

# Partículas superparamagnéticas ultrapequeñas de óxido de hierro para aplicaciones biomédicas

*Ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles  
for biomedical applications*

ARIAS JL\*, LÓPEZ-VIOTA M, RUIZ MA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Granada, 18071 Granada (Granada). España.

\*Author to whom correspondence should be addressed: Tfno.: +34-958-243902. e-mail: jlarias@ugr.es

## RESUMEN

Las partículas superparamagnéticas ultrapequeñas de óxido de hierro (USPIO) tienen una enorme utilidad en Biomedicina como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen o como sistemas transportadores de fármacos, entre otras aplicaciones. La naturaleza del recubrimiento de los núcleos inorgánicos de las partículas USPIO determina su estabilidad *in vitro* y su comportamiento *in vivo*, siendo especialmente importantes sus propiedades fisicoquímicas, en concreto el tamaño, la carga superficial y la densidad del recubrimiento. Las pequeñas dimensiones de las partículas USPIO hace difícil una caracterización fisicoquímica completa, la cuál es de suma importancia para poder mejorar su estabilidad y comportamiento *in vivo*. Esta revisión se centra en las técnicas instrumentales utilizadas en el análisis de los núcleos magnéticos y de sus recubrimientos orgánicos.

PALABRAS CLAVE: Aplicaciones Biomédicas. Agentes de Contraste. Caracterización Fisicoquímica. Óxidos de Hierro. Sistemas Transportadores de Fármacos. Vehículos de Fármacos. USPIO.

## ABSTRACT

*Ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles are iron oxide nanoparticles currently used for Biomedical applications: contrast agents in magnetic resonance imaging, drug delivery systems, etc. The coatings surrounding the USPIO inorganic core may control the *in vitro* stability and the *in vivo* fate. Different physicochemical properties such as the final size, the surface charge and the density of coverage are key factors in this respect. A complete physicochemical characterization of USPIOs particles is difficult due to their small dimensions. However, such a characterization is necessary to improve the stability of the particles and their *in vivo* behaviour. This review is focused on the techniques which can be applied to have a better insight in the magnetic core structure of these particles and their organic surface.*

KEY WORDS: Biomedical Applications. Contrast Agents. Drug Carriers. Drug Delivery Systems. Iron Oxides. Physicochemical Characterization. USPIO.

Fecha de recepción: ???

Fecha aceptación: ????

## INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas superparamagnéticas se caracterizan por su paramagnetismo y su gran susceptibilidad magnética, con una magnetización que carece de histéresis, lo que las hace ideales para aplicaciones biomédicas<sup>1</sup>. Están constituidas por un núcleo de óxido de hierro (magnetita, maghemita u otras ferritas insolubles) con un gran momento magnético en presencia de un campo magnético externo, y por un recubrimiento de origen polimérico u orgánico. En función de su tamaño, pueden clasificarse en dos grandes grupos<sup>1,2</sup>:

- a) Óxidos de hierro superparamagnéticos (SPIOs). Presentan un tamaño hidrodinámico de partícula de más de 50 nm. Es característica su captación específica por el sistema fagocítico mononuclear (SFM). Sus dianas clínicas en resonancia magnética de imagen son los tumores de hígado y las metástasis (Endorem<sup>®</sup> y Resovist<sup>®</sup>)<sup>3</sup>.
- b) Óxidos de hierro superparamagnéticos ultrapequeños (USPIO)<sup>4</sup>. Su tamaño hidrodinámico de partícula es inferior a 50 nm. De forma general, están constituidas por un núcleo de óxido de hierro con un tamaño cristalino inferior a 10 nm. Su recubrimiento controla la estabilidad *in vitro* y el comportamiento *in vivo*<sup>1</sup>. Debido a su pequeño tamaño y a su recubrimiento hidrófilo, estas partículas evitan la captación inicial por el SFM a nivel de hígado y bazo. De esta manera, presentan una extensa circulación sistémica, tras su administración intravenosa, lo que justifica su uso como agentes de contraste o como sistemas transportadores de fármacos<sup>5</sup>. Con respecto su síntesis, si bien existen numerosas posibilidades, el método más utilizado es el de coprecipitación alcalina de iones férricos y ferrosos en solución acuosa<sup>6-8</sup>. Sin embargo, aún es precisa una mayor reducción de la polidispersión en el tamaño de partícula, con el objetivo de poder ampliar el número de aplicaciones clínicas.

En esta revisión nos centraremos en el estudio de la composición de las partículas USPIO y analizaremos las diferentes técnicas utilizadas en

## INTRODUCTION

Superparamagnetic nanoparticles, currently used for biomedical applications, display paramagnetism and large magnetic susceptibility. Furthermore, the magnetization of superparamagnetic nanoparticles follows an external magnetic field without any hysteresis<sup>1</sup>. These nanoparticles consist of a coated iron oxide core (magnetite, maghemite or other insoluble ferrites) characterized by a large magnetic moment in the presence of a static external magnetic field. They are classified in two main groups according to their size<sup>1,2</sup>:

- a) SPIOs (superparamagnetic iron oxides), whose nanoparticles have a hydrodynamic size greater than 50 nm. These nanoparticles have in common their specific uptake by the mononuclear phagocyte system (MPS). Their clinical targets are liver tumor and metastasis (Endorem<sup>®</sup> and Resovist<sup>®</sup>)<sup>3</sup>.
- b) USPIOs (ultrasmall superparamagnetic iron oxides)<sup>4</sup> are nanoparticles smaller than 50 nm. USPIOs are composed of an iron oxide core with a crystal size measuring generally less than 10 nm. The coatings surrounding the USPIO inorganic core control the *in vitro* stability and the *in vivo* fate<sup>1</sup>. Due to their small final size and their hydrophilic coating, USPIOs are generally able to avoid the early and massive uptake by the MPS (especially spleen and liver macrophages). This confers to them long circulating properties in the bloodstream after intravenous administration<sup>5</sup>. These are properties of interest for the use as contrast agents or as drug delivery systems. With regard to the synthesis of magnetic nanoparticles, numerous methods have been reported, but the synthesis most commonly used involves an alkaline coprecipitation of ferrous and ferric ions in aqueous solution<sup>6-8</sup>. However, in terms of chemical synthesis, it is still challenging to obtain magnetic particles with a narrow monodisperse population for large scale clinical uses.

Hence, this paper will focus on the composition of USPIOs and will also detail the available techniques which can be applied to have a better insight in their magnetic core structure and their organic surface.

el estudio de la estructura del núcleo magnético y del recubrimiento.

## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURAL

La técnica más utilizada en la determinación de las características morfológicas y la distribución de tamaños de las partículas USPIO es la microscopía electrónica de transmisión (TEM). La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) permite, además, resolver la distribución atómica a nivel nanométrico, y se utiliza en la determinación de las microestructuras interfaciales de las nanopartículas<sup>9</sup> y en la caracterización cristalográfica<sup>10,11</sup>. Sin embargo, las partículas USPIO son nanosistemas poco ordenados, ni cristalinos, ni amorfos, y la caracterización de su núcleo precisa la combinación de varias técnicas analíticas<sup>12</sup>.

La técnica instrumental más empleada en la caracterización de la estructura de este tipo de partículas es la difracción de rayos X. Además, el análisis térmico y la espectroscopia de IR y de Mossbauer, aportan información adicional muy útil para este fin. La mayoría de estas técnicas precisan del secado de las muestra, lo que puede inducir, p. ej., fenómenos de agregación irreversible entre partículas. Esto puede evitarse mediante la utilización de rayos X de ángulo pequeño y scattering de neutrones, o la difracción de rayos X por energía dispersiva (EDXD)<sup>12-14</sup>.

Las dificultades que nos encontramos en la caracterización de las partículas USPIO, provocan que no se obtengan datos coherentes mediante las diversas técnicas utilizadas. Por ejemplo, el diámetro magnético es generalmente más pequeño que el obtenido por TEM. A pesar de que pueden señalarse diversas razones para justificar esta discrepancia, como las interacciones entre partículas que provocan una desviación de la función de Langevin, lo más probable es que se deba al desorden estructural propio de partículas tan pequeñas<sup>15-16</sup>.

En cuanto a las propiedades magnéticas, quedan definidas por el tamaño, la superficie y la estructura cristalina de las partículas. Se ha observado que materiales con un tamaño de partícula similar sintetizados siguiendo diferentes técnicas presentan propiedades magnéticas diferentes. Esto puede explicarse si tenemos en cuenta que

## MORPHOLOGY AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION

The morphological characteristics and size distribution of nanoparticles samples are generally observed by TEM. Since high resolution transmission electron microscopy (HRTEM) has the ability to resolve the atomic arrangement in nano size area, it has been employed to investigate interfacial local microstructures<sup>9</sup> and to describe the crystallographic properties<sup>10,11</sup>. The USPIO particles are nanosystems that may be considered to be a less-ordered systems which are neither crystalline nor amorphous and a combination of various analysis techniques are needed in the core characterization<sup>12</sup>.

The most important methodology for nanoparticles structure characterization is the X-ray diffraction using both conventional and synchrotron radiation sources. Thermal analysis, Mossbauer and Infra Red spectroscopy provide additional useful information. Most of these techniques need the drying of the samples and induce the occurrence of irreversible particles aggregation for example. This is avoided by small angle X-ray and neutron scattering, and Energy Dispersive X-ray Diffraction (EDXD)<sup>12-14</sup>.

The above cited difficulty in determining the real nature of nanoparticles, crystal or amorphous phase is reflected in a series of discordant data when various methodologies are used. For example, the magnetic diameter is generally smaller than the diameter obtained by TEM. Despite the fact that several reasons could be outlined to justify this discrepancy, as the presence of particle interactions that can bring deviation from the Langevin function, a structural disorder contribution seems to be more likely, especially for the smallest particles<sup>15,16</sup>.

With respect to the magnetic properties, they are defined by the finite-size, the surface effects and the crystal structure of the particles. Different magnetic properties have been observed in materials with similar nominal grain-size but produced by different synthetic routes. A possible explanation is that various syntheses may lead to particles with different structural coherence in the whole particle volume, which induces a three-dimensional lattice distortion due to the defects and finite size resulting in different magnetization values<sup>12</sup>.

los diferentes tipos de síntesis permiten obtener partículas con una coherencia estructural diferente, lo que supone una alteración del entramado tridimensional ya que los defectos estructurales y el tamaño finito dan lugar a diferentes valores de magnetización<sup>12</sup>.

### FUNCIONALIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE LOS ÓXIDOS METÁLICOS

Para que un ferrofluido pueda ser utilizado con fines biomédicos, es preciso que la suspensión formulada sea estable. Para evitar su desestabilización por la formación de agregados, consecuencia de las fuerzas de atracción entre las nanopartículas magnéticas (principalmente de tipo van der Waals), los núcleos de óxido de hierro deberán poseer un recubrimiento superficial adecuado (ligandos o polímeros biocompatibles). Tras la administración intravenosa, las partículas que presentan una superficie hidrófoba son recubiertas rápidamente por los componentes plasmáticos, especialmente proteínas (proceso de opsonización), y son rápidamente retiradas de la circulación por el SFM. Sin embargo, las partículas cuya superficie es hidrófila pueden retardar el proceso de opsonización, por lo que su aclaramiento plasmático es mucho más lento<sup>17,18</sup>. Algunos ejemplos de partículas USPIO diseñadas con este fin son Ferumoxtran-10 y Feruglose (Clariscan®)<sup>1,19</sup>.

La naturaleza del recubrimiento puede ser muy diversa, por lo que debe investigarse y elegirse el apropiado teniendo en cuenta los objetivos clínicos. Los recubrimientos más utilizados en la obtención de suspensiones de óxido de hierro biocompatibles son los polímeros, como los derivados del dextrano o el polietilenglicol, aunque también el almidón, el arabinogalactano, el glicosaminoglicano, el siloxano orgánico o el divinilbenceno estireno sulfonatado<sup>1,20</sup>.

En el caso del recubrimiento con dextrano, se sugiere que el principal mecanismo de adsorción es la formación de múltiples enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la molécula de dextrano y la superficie de las partículas de óxido de hierro<sup>21</sup>. Si bien, también se apunta la formación de enlaces estabilizadores de tipo carboxílico, mediante oxidación y eliminación parcial de agua. Estas partículas recubiertas de

### FUNCTIONALIZATION OF METAL OXIDE SURFACES

The medical applications of ferrofluids require stable formulated suspensions. In the absence of an efficient surface coating (biocompatible ligands or polymers), the formation of agglomerates and aggregates result from the attraction forces between the magnetic nanoparticles (mainly van der Waals) which can destabilize the suspension. After their intravenous administration, particles with hydrophobic surfaces are efficiently covered with plasma components especially proteins (opsonisation) and are rapidly removed from the circulation by the reticulum endothelial system (RES), whereas particles that display hydrophilic surfaces can resist to the opsonisation process, being cleared more slowly from the blood compartment<sup>17,18</sup>. Ferumoxtran-10 y Feruglose (Clariscan®) are USPIO particles designed with that aim<sup>1,19</sup>.

Different types of coating can be investigated and the choice of the appropriate one depends on many factors and principally on the clinical purposes of the functionalized particle. The most common coatings for biocompatible iron oxide suspensions are polymers such as derivatives of dextran or polyethyleneglycol but also starch, arabinogalactan, glycosaminoglycan, organic siloxane, sulphonated styrene-divinylbenzene<sup>1,20</sup>.

In the case of the use of dextran as a biocompatible coating, it was observed that carboxylate bonds between dextran and iron oxide surface could form by oxidation and partial water elimination, a chemical process that probably reinforce the stability of the coating<sup>21</sup>. However, the suggested dominant mechanism was the formation of collective hydrogen bonding between dextran hydroxyl groups and iron oxide particle surface. Noteworthy, these dextran-coated iron oxide particles do not show any long-term toxicity<sup>4,22</sup>.

In order to obtain a strong adsorption of dextran to maghemite, Mornet et al (2005) have developed an original synthetic route consisting of colloidal maghemite synthesis, surface modification by silanation of the iron core with aminopropylsilane groups and covalent conjugation with partially oxidized dextran and subsequent reduction of the Schiff base<sup>23</sup>. The Si-O-Fe bond is commonly described as covalent even<sup>24</sup>. Silanes are an example of an interesting approach to design functional metal surfaces by self-assembled monolayers.



dextrano, no poseen toxicidad alguna a largo plazo<sup>4,22</sup>.

Con el objetivo de lograr una mayor adsorción de dextrano a la maghemita, Mornet y cols (2005) propusieron una ruta sintética original, consistente en la síntesis de maghemita coloidal, la modificación de su superficie mediante silanación con grupos aminopropilsilano y la conjugación covalente con dextrano parcialmente oxidado, y la posterior reducción de la base de Schiff<sup>23</sup>. Se acepta que la naturaleza de la unión Si-O-Fe es covalente<sup>24</sup>. Los silanos constituyen una interesante aproximación al diseño de superficies metálicas funcionalizadas mediante monocapas autoensambladas. Estos sistemas están constituidos por uniones moleculares ordenadas formadas mediante la adsorción de una molécula activa (siloxano, carboxilatos, tiolatos, fosfatos, etc.) con grupos funcionales de diferente naturaleza (OH, COOH, o NH) en una superficie sólida (como un óxido de hierro)<sup>25</sup>. Su estabilidad depende básicamente de la afinidad de la molécula activa por su sustrato, del pH y de la fuerza iónica del medio<sup>26</sup>.

Los ácidos carboxílicos pueden ser adsorbidos por muchos tipos de óxidos metálicos, pero esta interacción tiene un carácter débil. Sin embargo, los ácidos grasos son una excepción ya que forman una monocapa densa en la superficie de las partículas metálicas. Por este motivo, son muy utilizados en la síntesis de nanocristales de óxidos metálicos<sup>27</sup>.

Los grupos reactivos tipo fosfato y fosfonato forman también monocapas en los óxidos de hierro, constituyendo una interesante alternativa a los ácidos grasos<sup>28-30</sup>. Además, su preparación es bastante sencilla y presentan una biocompatibilidad aceptable<sup>31</sup>. Debido a esto, hay un gran interés en la obtención y utilización, con estos fines, de monocapas de ácido fosfónico o de ácido alquilfosfónico de cadena larga. La adsorción de estas especies químicas en la superficie de las partículas magnéticas se estudia mediante diversas técnicas analíticas: espectroscopia de IR, <sup>31</sup>P-RMN, microscopia de fuerza atómica o química (AFM o CFM), espectroscopia fotoelectrónica de rayos X, electroforesis y técnicas de ángulo de contacto<sup>32-36</sup>.

La naturaleza y magnitud de las interacciones con la superficie de las partículas, puede tener también su repercusión sobre las propiedades magnéticas de las partículas USPIO<sup>37</sup>. De hecho, se sabe que la química superficial de las partícu-

Such systems are ordered molecular assemblies formed by the adsorption of an active molecule (siloxane, carboxylates, thiolates, phosphate etc) on a solid surface (as iron oxide) with different terminal groups (OH, COOH or NH)<sup>25</sup>. Their stability depends basically on the affinity of the active molecule for the substrate (solid surface), pH and ionic strength of the environment<sup>26</sup>.

Carboxylic acids may be adsorbed on many metal oxides but their interactions are weak, except for long-chain fatty acids which form a dense monolayer and are widely used in metal oxide nanocrystal syntheses<sup>27</sup>.

The reactive groups phosphate and phosphonate were used to form monolayers on iron oxide and can serve as potential alternatives to fatty acids<sup>28-30</sup>. Moreover, functionalized phosphonate and phosphate seems to have an acceptable biocompatibility<sup>31</sup>. As a result, there has been an increasing interest in monolayers of long-chain phosphonic acids or alkylphosphoric acids, which preparation is quite easy. The adsorption interactions of all these substances on the surface of the magnetic particles can be analyzed by infrared spectroscopy (IR), solid state <sup>31</sup>P-NMR, atomic and chemical force microscopy (AFM and CFM), X ray photoelectron spectroscopy, electrophoresis and contact angle techniques<sup>32-36</sup>.

The type and magnitude of the interactions with the particles surface can also affect the magnetic properties of the USPIOs<sup>37</sup>. In fact it is known that the surface chemistry of the USPIO particles is responsible for their magnetic properties because of the exceedingly high ratio of atoms at the surface to those within the particle. For example, phosphonate coatings result in magnetization values of the iron oxide one order of magnitude lower than those obtained by coating with carboxylic acid or alcohol.

## PROPERTIES OF THE NANOPARTICLES IN SOLUTION

When USPIO are dispersed in an aqueous medium, the electric double layer surrounds the particle carrying surface charge<sup>38</sup>. The existence of the shear layer has great influence on the stability of the colloidal systems and, specifically, the hydrodynamic motion of the suspended particles. The discrepancy between the hydrodynamic size and the solid dimension of the particles poses a

las USPIO es la responsable de sus propiedades magnéticas, debido a la gran proporción de átomos a nivel superficial con respecto a los localizados en el interior de la partícula. Por ejemplo, el recubrimiento con fosfonato provoca que los valores de magnetización de las partículas de óxido de hierro sean un orden de magnitud menor que el obtenido con el recubrimiento por un alcohol o un ácido carboxílico.

## PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS EN DISOLUCIÓN

Cuando dispersamos las partículas USPIO en un medio acuoso, una doble capa eléctrica rodea a las partículas confiriéndoles una carga superficial<sup>38</sup>. La existencia de la capa de cizalladura tiene una tremenda influencia en la estabilidad de los sistemas coloidales y, concretamente, en el movimiento hidrodinámico de las partículas en suspensión. La discrepancia entre el tamaño hidrodinámico y el tamaño sólido de las partículas pone en entredicho la fiabilidad de aplicar sólo una técnica, p. ej., el scattering de luz dinámica, muy utilizado en los estudios de estabilidad<sup>39</sup>. Este efecto es particularmente significativo en el caso de las partículas USPIO, porque existe una gran diferencia entre su tamaño cristalino y su tamaño hidrodinámico. En definitiva, la cuestión se centra en cómo la localización del plano de la doble capa puede relacionarse con la determinación del potencial zeta y del diámetro hidrodinámico.

### 1. Potencial zeta ( $\zeta$ ).

El potencial zeta desempeña un papel crucial en la caracterización electrocinética de las interfases sólido-líquido. El potencial zeta es función de la densidad de carga superficial, de la localización del plano de cizalladura y de la estructura superficial, y es un parámetro muy importante en los sistemas dispersos. No puede medirse directamente, aunque pueda ser calculado a partir de técnicas experimentales (electroforesis y determinaciones de la conductividad eléctrica, principalmente) con la ayuda de aproximaciones teóricas<sup>40</sup>. Hay un método alternativo para su medida, basado en los ultrasonidos (electroacústica),

challenge regarding the reliability of applying only one technique as dynamic light scattering which is commonly used for stability studies<sup>39</sup>. This effect is particularly relevant for USPIOs because there is a great difference between their crystal and their hydrodynamic size. Finally the question remains how the double layer plane location is related to the determination of both hydrodynamic diameter and zeta potential.

### 1. Zeta potential ( $\zeta$ ).

Zeta-potential plays an important role in the electrokinetic characterization of solid-liquid interfaces. The zeta potential is a function of surface charge density, shear plane location, and surface structure and it is a very important parameter with respect to many features of the dispersed materials.  $\zeta$ -potential cannot be measured directly, but it has to be calculated from experimental techniques (mainly, electrophoresis and electric conductivity determinations) with the help of theoretical approaches<sup>40</sup>. There is a new alternative method based on ultrasound which is rapidly becoming important (electroacoustics). The ultrasound method has a large advantage over traditional light based techniques because it is able to characterize concentrated systems without dilution<sup>41</sup>. The  $\zeta$ -potentials values obtained with different methodologies are hardly to be compared and the standardisation of these measures is far to be achieved.

Commonly used expressions to convert the electrokinetic mobility into  $\zeta$ -potential derive from approximations of the Henry Equation. The first case is represented by the most commonly used Smoluchowski equation and the second case is represented by the Hückel equation. Both give appropriate zeta potentials only for rigid spheres at quite low mobility values. Despite it is possible to obtain more accurate numerical solutions for rigid spheres by the O'Brien and White theory the algorithm used are quite complicated<sup>42</sup>. To take into account the influence of the coating on the zeta potential values, a soft particle model has been proposed by combining the theory of rigid spherical colloids with the theory of completely permeable polyelectrolytes or polymers<sup>43</sup>.

The reliability of the zeta potential data depends upon the applicability of this equation to the system under investigation. None of

que presenta importantes ventajas respecto a las técnicas anteriores, ya que permite la caracterización de sistemas concentrados, sin necesidad de diluirlos<sup>41</sup>. Sin embargo, no es posible comparar los valores de potencial zeta obtenidos utilizando diferentes técnicas instrumentales. Además, la estandarización de estas medidas está lejos de alcanzarse.

Las expresiones más utilizadas para transformar los valores de movilidad electroforética en valores de potencial zeta, provienen principalmente de dos aproximaciones de la ecuación de Henry. La primera de ellas está definida por la ecuación de Smoluchowski y la segunda por la ecuación de Hückel. Ambas aproximaciones permiten la obtención de potenciales zeta sólo para esferas rígidas y valores bajos de movilidad. Si bien es posible obtener soluciones numéricas más exactas para esferas rígidas mediante la teoría de O'Brien y White, el algoritmo que se utiliza es muy complejo<sup>42</sup>. Para tener en cuenta la influencia del recubrimiento en los valores de potencial zeta, se ha propuesto un modelo de partícula no rígida, combinando la teoría de coloides esféricos rígidos y la teoría de polímeros o polielectrolitos completamente permeables<sup>43</sup>.

La fiabilidad de los datos de potencial zeta depende de la aplicabilidad de la ecuación de Henry al sistema en estudio. Ninguna de las anteriores teorías se ajusta perfectamente a las partículas USPIO (partículas recubiertas muy pequeñas con una doble capa eléctrica de grosor importante, con cargas superficiales muy negativas) y pueden surgir artefactos que distorsionen las medidas de potencial zeta<sup>44</sup>.

## 2. Estabilidad

La estabilidad de las nanopartículas de óxido de hierro en suspensiones acuosas es uno de los aspectos clave para su aplicación farmacéutica. De acuerdo con la teoría DLVO extendida<sup>45,46</sup> y en ausencia de un campo magnético externo<sup>47</sup>, la estabilidad de un coloide magnético depende fundamentalmente del balance entre las fuerzas atractivas (interacciones dipolo-dipolo de van der Waals) y las fuerzas repulsivas (interacciones estéricas o electrostáticas), que actúan sobre la partícula. A este balance se le llama comúnmente potencial de interacción total (o barrera de energía) entre las partículas coloidales<sup>48</sup>. El valor del

the preceding theories fits with USPIOs (very small particles with an important double layer thickness, strongly negative charges and coated) and artefacts can result from the zeta potential measurements<sup>44</sup>.

## 2. Stability

Colloidal stability of iron oxide nanoparticles in aqueous suspensions is one of the key points for pharmaceutical application. According to the extended DLVO theory<sup>45,46</sup> and in the absence of an external applied magnetic field<sup>47</sup>, the stability of the magnetic colloid principally depends on the balance between attractive (dipole-dipole van der Waals interactions) and repulsive forces (steric and electrostatic interactions) acting between the particles. This balance is commonly named total interaction potential (or energy barrier) between colloidal particles<sup>48</sup>. The total interaction potential value depends, among others, on the surface electric potential of the particles, the electrolyte concentration in the medium, the valence of the counterions, the particle size and the Hamaker constant. Since the electrostatic interaction energy is sensitive to the electrolyte concentration while attractive forces depend just on the particle nature, the stability of colloidal dispersions can be monitored by changing the ionic strength of the solution. In the absence of a sufficient steric stabilization of the particles, an increase in the electrolyte concentration causes a significantly decrease of the thickness of the double layer and consequently of the total interaction potential. Thus, an electrolyte concentration (the critical coagulation concentration, c.c.c.) exists, at which the energy barrier vanishes because the repulsion forces are completely cancelled. Then, the colloidal dispersion becomes unstable above the c.c.c.<sup>48</sup>.

Steric stabilization is a very useful method which provides strong stabilization even at high salt conditions and in a wide range of pH. In this situation, the suspension is then found to be stable despite zeta potential values close to zero<sup>49</sup>.

The efficient coating of magnetic particles by a large variety of agents may provide enhanced stability by combining electrostatic and steric stabilization<sup>50</sup>. A widely used experimental technique to investigate the colloidal stability of the particles is based on the study of the time

potencial de interacción total depende, entre otros factores, del potencial eléctrico superficial de las partículas, de la concentración de electrolito en el medio, del balance de contraiones, del tamaño de partícula y de la constante de Hamaker. Como la energía electrostática de interacción es sensible a la concentración de electrolito, la estabilidad de las dispersiones coloidales puede monitorizarse modificando la fuerza iónica de la disolución. En ausencia de una adecuada estabilización estérica de las partículas, un aumento en la concentración de electrolito provocará una reducción significativa del grosor de la doble capa y, consecuentemente, del potencial de interacción total. Además, para una determinada concentración de electrolito, llamada concentración crítica de coagulación (c.c.c.), el potencial de interacción total desaparece, debido a la completa anulación de las fuerzas de repulsión. Por lo tanto, por debajo de la c.c.c., el sistema disperso coloidal se vuelve inestable<sup>48</sup>.

La estabilización estérica es un método muy útil de estabilización, incluso a altas concentraciones de electrolito y en una amplia gama de pHs. Bajo estas condiciones la suspensión será estable a pesar de que los valores de potencial zeta se encuentren próximos a cero<sup>49</sup>. El recubrimiento eficaz de las partículas magnéticas puede generar un incremento de su estabilidad mediante la combinación de una estabilización electrostática y estérica<sup>50</sup>. Una técnica experimental ampliamente utilizada en la investigación de la estabilidad coloidal de las partículas, se basa en el estudio del tiempo de evolución del tamaño de partícula hidrodinámico mediante scattering dinámico de luz (DLS) en función de la fuerza iónica<sup>51,52</sup>. Asimismo, pueden utilizarse métodos turbimétricos que miden las cinéticas de agregación para investigar la estabilidad coloidal de un sistema en función de la fuerza iónica<sup>50,53</sup>.

### CONCLUSIONES

A pesar de que las partículas USPIO se utilizan para fines biomédicos, sus propiedades fisicoquímicas siguen sin estar suficientemente clarificadas. Debe estudiarse mucho más la influencia de la capa de recubrimiento en las propiedades estructurales y magnéticas de las partículas, así como la interacción entre la molécula adsorbida y la partícula de óxido de hierro. Es muy raro

evolution of the hydrodynamic particle size by Dynamic light scattering (DLS) as a function of the ionic strength<sup>51,52</sup>. It is also possible to investigate colloidal stability as a function of the ionic strength by measuring the aggregation kinetics via turbidity measurements<sup>50,53</sup>.

### CONCLUSIONS

Although USPIOs are commonly considered for biomedical purposes, their physicochemical properties still remain insufficiently understood. The influence of the coating layer on their structural and magnetic properties deserves further clarification whereas the nature of the grafting is still sometimes under debate. Systematic studies, reporting the influence of polymer modifications and concentration on particle size, coating efficiency, and on USPIOs stability are quite rare whereas zeta potential measurements are far to be standardized. For these reasons there is an urgent need to perform further investigations on the physicochemical characterization of USPIOs.



encontrar estudios que analicen en profundidad la influencia del tipo de polímero y su concentración en el tamaño de partícula, la eficacia del recubrimiento y la estabilidad de las partículas USPIO. De igual forma, la determinación del potencial zeta aún no está estandarizada. Por estas razones, deben realizarse más investigaciones para caracterizar las partículas USPIO. Estos estudios serán muy útiles en el diseño de modelos racionales que permitan mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las partículas USPIO.

### BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1471–1504.
2. Roch A, Gossuin Y, Muller RN, Gillis P. Superparamagnetic colloid suspensions: Water magnetic relaxation and clustering. *J Magn Magn Mater* 2005; 293: 532-539.
3. Reimer P, Tombach B. Hepatic MRI with SPIO, detection and characterization of focal liver lesions. *Eur Radiol* 1998; 8(7): 1198-1204.
4. Clément O, Siauve N, Cuénod CA, Fria G. Liver imaging with ferumoxides (feridex): fundamentals, controversies and practical aspects. *Topics in Magnetic Reson Imaging* 1998; 9(3): 167-182.
5. Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol* 2004; 39(1): 56-63.
6. Tartaj P, Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T, Serna CJ. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys* 2003; 36: R182–R197.
7. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Bio-materials* 2005; 26: 3995-4021.
8. Tartaj P, Morales MP, González-Carreño T, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. *J Magn Magn Mater* 2005; 290: 28–34.
9. Peng Y, Park C, Zhu JG, White RM, Laughlin DE. Characterization of interfacial reactions in magnetite tunnel junctions with transmission electron microscopy. *J Appl Phys* 2004; 95: 6798-6800.
10. Miser DE, Shin EJ, Hajaligol MR, Rasouli F. HRTEM characterization of phase changes and the occurrence of maghemite during catalysis by an iron oxide. *App. Cat. A: Gen* 2004; 258: 7–16.
11. Brice-Profeta S, Arrio MA, Tronc E, Menguy N, Letard I, Cartier dit Moulin C, Noguès M, Chanéac C, Jolivet JP, Sainctavit P. Magnetic order in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: a XMCD study. *J Magn Magn Mat* 2005; 288: 354–365.
12. Di Marco M, Port M, Couvreur P, Dubernet C, Ballirano P, Sadun C. Structural characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles in aqueous suspension by energy dispersive X-ray diffraction (EDXD). *J Am Chem Soc* 2006; 128: 10054–10059.
13. Moeser GD, Green WH, Laibinis PE, Linse P, Hatton TA. Structure of polymer-stabilized magnetic fluids: small-angle neutron scattering and mean-field lattice modelling. *Langmuir* 2004; 20: 5223-5234.
14. Sadun C, Bucci R, Magr AL. Structural Analysis of the Solid Amorphous Binuclear Complexes of Iron(III) and Aluminum(III) with Chromium(III)-DTPA Chelator Using Energy Dispersive X-ray Diffraction. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 3036-3041.
15. Chatterjee J, Haik Y, Chen CJ. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J. Magn Magn Mater* 2003; 257: 113–118.
16. Iglesias O, Labarta A. Role of surface disorder on the magnetic properties and hysteresis of nanoparticles. *Physica B* 2004; 343: 286–292.
17. Gaur U, Sahoo SK, De TK. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int J Pharm* 2002; 202:1–10.
18. Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, Dubernet C, Jaillard D, Degrouard J, Hoebeke J, Duguet E, Colombo P, Couvreur P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug Chem* 2005; 16: 1181-1188.
19. Bjornerud A, Johansson LO, Ahlstrom HK. Pre-clinical results with Clariscan (NC100150 Injection): experience from different disease models. *MAGMA* 2001; 12: 99-103.

20. Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Biomaterials* 2002; 23(7):1553-1561.
21. Bautista MC, Bomati-Miguel O, Morales MP, Serna CJ, Veintemillas-Verdaguer S. Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. *J Magn Magn Mater* 2005; 293: 20-27.
22. Bourrinet P, Bengele HH, Bonnemain B, Dencausse A, Idee JM, Jacobs PM, Lewis JM. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol* 2006; 41(3): 313-324.
23. Mornet S, Portier J, Duguet E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. *J Magn Magn Mater* 2005; 293: 127-134.
24. Wapner K, Grundmeier G. Spectroscopic analysis of the interface chemistry of ultra-thin plasma polymer films on iron. *Surface & Coatings Technology* 2005; 200: 100-103.
25. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev* 2005; 105: 1103-1169.
26. Tirrell M, Kokkoli E, Biesalski M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science* 2002; 500: 61-83.
27. Roger J, Pons JN, Massart R, Halbreich A, Bacri JC. Some biomedical applications of ferrofluids. *Eur Phys J AP* 1999; 5: 321-325.
28. Brovelli D, Hähner G. Highly oriented self-assembled alkanephosphate monolayers on tantalum(V) oxide surfaces. *Langmuir* 1999; 15: 4324-4327.
29. Sahoo Y, Pizem H, Fried T, Golodnitsky D, Burstein L, Sukenik CN, Markovich G. Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: a comparison with fatty acids. *Langmuir* 2001; 17: 7907-7911.
30. White MA, Johnson JA, Koberstein JT. 2006. Toward the syntheses of universal ligands for metal oxide surfaces: controlling surface functionality through click chemistry. *J Am Chem Soc* 2006; 128: 11356-11357.
31. Auernheimer J, Zukowski D, Dahmen C, Kantlehner M, Enderle A, Goodman SL, Kessler H. Titanium implant materials with improved biocompatibility through coating with phosphonate-anchored cyclic RGD peptides. *ChemBioChem* 2005; 6(11): 2034-2040.
32. Persson P, Nilsson N, Sjöberg S. Structure and bonding of orthophosphate ions at the iron oxide-aqueous interface. *J Colloid Interf Sci* 1996; 177: 263-275.
33. Nowack B, Stone AT. Adsorption of phosphonates onto the goethite-water interface. *J Colloid Interf Sci* 1999; 214: 20-30.
34. Kreller DI, Gibson G, Novak W, vanLoon GW, Horton JH. Competitive adsorption of phosphate and carboxylate with natural organic matter on hydrous iron oxides as investigated by chemical force microscopy. *Colloids Surf A* 2003; 212: 249-264.
35. Nooney MG, Murrell TS, Corneille JS, Rusert EI, Hossner LR, Goodman DW. A spectroscopic investigation of phosphate adsorption onto iron oxides. *J Vac Sci Technol A* 1996; 14: 1357-1361.
36. Stumm W. *Chemistry of the solid-water interface*. New York: Wiley & Sons; 1992.
37. Barja BC, Dos Santos Afonso M. Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a Comparative study. *Environ Sci Technol* 2005; 39: 585-592.
38. Joly L, Ybert C, Trizac E. Hydrodynamics within the electric double layer on slipping surfaces. *Phys Rev Lett* 2004; 93(257805): 1-4.
39. Xu R. Shear plane and hydrodynamic diameter of microspheres in suspension. *Langmuir* 1998; 14: 2593-2597.
40. Hunter RJ. *Foundations of Colloid Science*, 2nd Ed. Oxford: Clarendon Press; 2001.
41. Dukhin AS, Ohshima H, Shilov VN, Goetz PJ. Electroacoustics for Concentrated Dispersions. *Langmuir* 1999; 15(10): 3445-3451.
42. O'Brien RW, White LR. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J Chem Soc Faraday Trans* 1978; 74: 1607-1626.
43. Ohshima, H. Electrophoresis of soft particles. *Adv Colloid Interf Sci* 1995; 62:189-235.
44. Di Marco M, Guilbert I, Port M, Robic C, Couvreur P, Dubernet C. Colloidal stability of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles with different coatings. *Inter J Pharm* 2006; 331(2): 197-203.
45. Derjaguin BV, Landau LD. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim* 1941; 14: 633-662.
46. Verwey EJW, Overbeek JTG. *Theory of stability of lyophobic colloids*. Amsterdam: Elsevier; 1948.
47. Janssen JJM, Baltussen JJM, van Gelder AP, Perenboom JAAJ. Kinetics of magnetic flocculation. II: flocculation of coarse particles. *J Phys D: Appl Phys* 1990; 23: 1455-1460.
48. Valle-Delgado JJ, Molina-Bolívar JA, Galisteo-González F, Gálvez-Ruiz MJ. Study of the colloidal stability of an amphoteric latex. *Colloid Polym Sci* 2003; 81: 708-715.
49. Thode K, Muller RH, Kresse M. Two-time window and multiangle photon correlation spectroscopy size and zeta potential analysis--highly sensitive rapid assay for dispersion stability. *J Pharm Sci* 2000; 89(10): 1317-1324.
50. Ortega-Vinuesa JL, Martín-Rodríguez A, Hidalgo-Álvarez R. Colloidal stability of polymer colloids with different interfacial properties: mechanisms. *J Colloid Interf Sci* 1996; 184: 259-267.
51. Holthoff H, Egelhaaf SU, Borkovec M, Schurtenberger P, Sticher H. Coagulation rate measurements of colloidal particles by simultaneous static and dynamic light scattering. *Langmuir* 1996; 12: 5541-5549.

52. Schudel M, Behrens SH, Holthoff H, Kretzschmar R, Borkovec M. Absolute aggregation rate constants of hematite particles in aqueous suspensions: a comparison of two different surface morphologies. *J Colloid Interf Sci* 1997; 196: 241-253.
53. Viota JL, de Vicente J, Durán JDG, Delgado AV. Stabilization of magnetorheological suspensions by polyacrylic acid polymers. *J Colloid Interf Sci* 2005; 284(2): 527-541.