes, J.P. Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment. *Nano LIFE*, 2010, 1, 17-32.
- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T., Rotello, V.M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.*, 2004, 15, 897-900.



- Gorby, Y.A., Beveridge, T.J., Blakemore, R.P. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.*, 1988, 170, 834-841.
- Gorby Y. A. Regulation of magnetosome biogenesis by oxygen and nitrogen. Ph.D. thesis, Univ. New Hampshire, 1989.
- Goyal, L., Muzumdar, M.D., Zhu, A.X. Targeting the HGF/c-MET pathway in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2013, 19, 2310-2318.
- Grant, F.S. Aeromagnetism, geology and ore environments, I. Magnetite in igneous, sedimentary and metamorphic rocks: An overview. *Geoexploration*, 1985, 23, 303-333.
- Gratton, S.E.A., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E., DeSimone, J.M. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008a, 105, 11613-11618.
- Gratton, S.E.A., Napier, M.E., Ropp, P.A., Tian, S., Desimone, J.M. Microfabricated particles for engineered drug therapies: elucidation into the mechanisms of cellular internalization of print particles. *Pharm. Res.*, 2008b, 25, 2845-2852.
- Grünberg, K., Wawer, C., Tebo, B.M., Schüler, D. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 4573-4582.
- Grünberg, K., Müller, E.C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M., Reinhardt, R., Schüler, D. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 1040-1050.
- Grüttner, C., Müller, K., Teller, J., Westphal, F. Synthesis and functionalisation of magnetic nanoparticles for hyperthermia applications. *Int. J. Hyperthermia*, 2013, 29, 777-789.
- Gu, J., Xu, H., Han, Y., Dai, W., Hao, W., Wang, C., Gu, N., Xu, H., Cao, J. The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell. *Sci. China Life Sci.*, 2011, 54, 793-805.
- Guardia, P., Di Corato, R., Lartigue, L., Wilhelm, C., Espinosa, A., Garcia-Hernandez, M., Gazeau, F., Manna, L., Pellegrino, T. Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment. *ACS Nano*, 2012, 6, 3080-3091.
- Guerra, F.D., Campbell, M.L., Whitehead, D.C., Alexis, F. Capture of aldehyde VOCs using a series of amine-functionalized cellulose nanocrystals. *ChemistrySelect*, 2018, 3, 5495-5501.
- Guo, M., Yan, Y., Zhang, H., Yan, H., Cao, Y., Liu, K., Wan, S., Huang, J., Yue, W., Gao, J., Kwon, I. C. Magnetic and pH-responsive nanocarriers with multilayer core-shell architecture for anticancer drug delivery. *J. Mater. Chem.*, 2008, 18, 5104-5112.
- Gupta, P.K., Hung, C.T., Rao, N.S. Ultrastructural disposition of adriamycin-associated magnetic albumin microspheres in rats. *J. Pharm. Sci.*, 1989, 78, 290-294.
- Gupta, A.K., Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 2005, 26, 3995-4021.

- Gupta, V.K., Ganjali, M.R., Norouzi, P., Khani, H., Nayak, A., Agarwal, S. Electrochemical analysis of some toxic metals by ion-selective electrodes. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2011, 41, 282-313.
- Gupta, V.K., Tyagi, I., Sadegh, H., Shahryari-Ghoshekandi, R. Makhlof, A.S.H., Maazinejad, B. Nanoparticles as adsorbent; a positive approach for removal of noxious metal ions: A review. *Science, Technology and Development*, 2015, 34, 195-214.
- Hack, S.P., Bruey, J.M., Koeppen, H. HGF/MET-directed therapeutics in gastroesophageal cancer: a review of clinical and biomarker development. *Oncotarget*, 2014, 5, 2866-2880.
- Hahn, G.M. Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res.*, 1979, 39, 2264-2268.
- Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S., Altschuler, Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 353, 26-32.
- Hao, Y.-M., Man, C., Hu, Z.-B. Effective removal of Cu(II) ions from aqueous solution by amino-functionalized magnetic nanoparticles. *J. Hazard. Mater.*, 2010, 184, 392-399.
- Hematyar, M., Soleimani, M., Es-Haghi, A., Rezaei Mokarram, A. Synergistic co-delivery of doxorubicin and melittin using functionalized magnetic nanoparticles for cancer treatment: loading and in vitro release study by LC-MS/MS. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2018, 46, S1226-S1235.
- Hergt, R., Dutz, S., Müller, R., Zeisberger, M. Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J. Phys. Condens. Matter*, 2006, 18, S2919-S2934.
- Hershey, D.M., Browne, P.J., Iavarone, A.T., Teyra, J., Lee, E.H., Sidhu, S.S., Komeili, A. Magnetite biomineralization in *Magnetospirillum magneticum* is regulated by a switch-like behavior in the HtrA protease MamE. *J. Biol. Chem.*, 2016, 291, 17941-17952.
- Hilgenbrink, A.R., Low, P.S. Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. *J. Pharm. Sci.*, 2005, 94, 2135-2146.
- Hillaireau, H., Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009, 66, 2873-2896.
- Hincke, M.T., Gautron, J., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J., McKee, M.D., Nys, Y. Identification and localization of lysozyme as a component of the eggshell membranes and shell matrix. *Matrix Biology*, 2000, 19, 443-453.
- Hincke, M.T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A.B., McKee, M.D. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosciences (Landmark Ed)*, 2012, 17, 1266-1280.
- Hua, M., Zhang, S., Pan, B., Zhang, W., Lv, L., Zhang, Q. Heavy metal removal from water/wastewater by nanosized metal oxides: a review. *J. Hazard. Mater.*, 2012, 211, 317-331.
- Huang, M., Ma, Z., Khor, E., Lim, L. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharm. Res.*, 2002, 19, 1488-1494.
- Hühn, D., Kantner, K., Geidel, C., Brandholt, S., De Cock, I., Soenen, S.J., Rivera, Gil, P., Montenegro, J.M., Braeckmans, K., Müllen, K., Nienhaus, G.U., Klapper, M., Parak, W.J. Polymer-coated

- nanoparticles interacting with proteins and cells: focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano*, 2013, 7, 3253-3263.
- 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.
- Ichimura, E., Maeshima, A., Nakajima, T., Nakamura, T. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas *in vitro* and *in vivo* and its prognostic significance. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1996, 87, 1063-1069.
- 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.
- Iglesias, G.R., Delgado, A.V., Gonzalez-Caballero, E., Ramos-Tejada, M.M. Simultaneous hyperthermia and doxorubicin delivery from polymer-coated magnetite nanoparticles. *J. Magn. Mater.*, 2017, 431, 294-296.
- Iglesias, G.R., Reyes-Ortega, F., Checa Fernandez, B.L., Delgado, Á.V. Hyperthermia-triggered gemcitabine release from polymer-coated magnetite nanoparticles. *Polymers (Basel)*, 2018, 10, 269.
- Ishikawa, S., Suyama, K., Arihara, K., Itoh, M. Uptake and recovery of gold ions from electroplating wastes using eggshell membrane. *Bioresour. Technol.*, 2002, 81, 201-206.
- Ishikawa, S., Suyama, K., Arihara, K., Itoh, M. Selective recovery of uranium and thorium ions from dilute aqueous solutions by animal biopolymers. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2002, 86, 227-236.
- Issels, R.D. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur. J. Cancer*, 2008, 44, 2546-2554.
- Iyer, A.K., Khaled, G., Fang, J., Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today*, 2006, 11, 812-818.
- Jacob, J.M., Karthik, C., Saratale, R.G., Kumar, S.S., Prabakar, D., Kadirvelu, K. Pugazhendhi, A. Biological approaches to tackle heavy metal pollution: A survey of literature. *J. Environ. Manage.*, 2018, 217, 56-70.
- Jadhav, S.D., Jadhav, M.S., Jawale, R.W. Study of chloride and nitrate concentration of MulaMutha River in Pune city (Maharashtra). *Int. J. Chem. Life Sci.*, 2013, 2, 1140-1142.
- Jain, T.K., Reddy, M.K., Morales, M.A., Leslie-Pelecky, D.L., Labhasetwar, V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol. Pharm.*, 2008, 5, 316-327.
- Jang, S.H., Wientjes, M.G., Lu, D., Au, J.L. Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm. Res.*, 2003, 20, 1337-1350.
- Jimenez-Lopez, C., Romanek, C., Bazylinski, D.A. Magnetite as a prokaryotic biomarker: a review. *J. Geophys. Res.*, 2010, 115, G00G03.
- Jing, Y., Dong-Yan, H., Yousafa, M.Z., Yang-Long, H., Song, G. Magnetic nanoparticle-based cancer therapy. *Chin. Phys. B*, 2013, 22, 027506.

- Kaczor-Urbanowicz, K.E., Martin Carreras-Presas, C., Aro, K., Tu, M., Garcia-Godoy, F., Wong, D.T. Saliva diagnostics - Current views and directions. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2017, 242, 459-472.
- Kale, S.S., Kadam, A.K., Kumar, S., Pawar, N.J. Evaluating pollution potential of leachate from landfill site, from the Pune metropolitan city and its impact on shallow basaltic aquifers. *Environ Monit. Assess.*, 2010, 162, 327-346.
- Kalia, S., Kango, S., Kumar, A., Haldorai, Y., Kumari, B., Kumar, R. Magnetic polymer nanocomposites for environmental and biomedical applications. *Colloid Polym. Sci.*, 2014, 292, 2025-2052.
- Kallumadil, M., Tada, M., Nakagawa, T., Abe, M., Southern, P., Pankhurst, Q.A. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mat.*, 2009, 321, 1509-1513.
- Karami, H. Heavy metal removal from water by magnetite nanorods. *Chem. Eng. J.*, 2013, 219, 209-216.
- Karimi, M., Ghasemi, A., Sahandi, Zangabad, P., Rahighi, R., Moosavi Basri, S.M., Mirshekari, H., Amiri, M., Shafaei Pishabad, Z., Aslani, A., Bozorgomid, M., Ghosh, D., Beyzavi, A., Vashi, A., Aref, A.R., Haghani, L., Bahrami, S., Hamblin, M.R. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chem. Soc. Rev.*, 2016b, 45, 1457-1501.
- Karimi, M., Eslami, M., Sahandi-Zangabad, P., Mirab, F., Farajisafiloo, N., Shafaei, Z., Ghosh, D., Bozorgomid, M., Dashkhaneh, F., Hamblin, M.R. pH-sensitive stimulus-responsive nanocarriers for targeted delivery of therapeutic agents. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2016b, 8, 696-716.
- Kashyap, S., Woehl, T. J., Liu, X., Mallapragada, S. K., Prozorov, T. Nucleation of iron oxide nanoparticles mediated by Mms6 protein *in situ*. *ACS Nano*, 2014a, 8, 9097-9106.
- Kashyap, S., Woehl, T., Valverde-Tercedor, C., Sanchez-Quesada, M., Jimenez-Lopez, C., Prozorov, T. Visualization of iron-binding micelles in acidic recombinant biomineralization protein, MamC. *J. Nanomater.*, 2014b, 2014, 320124.
- Katzmann, E., Scheffel, A., Gruska, M., Plitzko, J.M., Schüler, D. Loss of the actin-like protein MamK has pleiotropic effects on magnetosome formation and chain assembly in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Mol. Microbiol.*, 2010, 77, 208-224.
- Katzmann, E., Müller, F.D., Lang, C., Messerer, M., Winklhofer, M., Plitzko, J.M., Schüler, D. Magnetosome chains are recruited to cellular division sites and split by asymmetric septation. *Mol. Microbiol.*, 2011, 82, 1316-1329.
- Kawashita, M., Tanaka, M., Kokubo, T., Inoue, Y., Yao, T., Hamada, S., Shinjo, T. Preparation of ferrimagnetic magnetite microspheres for *in situ* hyperthermic treatment of cancer. *Biomaterials*, 2005, 26, 2231-2238.
- Kendall, M., Ding, P., Kendall, K. Particle and nanoparticle interactions with fibrinogen: the importance of aggregation in nanotoxicology. *Nanotoxicology*, 2011, 5, 55-65.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z., Zhu, Y.G. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environ. Pollut.*, 2008, 152, 686-692.

- Khare, P., Yadav, A., Ramkumar, J., Verma, N. Microchannel-embedded metal–carbon–polymer nanocomposite as a novel support for chitosan for efficient removal of hexavalent chromium from water under dynamic conditions. *Chem. Eng. J.*, 2016, 293, 44-54.
- Kievit, F.M., Wang, F.Y., Fang, C., Mok, H., Wang, K., Silber, J.R., Ellenbogen, R.G., Zhang, M. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer *in vitro*. *J. Control. Release*, 2011, 152, 76-83.
- Kim, J.S., Yoon, T.-J., Yu, K.N., Kim, B.G., Park, S.J., Kim, H.W., Lee, K.H., Park, S.B., Lee, J.-K., Cho, M.H. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol. Sci.*, 2006, 89, 338-347.
- Kim, S., Aga, D.S. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J. Toxicol. Environ. Health Part B: Crit. Rev.*, 2007, 10, 559-573.
- Kim, D.H., Rozhkova, E.A., Ulasov, I.V., Bader, S.D., Rajh, T., Lesniak, M.S., Novosad, V. Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction. *Nat. Mater.*, 2010, 9, 165-171.
- Kim, S.T., Saha, K., Kim, C., Rotello, V.M. The role of surface functionality in determining nanoparticle cytotoxicity. *Acc. Chem. Res.*, 2013, 46, 681-691.
- Kim, K.H., Kim, H. Progress of antibody-based inhibitors of the HGF–cMET axis in cancer therapy. *Exp. Mol. Med.*, 2017, 49, 307.
- Kirschvink, J.L. Magnetite biomineralization and geomagnetic sensitivity in higher animals: an update and recommendations for future study. *Bioelectromagnetics*, 1989, 10, 239-259.
- Kirui, D.K., Rey, D.A., Batt, C.A. Gold hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging. *Nanotechnology*, 2010, 21, 105105.
- Kohler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256, 495-497.
- Kokkinopoulou, M., Simon, J., Landfester, K., Mailänder, V., Lieberwirth, I. Visualization of the protein corona: towards a biomolecular understanding of nanoparticle-cell-interactions. *Nanoscale*, 2017, 9, 8858-8870.
- Kolinko, I., Lohße, A., Borg, S., Raschdorf, O., Jogler, C., Tu, Q., Pósfai, M., Tompa, E., Plitzko, J., Brchmann, A., Wanner, G., Müller, R., Zhang, Y., Schüller, D. Biosynthesis of magnetic nanostructures in a foreign organism by transfer of bacterial magnetosome gene clusters. *Nat. Nanotechnol.*, 2014, 9, 193-197.
- 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.
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D.K., Jensen, G.J. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science*, 2006, 311, 242-245.
- Komeili, A. Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012, 36, 232-255.

- Kong, S.D., Zhang, W., Lee, J.H., Brammer, K., Lal, R., Karin, M., Jin, S. Magnetically vectored nanocapsules for tumor penetration and remotely switchable on-demand drug release. *Nano Lett.*, 2010, 10, 5088-5092.
- Kostov, I. *Mineralogy*. Oliver & Boyd, Edinburgh, 1968.
- Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Ramge, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., Alyautdin, R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J. Drug Target.*, 2002, 10, 317-325.
- Kukkadapu, R.K., Zachara, J.M., Fredrickson, McKinley, J.P., Kennedy, D.W.I., Smith, S.C., Dong, H. Reductive biotransformation of Fe in shale-limestone saprolite containing Fe(III) oxides and Fe(II)/Fe(III) phyllosilicates. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2006, 70, 3662-3676.
- Lammers, T., Hennink, W., Storm, G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br. J. Cancer*, 2008, 99, 392-397.
- Lane, L.A., Qian, X., Smith, A.M., Nie, S. Physical chemistry of nanomedicine: understanding the complex behaviors of nanoparticles *in vivo*. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2015, 66, 521-547.
- Langmuir, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.*, 1918, 40, 1361-1403.
- 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.
- Lee, C.C., Lien, H.L., Wu, S.C., Doong, R.A., Chao, C.C. Reduction of priority pollutants by nanoscale zerovalent iron in subsurface environments. In: *Aquananotechnology: Global prospects*. CRC Press, Boca Raton, FL., U.S.A., 2014, 63-96.
- Lee, Y.K., Choi, E.J., Webster, T.J., Kim, S.H., Khang, D. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *Int. J. Nanomedicine*, 2015, 10, 97-113.
- Lefèvre, C.T., Menguy, N., Abreu, F., Lins, U., Pósfai, M., Prozorov, T., Pignol, D., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A. A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria. *Science*, 2011, 334, 1720-1723.
- Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A. Ecology, Diversity, and Evolution of Magnetotactic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2013, 77, 497-526.
- Leroux, J.C., De Jaeghere, F., Anner, B., Doelker, E., Gurny, R. An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(d,l-lactic acid) nanoparticles by human monocytes. *Life Sci.*, 1995, 57, 695-703.
- Li, Y.H., Ding, J., Luan, Z., Di, Z., Zhu, Y., Xu, C., Wu, D., Wei, B. Competitive adsorption of Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> ions from aqueous solutions by multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 2003a, 41, 2787-2792.
- Li, Y.H., Wang, S., Luan, Z., Ding, J., Xu C., Wu, D. Adsorption of cadmium(II) from aqueous solution by surface oxidized carbon nanotubes. *Carbon*, 2003b, 41, 1057-1062.

- 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<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 9894.
- Lim, S.-F., Zheng, Y.-M., Chen, J.P. Organic arsenic adsorption onto a magnetic sorbent. *Langmuir*, 25, 2009, 4973-4978.
- Lindman, S., Lynch, I., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., Linse, S. Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-iso-propylacrylamide/ N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles. Effects of particle size and hydrophobicity. *Nano Lett.*, 2007, 7, 914-920.
- Lippard, S.J., Berg, J.M. Principles of bioinorganic chemistry. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 1995, 23, 115-115.
- Lishko, V.K., Burke, T., Ugarova, T. Antiadhesive effect of fibrinogen: a safeguard for thrombus stability. *Blood*, 2007, 109, 1541-1549.
- 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.
- Liu, X., Zhang, H., Nayak, S., Parada, G., Anderegg, J., Feng, S., Nilsen-Hamilton, M., Akinc, M., Mallapragada, S.K. Effect of surface hydrophobicity on the function of the immobilized biomineralization protein Mms6. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2015, 54, 10284-10292.
- Liu, F., Le, W., Mej, T., Wang, T., Chen, L., Lei, Y., Cui, S., Chen, B., Cui, Z., Shao, C. *In vitro* and *in vivo* targeting imaging of pancreatic cancer using a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoprobe modified with anti-mesothelin antibody. *Int. J. Nanomed.*, 2016, 11, 2195-2207.
- Lohße, A., Ullrich, S., Katzmann, E., Borg, S., Wanner, G., Richter, M., Voigt, B., Schweder, T., Schüler, D. Functional analysis of the magnetosome island in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: the mamAB operon is sufficient for magnetite biomineralization. *PLoS One*, 2011, 6, e25561.
- 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.
- Lopez-Moreno, R., Fernandez-Vivas, A., Valverde-Tercedor, C., Azuaga Fortes, A.I., Salvador 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.
- Lovley, D.R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.*, 1991, 55, 259-287.
- Lowenstam, H.A. Minerals formed by organisms. *Science*, 1981, 211, 1126-1131.
- Lowenstam, H.A., Weiner, S. On Biomineralization. Oxford University Press, New York, 1989.

- Lu, W., Melancon, M.P., Xiong, C., Huang, Q., Elliott, A., Song, S., Zhang, R., Flores, L.G., Gelovani, J.G., Wang, L.V., Ku, G., Stafford, R.J., Li, C. Effects of photoacoustic imaging and photothermal ablation therapy mediated by targeted hollow gold nanospheres in an orthotopic mouse xenograft model of glioma. *Cancer Res.*, 2011, 71, 6116-6121.
- Lu, Y.-C., Changa, F.-Y., Tu, S.-J., Chen, J.-P., Ma, Y.-H. Cellular uptake of magnetite nanoparticles enhanced by NdFeB magnets in staggered arrangement. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2017, 427, 71-80.
- Lundqvist, M., Sethson, I., Jonsson, B.H. Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir*, 2004, 20, 10639-10647.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., Dawson, K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, 105, 14265-14270.
- Lynch, I., Dawson, K.A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, 2008, 3, 40-47.
- Ma, P.C., Maulik, G., Christensen, J., Salgia, R. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.*, 2003, 22, 309-325.
- Ma, P.C., Tretiakova, M.S., MacKinnon, A.C., Ramnath, N., Johnson, C., Dietrich, S., Seiwert, T., Christensen, J.G., Jagadeeswaran, R., Krausz, T., Vokes, E.E., Husain, A.N., Salgia, R. Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Gene. Chromosome. Canc.*, 2008, 47, 1025-1037.
- Ma, J., Pazos, I.M., Zhang, W., Culik, R.M., Gai, F. Site-specific infrared probes of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2015, 66, 357-377.
- Macé, C., Desrocher, S., Gheorghiu, F., Kane, A., Pupeza, M., Cernik, M., Kvapil, P., Venkatakrisnan, R., Zhang, W. Nanotechnology and groundwater remediation: a step forward in technology understanding. *Remediation*, 2006, 16, 23-33.
- 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.
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Milani, A.S., Stroeve, P. An *in vitro* study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure. *Nanotechnology*, 2009, 20, 225104.
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Shokrgozar, M.A., Milani, A.S., Häfelif, U.O., Stroeve, P. A new approach for the *in vitro* identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2010, 75, 300-309.
- Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M.R., Monopoli, M.P., Bombelli, F.B., Laurent, S. Protein nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem. Rev.*, 2011, 111, 5610-5637.
- Mann, S., Frankel, R.B., Blakemore, R.P. Structure, morphology and crystal growth of bacterial magnetite. *Nature*, 1984a, 310, 405-407.



- Mann, S., Moench, T.T., Williams, R.J.P. A high resolution electron microscopic investigation of bacterial magnetite. Implications for crystal growth. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.*, 1984b, 221, 385-393.
- Mann, S. On the nature of boundary-organized biomineralization. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1986, 28, 363-371.
- Mann, S., Sparks, N.H.C., Blakemore, R.P. Ultrastructure and characterization of anisotropic magnetic inclusions in magnetotactic bacteria. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.*, 1987a, 231, 469-476.
- Mann, S., Sparks, N.H.C., Blakemore, R.P. Structure, morphology and crystal growth of anisotropic magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.*, 1987b., 231, 477-487.
- Mann, S. *Biomineralization principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press Inc., New York, 2001.
- Mao, S., Germershaus, O., Fischer, D., Linn, T., Schnepf, R., Kissel, T. Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nanocomplexes by epithelial cells. *Pharm. Res.*, 2005, 22, 2058-2068.
- Martin, L.P., Sill, M., Shahin, M.S., Powell, M., Disilvestro, P., Landrum, L.M., Gaillard, S.L., Goodheart, M.J., Hoffman, J., Schilder, R.J. Gynecologic Oncology A phase II evaluation of AMG 102 (rilatumumab) in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.*, 2014, 132, 526-530.
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein "salting-out" procedure. *Anal. Biochem.*, 2007, 366, 102-104.
- Maruyama, K., Takeyama, H., Nemoto, E., Tanaka, T., Yoda, K., Matsunaga, T. Single nucleotide polymorphism detection in aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene using bacterial magnetic particles based on dissociation curve analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 87, 687-694.
- Maruyama, K., Takeyama, H., Mori, T., Ohshima, K., Ogura, S., Mochizuki, T., Matsunaga, T. Detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) using a fully automated system with a nano-scale engineered biomagnetite. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 2282-2288.
- Matsumoto, K., Umitsu, M., De Silva, D.M., Roy, A., Bottaro, D.P. Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery. *Cancer Sci.*, 2017, 108, 296-307.
- Matsunaga, T., Suzuki, T., Tanaka, M., Arakaki, A. Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano-biotechnology. *Trends. Biotechnol.*, 2007, 25, 182-188.
- MacDonald, C., Barbee, K., Polyak, B. Force dependent internalization of magnetic nanoparticles results in highly loaded endothelial cells for use as potential therapy delivery vectors. *Pharm. Res.*, 2012, 29, 1270-1281.
- McNeil, S.E. *Nanoparticle therapeutics: a personal perspective*. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol., 2009, 1, 264-271.

- Medeiros, S.F., Santos, A.M., Fessi, H., Elaissari, A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. *Int. J. Pharm.*, 2011, 403, 139-161.
- Meehan, K.R., Zacharski, L.R., Moritz, T.E., Rickles, F.R. Pretreatment fibrinogen levels are associated with response to chemotherapy in patients with small cell carcinoma of the lung: Department of Veterans Affairs Cooperative Study 188. *Am. J. Hematol.*, 1995, 49, 143-148.
- Mehdaoui, B., Mere, 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.
- Mehrmohammadi, M., Yoon, K.Y., Qu, M., Johnston, K.P., Emelianov, S.Y. Enhanced pulsed magneto-motive ultrasound imaging using superparamagnetic nanoclusters. *Nanotechnology*, 2011, 22, 045502.
- Meisen, U., Kathrein, H. The Influence of particle size, shape and particle size distribution on properties of magnetites for the production of toners. *J. Imaging Technol.* 2000, 44, 508-513.
- Mejías, R., Pérez-Yagüe, S., Gutiérrez, L., Cabrera, L.I., Spada, R., Acedo, P., Serna, C.J., Lázaro, F.J., Villanueva, A., Morales Mdel, P., Barber, D.F. Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided *in vivo* delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 2011, 32, 2938-2952.
- Meldrum, F.C., Mann, S., Heywood, B.R., Frankel, R.B., Bazylnski, D.A. Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.*, 1993, 251, 231-236.
- Mertz, D., Sandre, O., Bégin-Colin, S. Drug releasing nanoplatforms activated by alternating magnetic fields. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 2017, 1861, 1617-1641.
- Meyers, P.H., Cronic, F., Nice, C.M. Jr. Experimental approach in the use and magnetic control of metallic iron particles in the limphatic and vascular system of dogs as a contrast and isotopic agent. *Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med.*, 1963, 90, 1068-1077.
- Mo, H.N., Liu, P. Targeting MET in cancer therapy. *Chronic Dis. Transl. Med.*, 2017, 3, 148-153.
- 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.
- Monopoli, M.P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Bombelli, F.B., Dawson, K.A. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 2525-2534.
- Monteil, C.L., Menguy, N., Prévéral, S., Warren, A., Pignol, D., Lefèvre, C.T. Accumulation and dissolution of magnetite crystals in a magnetically responsive ciliate. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018, 84, e02865-17.
- Moore, T.L., Rodriguez-Lorenzo, L., Hirsch, V., Balog, S., Urban, D., Jud, C., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M., Petri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44, 6287-6305.

- Moros, M., Idiago-López, J., Asín, L., Moreno-Antolín, E., Beola, L., Grazú, V., Fratila, R.M., Gutiérrez, L., de la Fuente, J.M. Triggering antitumoural drug release and gene expression by magnetic hyperthermia. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2019, 138, 326-343.
- Mou, X., Ali, Z., Li, S., He, N.J. Applications of magnetic nanoparticles in targeted drug delivery system. *Nanosci. Nanotechnol.*, 2015, 15, 54-62.
- Muchuweti, M., Birkett, J.W., Chinyanga, E., Zvauya, R., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N. Heavy metal content of vegetables irrigated with mixtures of wastewater and sewage sludge in Zimbabwe: Implications for human health. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 2006, 112, 41-48.
- Murat, D., Byrne, M., Komeili, A. Cell biology of prokaryotic organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010, 2, a000422.
- 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.
- Muro, S., Garnacho, C., Champion, J.A., Leferovich, J., Gajewski, C., Schuchman, E.H., Mitragotri, S., Muzykantov, V.R. Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers. *Mol. Ther.*, 2008, 16, 1450-1458.
- Nagayama, S., Ogawara, K., Minato, K., Fukuoka, Y., Takakura, Y., Hashida, M., Higaki, K., Kimura, T. Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor. *Int. J. Pharm.*, 2007, 329, 192-198.
- Naghizadeh, M., Taher, M.A., Nejad, L.Z., Moghaddam, F.H. Fabrication, characterization and theoretical investigation of novel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ egg-shell membrane as a green nanosorbent for simultaneous preconcentration of Cu(II) and Tl(I) prior to ETAAS determination. *Environ. Nanotechnol. Monit.*, 2018, 10, 171-178.
- Naiya, T.K., Bhattacharya, A.K., Das, S.K. Adsorption of Cd(II) and Pb(II) from aqueous solutions on activated alumina. *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, 333, 14-26.
- NanoRem. ([www.nanorem.eu/Displaynews.aspx?ID=938](http://www.nanorem.eu/Displaynews.aspx?ID=938)):
- A guide to nanoparticles for the remediation of contaminated sites. *NanoRem Bulletin*, 4, 2017a.
  - NanoRem pilot site—Spolchemie II, Czech Republic: Remediation of BTEX compounds using nano-goethite. *NanoRem Bulletin*, 8, 2017b.
  - NanoRem pilot site—Nitrastur, Spain: Remediation of arsenic in groundwater using nanoscale zero-valent iron. *NanoRem Bulletin*, 12, 2017c.
- Naran, S., Zhang, X., Hughes, S.J. Inhibition of HGF/MET as therapy for malignancy. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2009, 13, 569-581.
- Nassar, N.N. Rapid removal and recovery of Pb(II) from wastewater by magnetic nanoadsorbents. *J. Hazard. Mater.*, 2010, 184, 538-546.

- Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.*, 2009, 8, 543-557.
- Nguyen, H.V., Suzuki, E., Oestreicher, Z., Minamide, H., Endoh, H., Fukumori, Y., Taoka, A.A. protein-protein interaction in magnetosomes: TPR protein MamA interacts with an Mms6 protein. *Biochem. Biophys. Rep.*, 2016, 7, 39-44.
- Nissim, J., Robson, J. Preparation and standardisation of saccharated iron oxide for intravenous administration. *Lancet*, 1949, 253, 686-689.
- Norman, M.E., Williams, P., Illum, L. Human serum-albumin as a probe for surface conditioning (opsonization) of block copolymer-coated microspheres. *Biomaterials*, 1992, 13, 841-849.
- Nudelman, H., Zarivach, R. Structure prediction of magnetosome-associated proteins. *Front. Microbiol.*, 2014, 5, 9.
- 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-biomineralizing magnetosome-associated protein MamC. *J. Struct. Biol.*, 2016, 194, 244-252.
- 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. D Struct. Biol.*, 2018a, 74, 10-20.
- Nudelman, H., Lee, Y.Z., Hung, Y.L., Kolusheva, S., Upcher, A., Chen, Y.C., Chen, J.Y., Sue, S.C., Zarivach, R. Understanding the biomineralization role of Magnetite-Interacting Components (MICs) from magnetotactic bacteria. *Front. Microbiol.*, 2018b, 9, 2480.
- Obaidat, I.M., Issa, B., Haik, Y. Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia. *Nanomaterials*, 2015, 5, 63-89.
- Obst, K., Yealland, G., Balzus, B., Miceli, E., Dimde, M., Weise, C., Eravci, M., Bodmeier, R., Haag, R., Calderón, M., Charbaji, N., Hedtrich, S. Protein Corona Formation on Colloidal Polymeric Nanoparticles and Polymeric Nanogels: Impact on Cellular Uptake, Toxicity, Immunogenicity, and Drug Release Properties. *Biomacromolecules*, 2017, 18, 1762-1771.
- Ogawara, K., Furumoto, K., Nagayama, S., Minato, K., Higaki, K., Kai, T., Kimura, T. Precoating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles. *J. Control. Release*, 2004, 100, 451-455.
- Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C., Pennacchietti, S., Nicotra, M.R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P.G., Comoglio, P.M., Di Renzo, M.F. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br. J. Cancer*, 1996, 74, 1862-1868.
- Ortega, D., Pankhurst Q.A. *Magnetic hyperthermia. Vol 1 (Nanostructures through Chemistry) in Nanoscience.* Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013.

- 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.
- Owens, D.E. 3rd, Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 2006, 307, 93-102.
- Palchetti, S., Digiaco, L., Pozzi, D., Peruzzi, G., Micarelli, E., Mahmoudi, M., Caracciolo, G. Nanoparticles-cell association predicted by protein corona fingerprints. *Nanoscale*, 2016, 8, 12755-12763.
- Pandey, N., Shukla, S. K., Singh N. B. Water purification by polymer nanocomposites: an overview. *Nanocomposites*, 2017, 3, 47-66,
- Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2003, 36, R167.
- Peng, Q., Zhang, S., Yang, Q., Zhang, T., Wei, X.Q., Jiang, L., Zhang, C.L., Chen, Q.M., Zhang, Z.R., Lin, Y.F. Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system. *Biomaterials*, 2013, 34, 8521-8530.
- Perez-Gonzalez, T.C., Jimenez-Lopez, C., Neal, A.L., Rull-Perez, F., Rodríguez-Navarro, A., Fernandez-Vivas, A., Iañez-Pareja, E. Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2010, 74, 967-979.
- Perez-Gonzalez, T., Rodríguez-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.
- Parikh, S.J., Chorover, J. ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. *Langmuir*, 2006, 22, 8492-8500.
- Petri-Fink, A., Steitz, B., Finka, A., Salaklang, J., Hofmann, H. Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, 68, 129-137.
- Petrova, T.M., Fachikov, L., Hristov, J. The magnetite as adsorbent for some hazardous species from aqueous solutions: a review. *Int. Rev. Chem. Eng.*, 2011, 3, 134-152.
- Pietronave, S., Iafisco, M., Locarno, D., Rimondini, L., Prat, M. Functionalized nanomaterials for diagnosis and therapy of cancer. *J. Appl. Biomater. Biomech.*, 2009, 7, 77-89.
- Pósfai, M., Lefèvre, C.T. Trubitsyn, D., Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. Phylogenetic significance of composition and cristal morphology of magnetosome minerals. *Front. Microbiol.*, 2013, 4, 344.
- Prasad, M., Lambe, U.P., Brar, B., Shah, I., J.M., Ranjan, K., Rao, R., Kumar, S., Mahant, S., Khurana, S.K., Iqbal, H.M.N., Dhama, K., Misri, J., Prasad, G. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, 97, 1521-1537.
- Prat, M., Crepaldi, T., Pennacchietti, S., Bussolino, F., Comoglio, P.M. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J. Cell Sci.*, 1998, 111, 237-247.

- Prat, M., Oltolina, F., Basilico, C. Monoclonal antibodies against the MET/HGF receptor and its ligand: multitask tools with applications from basic research to therapy. *Biomedicines*, 2014, 2, 359-383.
- Prijic, S., Scancar, J., Romih, R., Cemazar, M., Bregar, V.B., Znidarsic, A., Sersa, G. Increased cellular uptake of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles into malignant cells by an external magnetic field. *J. Membr. Biol.*, 2010, 236, 167-179.
- 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.*, 2007a, 17, 951-957.
- Prozorov, T., Palo, P., Wang, L., Nilsen-Hamilton, M., Jones, D.A., Orr, D., Mallapragada, S.K., Narasimhan, B., Canfield, P.C., Prozorov, R. Cobalt ferrite nanocrystals: out-performing magnetotactic bacteria. *ACS Nano*, 2007b, 1, 228-233.
- Prozorov, T., Bazylinski, D.A., Mallapragada, S.K., Prozorov, R. Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: topical review. *Mater. Sci. Eng. R*, 74, 2013, 133-172.
- Qaddoumi, M., Ueda, H., Yang, J., Davda, J., Labhasetwar, V., Lee, V. The characteristics and mechanisms of uptake of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers. *Pharm. Res.*, 2004, 21, 641-648.
- Qian, Z.M., Li, H., Sun, H., Ho, K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.*, 2002, 54, 561-587.
- Quinlan, A., Murat, D., Vali, H., Komeili, A. The HtrA/DegP family protease MamE is a bifunctional protein with roles in magnetosome protein localization and magnetite biomineralization. *Mol. Microbiol.*, 2011, 80, 1075-1087.
- Quinto, C.A., Mohindra, P., Tong, S., Bao, G. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment. *Nanoscale*, 2015, 7, 12728-12736.
- Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., Yahia, L., Mahmoudi, M. Nanoparticle and protein corona. Chapter 2 in *Protein-nanoparticle interactions*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2013.
- Rajan, C.S. Nanotechnology in groundwater remediation. *Int. J. Environ. Sci. Dev.*, 2011, 2, 182-187.
- Rajput, S., Pittman, U.C., Mohan, D. Magnetic magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticle synthesis and applications for lead (Pb<sup>2+</sup>) and chromium (Cr<sup>6+</sup>) removal from water. *J. Colloid Interface Sci.*, 2016, 468, 334-346.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R. Rang and Dale's Pharmacology. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, 2007.
- Raschdorf, O., Müller, F.D., Pósfai, M., Plitzko, J.M., Schüler, D. The magnetosome proteins MamX, MamZ and MamH are involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Mol. Microbiol.*, 2013, 89, 872-886.
- Raschdorf, O., Bonn, F., Zeytuni, N., Zarivach, R., Becher, D., Schüler, D. A quantitative assessment of the membrane-integral sub-proteome of a bacterial magnetic organelle. *J. Proteomics*, 2018, 172, 89-99.

- Raussens, V., Ruyschaert, J.M., Goormaghtigh, E. Protein concentration is not an absolute prerequisite for the determination of secondary structure from circular dichroism spectra: a new scaling method. *Anal. Biochem.*, 2003, 319, 114-121.
- Rauscher, H., Roebben, G., Sanfeliu, A. B., Emons, H., Gibson, N., Koeber, R., Stamm, H. Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term “nanomaterial”: Part 3, Scientific-technical evaluation of options to clarify the definition and to facilitate its implementation. JRC scientific and policy reports, 2015, JRC95675, EUR 27240, Luxembourg.
- 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.
- Rawlings, A.E., Bramble, J.P., Hounslow, A.M., Williamson, M.P., Monnington, A.E., Cooke, D.J., Staniland, S.S. Ferrous iron binding key to Mms6 magnetite biomineralisation: a mechanistic study to understand magnetite formation using pH titration and NMR spectroscopy. *Chemistry*, 2016, 22, 7885-7894.
- Ray, P.Z., Shipley, H.J. Inorganic nano-adsorbents for the removal of heavy metals and arsenic: a review. *RSC Adv.*, 2015, 5, 29885-29907.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.*, 2004, 377, 159-169.
- Richter, G.W. The cellular transformation of injected colloidal iron complexes into ferritin and hemosiderin in experimental animals a study with the aid of electron microscopy. *J. Exp. Med.*, 1959, 109, 197-216.
- Rickerby, D.G., Morrison, M. Nanotechnology and the environment: A European perspective. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2007, 8, 19-24.
- Ritz, S., Schöttler, S., Kotman, N., Baier, G., Musyanovych, A., Kuharev, J., Landfester, K., Schild, H., Jahn, O., Tenzer, S., Mailänder, V. Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules*, 2015, 16, 1311-1321.
- Roberg, K., Kågedal, K., Ollinger, K. Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am. J. Pathol.*, 2002, 161, 89-96.
- Rodríguez-Ruiz, I., Delgado-López, J.M., Durán-Olivencia, M.A., Iafisco, Tampieri, M.A., Colangelo, D., Prat, M., Gómez-Morales, J. pH-responsive delivery of doxorubicin from citrate-apatite nanocrystals with tailored carbonate content. *Langmuir*, 2013, 29, 8213-8221.
- Roh, Y., Gao, H., Vali, H., Kennedy, D.W., Yang, Z.K., Gao, W., Dohnalkova, A.C., Stapleton, R.D., Moon, J.W., Phelps, T.J., Fredrickson, J.K., Zhou, J. Metal reduction and iron biomineralization by a psychrotolerant Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella* sp. strain PV-4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 3236-3244.
- Rosensweig, R.E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2002, 252, 370-374.
- Roser, M., Fischer, D., Kissel, T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II. Effect of surface charges on *in vitro* phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1998, 46, 255-263.

- Ruco, L., Stoppacciaro, A., Ballarini, F., Prat, M., Scarpino, S. Met protein and hepatocyte growth factor (HGF) in papillary carcinoma of the thyroid: evidence for a pathogenetic role in tumorigenesis. *J. Pathol.*, 2001, 194, 4-8.
- Rügheimer, L., Hansell, P., Wolgast, M. Determination of the charge of the plasma proteins and consequent Donnan equilibrium across the capillary barriers in the rat microvasculature. *Acta Physiol.*, 2008, 194, 335-339.
- Ruiz, A., Hernández, Y., Cabal, C., González, E., Veintemillas-Verdaguer, S., Martínez, E., Morales, M.P. Biodistribution and pharmacokinetics of uniform magnetite nanoparticles chemically modified with polyethylene glycol. *Nanoscale*. 2013, 5, 11400- 11408.
- Safiullin, R., Christenson, W., Owaynat, H., Yermolenko, I.S., Kadirov, M.K., Ros, R., Ugarova, T.P. Fibrinogen matrix deposited on the surface of biomaterials acts as a natural anti-adhesive coating. *Biomaterials*, 2015, 67, 151-159.
- Sahoo, S.K., Labhasetwar, V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol. Pharm.*, 2005, 2, 373-383.
- Sanchez, C., El Hajj Diab, D., Connord, V., Clerc, P., Meunier, E., Pipy, B., Payré, B., Tan, R.P., Gougeon, M., Carrey, J., Gigoux, V., Fourmy, D. Targeting a G-protein-coupled receptor overexpressed in endocrine tumors by magnetic nanoparticles to induce cell death. *ACS Nano*, 2014, 8, 1350-1363.
- Sattler, M., Salgia, R. c-Met and hepatocyte growth factor: potential as novel targets in cancer therapy. *Curr. Oncol. Rep.*, 2007, 9, 102-108.
- Sau, S., Alsaab, H.O., Bhise, K., Alzhrani, R., Nabil, G., Iyer, A.K. Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy: A groundbreaking approach for reprogramming malfunctioned tumor environment. *J. Control Release*, 2018, 274, 24-34.
- Savage, N., Diallo, M.S. Nanomaterials and water purification: Opportunities and challenges. *J. Nanoparticle Res.*, 2005, 7, 331-342.
- Scagliotti, G.V., Novello, S., von Pawel, J. The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology. *Cancer Treat. Rev.*, 2013, 39, 793-801.
- Scheffel, A., Gruska, M., Faivre, D., Linaroudis, A., Graumann, P.L., Plitzko, J.M., Schüler, D. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature*, 2006, 440, 110-114.
- 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.
- Schiffelers, R.M., Koning, G.A., ten Hagen, T.L.M., Fens, M.H.A.M., Schraa, A.J., Janssen, A.P.C.A., Kok, R.J., Molema, G., Storm, G. Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J. Control. Release*, 2003, 91, 115-122.
- Schmidt, L., Duh, F.M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S.W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., Allikmets, R., Chidambaram, A., Bergerheim, U.R., Feltis, J.T.,



- Casadevall, C., Zamarron, A., Bernues, M., Richard, S., Lips, C.J., Walther, M.M., Tsui, L.C., Geil, L., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Lipan, J., Slife, L., Brauch, H., Decker, J., Niehans, G., Hughson, M.D., Moch, H., Storkel, S., Lerman, M.I., Linehan, W.M., Zbar, B. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.*, 1997, 16, 68-73.
- Schmitz-Antoniak, C. X-ray absorption spectroscopy on magnetic nanoscale systems for modern applications. *Rep. Prog. Phys.*, 2015, 78, 062501.
- Schüler, D. Molecular analysis of a subcellular compartment: the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.*, 2004, 181, 1-7.
- Schüler, D. Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, 32, 654-672.
- Schwertmann, U., Cornell, R.M. *Iron Oxides in the laboratory: Preparation and characterization*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- Selby, L.I., Cortez-Jugo, C.M., Such, G.K., Johnston, A.P.R. Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2017, 9, c1452.
- Senbanjo, L.T., Chellaiah, M.A. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2017, 5, 18.
- Sheng, L., Luo, M., Sun, X., Lin, N., Mao, W., Su, D. Serum fibrinogen is an independent prognostic factor in operable nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 2013, 133, 2720-2725.
- Shevtsov, M.A., Nikolaev, B.P., Ryzhov, V.A., Yakovleva, L.Y., Marchenko, Y.Y., Parr, M.A., Rolich, V.I., Mikhrina, A.L., Dobrodumov, A.V., Pitkin, E., Multhoff, G. Ionizing radiation improves glioma-specific targeting of superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with cmHsp70.1 monoclonal antibodies (SPION-cmHsp70.1). *Nanoscale*, 2015, 7, 20652-20664.
- Shi, M., Ho, K., Keating, A., Shoichet, M.S. Doxorubicin-Conjugated Immuno-Nanoparticles for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Adv. Funct. Mater.*, 2009, 19, 1689-1696.
- Shubayev, V.I., Pisanic, T.R., Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, 61, 467-477.
- Sidorov, I.A., Prabakaran, P., Dimitrov, D.S. Non-covalent conjugation of nanoparticles to antibodies via electrostatic interactions – A computational model. *J. Comput. Theor. Nanosci.*, 2007, 4, 1103-1107.
- Siegfried, J.M., Weissfeld, L.A., Luketich, J.D., Weyant, R.J., Gubish, C.T., Landreneau, R.J. The clinical significance of hepatocyte growth factor for non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.*, 1998, 66, 1915-1918.
- Sierra, J.R., Tsao, M.S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 2011, 3, S21-S35.
- Sifniotis, V., Cruz, E., Eroglu, B., Kayser, V. Current Advancements in Addressing Key Challenges of Therapeutic Antibody Design, Manufacture, and Formulation. *Antibodies (Basel)*, 2019, 8, 36.

- Siponen, M.I., Adryanczyk, G., Ginet, N., Arnoux, P., Pignol, D. Magneto-chrome: a c-type cytochrome domain specific to magnetotactic bacteria. *Biochem. Soc. Trans.*, 2012, 40, 1319-1323.
- Siponen, M.I., Legrand, P., Widdrat, M., Jones, S.R., Zhang, W.-J., Chang, M.C.Y., Faivre, D., Arnoux, P., Pignol, D. Structural insight into magneto-chrome-mediated magnetite biomineralization. *Nature*, 2013, 502, 681-684.
- Slabinski, L., Jaroszewski, L., Rychlewski, L., Wilson, I.A., Lesley, S.A., Godzik, A. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics*, 2007, 23, 3403-3405.
- Slobodkin A.I., Wiegel J. Fe(III) as an electron acceptor for H<sub>2</sub> oxidation in thermophilic anaerobic enrichment cultures from geothermal areas. *Extremophiles*, 1997, 1, 106-109.
- Smith, P.J., Giroud, M., Wiggins, H.L., Gower, F., Thorley, J.A., Stolpe, B., Mazzolini, J., Dyson, R.J., Rappoport, J.Z. Cellular entry of nanoparticles via serum-sensitive clathrin-mediated endocytosis, and plasma membrane permeabilization. *Int. J. Nanomedicine*, 2012, 7, 2045-2055.
- Soares, P.I., Ferreira, I.M., Igreja, R.A., Novo, C.M., Borges, J.P. Application of hyperthermia for cancer treatment: recent patents review. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, 2012, 7, 64-73.
- Soares, P.I.P., Sousa, A.I., Ferreira, I.M.M., Novo, C.M.M., Borges, J.P. Towards the development of multifunctional chitosan-based iron oxide nanoparticles: Optimization and modelling of doxorubicin release. *Carbohydr. Polym.*, 2016, 153, 212-221.
- Song, J., Oh, H., Kong, H., Jang, J. Poly-rhodanine modified anodic aluminum oxide membrane for heavy metal ions removal. *J. Hazard. Mater.*, 2011, 187, 311-317.
- Song, W., Gao, B., Xu, X., Xing, L., Han, S., Duan, P., Song, W., Jia, R. Adsorption – desorption behavior of magnetic amine/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> functionalized biopolymer resin towards anionic dyes from wastewater. *Bioresour. Technol.*, 2016, 210, 123-130.
- Sourty, E., Ryan, D.H., Marchessault, R.H. Characterization of magnetic membranes based on bacterial and man-made cellulose. *Cellulose*, 1998, 5, 5-17.
- Spirou, S.V., Basini, M., Lascialfari, A., Sangregorio, C., Innocenti, C. Magnetic hyperthermia and radiation therapy: Radiobiological principles and current practice. *Nanomaterials (Basel)*, 2018, 8, 401.
- Steinhauser, I., Spankuch, B., Strebhardt, K., Langer, K. Trastuzumab-modified nanoparticles: optimisation of preparation and uptake in cancer cells. *Biomaterials*, 2006, 27, 4975-4983.
- Stoner, E.C., Wohlfarth, E.P. A mechanism of magnetic hysteresis in heterogeneous alloys. *Philos. Trans. R. Soc. London*, 1948, 240, 599-642.
- Strayer, D., Rubin, E. Rubin's Pathology Clinicopathologic Foundations of medicine. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, U.S.A., 2012, 1450pp.
- Struss, W.J., Tan, Z., Zachkani, P., Moskalev, I., Jackson, J.K., Shademani, A., D'Costa, N.M., Raven, P.A., Frees, S., Chavez-Munoz, C., Chiao, M., So, A.I. Magnetically-actuated drug delivery device (MADDD) for minimally invasive treatment of prostate cancer: An in vivo animal pilot study. *Prostate*, 2017, 77, 1356-1365.

- Such, G.K., Yan, Y., Johnston, A.P., Gunawan, S.T., Caruso, F. Interfacing materials science and biology for drug carrier design. *Adv. Mater.* 2015, 27, 2278-2297.
- Sun, J.B., Duan, J.H., Dai, S.L., Ren, J., Guo, L., Jiang, W., Li, Y. Preparation and antitumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, 101, 1313-1320.
- Sun, J.B., Tang, T., Duan, J., Xu, P.X., Wang, Z., Zhang, Y., Wu, L., Li, Y. Biocompatibility of bacterial magnetosomes: acute toxicity, immunotoxicity and cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 2010, 4, 271-283.
- Suyama, K., Fukazawa, Y., Umetsu, Y. A new biomaterial, hen egg shell membrane, to eliminate heavy metal ion from their dilute waste solution. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1994, 45-46, 871-879.
- Tanaka, M., Arakaki, A., Matsunaga, T. Identification and functional characterization of liposome tubulation protein from magnetotactic bacteria. *Mol. Microbiol.*, 2010, 76, 480-488.
- Tanaka, M., Mazuyama, E., Arakaki, A., Matsunaga, T. Mms6 protein regulates crystal morphology during nano-sized magnetite biomineralization *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 6386-6392.
- Tang, W., Su, Y., Li, Q., Gao, S., Shanga, J.K. Mg-doping: a facile approach to impart enhanced arsenic adsorption performance and easy magnetic separation capability to alpha-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoadsorbents. *J. Mater. Chem. A*, 2013, 1, 830-836.
- Tangahu, B.V., Sheikh Abdullah, S.R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N. and Mukhlisin, M. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.*, 2011, 2011, 939161.
- Tate, J.A., Petryk, A.A., Giustini, A.J., Hoopes, P.J. *In vivo* biodistribution of iron oxide nanoparticles: an overview. *Proc. S.P.I.E.*, 2011, 7901, 790117.
- Tedja, R., Lim, M., Amal, R., Marquis, C. Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS Nano*, 2012, 6, 4083-4093.
- 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. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.*, 2013, 8, 772-781.
- Thakur, S., Karak, N. One-step approach to prepare magnetic iron oxide/reduced graphene oxide nanohybrid for efficient organic and inorganic pollutants removal. *Mater. Chem. Phys.*, 2014, 144, 425-432.
- Thatai, S., Khurana, P., Boken, J., Prasad, S., Kumara, D. Nanoparticles and core-shell nanocomposite based new generation water remediation materials and analytical techniques: A review. *J. Microchem.*, 2014, 116, 62-76.
- Thekkudan, V.N., Vaidyanathan, V.K., Ponnusamy, S.K., Charles, C., Sundar, S., Vishnu, D., Anbalagan, S., Vaithyanathan, V.K., Subramanian, S. Review on nanoadsorbents: a solution for heavy metal removal from wastewater. *IET Nanobiotechnol.*, 2017, 11, 213-224.

- Theron, J., Walker J.A., Cloete, T.E. Nanotechnology and water treatment: Applications and emerging opportunities. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2008, 34, 43-69.
- Thiele, L., Diederichs, J.E., Reszka, R., Merkle, H.P., Walter, E. Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells. *Biomaterials*, 2003, 24, 1409-1418.
- Thomas-Keprta, K.L., Bazylinski, D.A., Kirschvink, J.L., Clemett, S.J., McKay, D.S., Wentworth, S.J., Vali, H., Gibson, E.K., Jr., Romanek, C.S. Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2000, 64, 4049-4081.
- Thornhill, R.H., Burgess, J.G., Sakaguchi, T., Matsunaga, T. A morphological classification of bacteria containing bullet-shaped magnetic particles. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, 115, 169-176.
- Torchilin, V.P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, 60, 548-558.
- Towe, K.M., Moench, T.T. Electron-optical characterization of bacterial magnetite. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 1981, 52, 213-220.
- Trusolino, L., Bertotti, A., Comoglio, P.M. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, 11, 834-848.
- 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.
- 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. 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.*, 2011, 82, 818-835.
- Uebe R., Schüler D. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016, 14, 621-637.
- Ullrich, S., Kube, M., Schübbe, S., Reinhardt, R., Schüler D. A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth. *J. Bacteriol.*, 2005, 187, 7176-7184.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S.E.P.A.), Washington, DC. Cleaning up the Nation's waste sites: Markets and technology trends, EPA 542-R-04-015, 2004.
- 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.
- Van der Zee, J. Heating the patient: a promising approach? *Ann. Oncol.*, 2002, 13, 1173-1184.

- Vayssières, L., Chanèac, C., Tronc, E., Jolivet, J.P. Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: an example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. *J. Colloid Interface Sci.*, 1998, 205, 205-212.
- Veneranda, M., Aramendia, J., Bellot-Gurlet, L., Colombari, P., Castro, K., Madariaga, J.M. FTIR spectroscopic semi-quantification of iron phases: A new method to evaluate the protection ability index (PAI) of archaeological artefacts corrosion systems. *Corros. Sci.*, 2018, 133, 68-77.
- Verges, M.A., Costo, R., Roca, A.G., Marco, J.F., Goya, G.F., Serna, C.J., Morales, M.P. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain-multidomain limit. *J. Phys. D Appl. Phys.*, 2008, 41, 134003.
- Von Smoluchowski, M. In *Handbuch der Elektrizität und des Magnetismus*. Barth, Leipzig, Germany, 1921.
- Vroman, L., Adams, A.L., Fischer, G.C., Munoz, P.C. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood*, 1980, 55, 156-159.
- Walkey, C.D., Chan, W.C.W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2780-2799.
- Wang, J., Zheng, S., Shao, Y., Liu, J., Xu, Z., Zhu, D. Amino-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> core-shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal. *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, 349, 293-299.
- Wang, X., Guo, Y., Yang, L., Han, M., Zhao, J., Cheng, X. Nanomaterials as sorbents to remove heavy metal ions in wastewater treatment. *J. Environ. Anal. Toxicol.*, 2012, 2, 1-7.
- Wang, F., Yu, L., Monopoli, M.P., Sandin, P., Mahon, E., Salvati, A., Dawson, K.A. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine*, 2013, 9, 1159-1168.
- Wang, T., Jin, X., Chen, Z., Megharaj, M. Simultaneous removal of Pb(II) and Cr(III) by magnetite nanoparticles using various synthesis conditions. *J. Ind. Eng. Chem.*, 2014, 20, 3543-3549.
- Wang, Y., Kohane, D.S. External triggering and triggered targeting strategies for drug delivery. *Nat. Rev. Mater.*, 2017, 2, 17020.
- Wei, M., Gao, Y., Li, X., Serpe, M.J. Stimuli-responsive polymers and their applications. *Polym. Chem.*, 2017, 8, 127-143.
- Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Lee, A.S., Josephson, L., Brady, T.J. Ultrasmall, superparamagnetic iron oxide: An intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR Imaging. *Radiology*, 1990, 175, 494-498.
- Weissleder, R., Moore, A., Mahmood, U., Bhorade, R., Benveniste, H., Chiocca, E.A., and Basilion, J.P. *In vivo* magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat. Med.*, 2000, 6, 351-355.
- Wei-Ting, M., Kumara, S.R., Hsua, C.-T., Shiha, C.-M., Tsaib, S.-W., Yang, C.-C., Liud, Y.-L., Luea, S.J. Magnetic field-assisted alignment of graphene oxide nanosheets in a polymer matrix to enhance ionic conduction. *J. Membrane Sci.*, 2018, 563, 259-269.

- Weitman, S.D., Lark, R.H., Coney, L.R., Fort, D.W., Frasca, V., Zurawski, V.R., Kamen, B.A. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res.*, 1992, 52, 3396-3401.
- Wells, M.A., Abid, A., Kennedy, I.M., Barakat, A.I. Serum proteins prevent aggregation of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and ZnO nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2012, 6, 837-846.
- W.H.O. World cancer report 2014. IARC publications, 2014.
- W.H.O. Progress on sanitation and drinking water. Update and MDG Assessment, 2015.
- W.H.O. Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first addendum, 2017.
- W.H.O. Lead poisoning and health, 2017.
- Wiatrowski, H.A., Das, S., Kukkadapu, R., Ilton, E.S., Barkay, T., Yee, N. Reduction of Hg(II) to Hg(0) by magnetite. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 2009, 5307-5313.
- Widder, K.J., Senyei, A.E., Scarpelli, D.G. Magnetic microspheres: A model system for site specific drug delivery *in vivo*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1978, 158, 141-146.
- Widder, K.J., Marino, P.A., Morris, R.M., Howard, D.P., Poore, G.A., Senyei, A.E. Selective targeting of magnetic albumin microspheres to the Yoshida sarcoma: ultrastructural evaluation of microsphere disposition. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1983, 19, 141-147.
- Wilbur, K.M., Bernhardt, A.M. Effects of amino acids, magnesium and molluscan extrapallial fluid on crystallization of calcium carbonate: *In vitro* experiments. *Biol. Bull.*, 1984, 166, 251-259.
- Williams, T.J., Zhang, C.L., Scott, J.H., Bazylinski, D.A. Evidence for autotrophy via the reverse tricarboxylic acid cycle in the marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 1322-1329.
- Williams, P.S., Carpino, F., Zborowski, M. Magnetic nanoparticle drug carriers and their study by quadrupole magnetic field-flow fractionation. *Mol. Pharm.*, 2009, 6, 1290-1306.
- Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 2882-2886.
- Wong, M., Hendrix, M.J., von der Mark, K., Little, C., Stern, R. Collagen in the egg shell membranes of the hen. *Dev. Biol.*, 1984, 104, 28-36.
- Wu, S., Zhao, X., Li, Y., Du, Q., Sun, J., Wang, Y., Wang, X., Xia, Y., Wang, Z., Xia, L. Adsorption properties of doxorubicin hydrochloride onto graphene oxide: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Materials*, 2013, 6, 2026-2042.
- Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R., Schlag, P.M. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.*, 2002, 3, 487-497.
- Xu, M., Zhang, Y., Zhang, Z., Shen, Y., Zhao, M., Pan, G. Study on the adsorption of Ca<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> by magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> yeast treated with EDTA dianhydride. *Chem. Eng. J.*, 168, 2011, 737-745.

- Xu, P., Zeng, G.M., Huang, D.L., Feng, C.L., Hu, S., Zhao, M.H., Lai, C., Wei, Z., Huang, C., Xie, G.X. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. *Sci. Total Environ.*, 2012, 424, 1-10.
- Xu, F., Reiser, M., Yu, X., Gummuluru, S., Wetzler, L., Reinhard, B.M. Lipid-mediated targeting with membrane-wrapped nanoparticles in the presence of corona formation. *ACS Nano*, 2016, 10, 1189-1200.
- Yallapu, M.M., Chauhan, N., Othman, S.F., Khalilzad-Sharghi, V., Ebeling, M.C., Khan S., Jaggi, M., Chauhan, S.C. Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 2015, 46, 1-12.
- Yamagishi, A., Narumiya, K., Tanaka, M., Matsunaga, T., Arakaki, A. Core amino acid residues in the morphology-regulating protein, Mms6, for intracellular magnetite biomineralization. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 35670.
- Yang, W., Li, R., Peng, T., Zhang, Y., Jiang, W., Li, Y., Li, J. mamO and mamE genes are essential for magnetosome crystal biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Res. Microbiol.*, 2010, 161, 701-705.
- Yan, L., Zhang, S., Chen, P., Wang, W., Wang, Y., Li, H. Magnetic properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Mater. Sci. Eng. C*, 2013a, 33, 4026-4031.
- Yang, S.T., Liu, Y., Wang, Y.W., Cao, A. Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein-nanoparticle interactions. *Small*, 2013b, 9, 1635-1653.
- Yan, L., Zhang, S., Liu, H., Wang, W., Chen, P., Li, H. Optimization of magnetosome production by *Acidithiobacillus ferrooxidans* using desirability function approach. *Mater. Sci. Eng. C*, 2016, 59, 731-739.
- Ye, H., Shen, Z., Yu, L., Wei, M., Li, Y. Manipulating nanoparticle transport within blood flow through external forces: an exemplar of mechanics in nanomedicine. *Proc. Math. Phys. Eng. Sci.*, 2018, 474, 20170845.
- Yermolenko, I.S., Fuhrmann, A., Magonov, S.N., Lishko, V.K., Oshkadyerov, S.P., Ros, R., Ugarova, T.P. Origin of the nonadhesive properties of fibrinogen matrices probed by force spectroscopy. *Langmuir*, 2010, 26, 17269-17277.
- Yermolenko, I.S., Gorkun, O.V., Fuhrmann, A., Podolnikova, N.P., Lishko, V.K., Oshkadyerov, S.P., Lord, S.T., Ros, R., Ugarova, T.P. The assembly of nonadhesive fibrinogen matrices depends on the  $\alpha$ C regions of the fibrinogen molecule. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287, 41979-41990.
- Yu, M.K., Park, J., Jon, S. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics*, 2012, 2, 3-44.
- Yu, X., Hu, F., Yao, Q., Li, C., Zhang, H., Xue, Y. Serum fibrinogen levels are positively correlated with advanced tumor stage and poor survival in patients with gastric cancer undergoing gastrectomy: a large cohort retrospective study. *BMC Cancer*, 2016, 16, 480.
- Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K., Fredrickson, J.K., Gorby, Y.A., Smith, S.C. Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB). *Geomicrobiol. J.*, 2002, 19, 179-207.

- Zaloga, J., Janko, C., Nowak, J., Matuszak, J., Knaup, S., Eberbeck, D., Tietze, R., Unterweger, H., Friedrich, R.P., Duerr, S., Heimke-Brinck, R., Baum, E., Cicha, I., Dörje, F., Odenbach, S., Lyer, S., Lee, G., Alexiou, C. Development of a lauric acid/albumin hybrid iron oxide nanoparticle system with improved biocompatibility. *Int. J. Nanomedicine*, 2014, 9, 4847-4866.
- Zauner, W., Farrow, N.A., Haines, A.M.R. *In vitro* uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J. Control Release*, 2001, 71, 39-51.
- Zeytuni, N., Ozyamak, E., Ben-Harush, K., Davidov, G., Levin, M., Gat, Y., Moyal, T., Brik, A., Komeili, A., Zarivach, R. Self-recognition mechanism of MamA, a magnetosome-associated TPR-containing protein, promotes complex assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108, E480-E487.
- Zhang, W.X. Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview. *J. Nanopart. Res.*, 2003, 5, 323-332.
- Zhang, J.Q., Zhang, Z.R., Yang, H., Tan, Q.Y., Qin, S.R., Qiu, X.L. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pharm. Res.*, 2005, 22, 573-583.
- Zhang, X., Long, Q. Elevated serum plasma fibrinogen is associated with advanced tumor stage and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96, e6694.
- Zhao, K., Zhao, X., Tu, Y., Miao, Q., Cao, D., Duan, W., Sun, Y., Wang, J., Wei, T., Yang, F. Lysosomal chymotrypsin B potentiates apoptosis via cleavage of Bid. *Cell Mol. Life Sci.*, 2010, 67, 2665-2678.
- Zhao, Q., Wang, L., Cheng, R., Mao, L., Arnold, R.D., Howerth, E.W., Chen, Z.G., Platt, S. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for head & neck cancer in mouse models. *Theranostics*, 2012, 2, 113-121.
- Zhu, J., Sun, Z., Li, J.J., Zhao, J.W. Bovine serum albumins (BSA) induced aggregation and separation of gold colloid nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2012, 12, 2206-2211.