

TESIS CARRERA DE MAESTRÍA EN FÍSICA MÉDICA

**ACTIVIDAD TIPO PEROXIDASA DE NANOPARTÍCULAS DE
 Fe_3O_4 PARA HIPERTERMIA DE FLÚIDO MAGNÉTICO.**

ANA CAROLINA MORENO MALDONADO

Maestrando

ENIO LIMA JR.

Director

ELÍN WINKLER

Co-Director

Resonancias Magnéticas – Centro Atómico Bariloche

Diciembre 2017

Instituto Balseiro
Universidad Nacional de Cuyo
Comisión Nacional de Energía Atómica
Argentina

A mis abuelos.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Conita y Joe, por su amor y apoyo.

A mis hermanas, Paula, Julieta y María José, por su locura.

A Martín, por acompañarme.

Al jefe Enio Lima agradezco su gran paciencia y pasión, porque a pesar de la gran brecha de idiomas, portuñol y tucumano, logramos realizar un bello trabajo que ansiaba hace años.

A Elin Winkler por su paciencia y su manejo impecable logrando que todo funcione.

A Roberto Zysler por su gran y desinteresada disposición para transmitirme sus conocimientos y por su buen humor. A Carlos Ramos, Mariana Rainieri, Dina Tobia, Emilio Di Biasi y Javier Curiale por sus aportes, su apoyo y sus consejos.

A Horacio Troiani por sus muy útiles enseñanzas, y por su buena predisposición en la adquisición de imágenes TEM. Y a Luis Rodríguez por su tiempo invertido en la adquisición y comprensión de datos.

Al laboratorio de Resonancias Magnéticas, por ayudar a mi crecimiento y formación como profesional.

A mis compañeros de la maestría por los lindos ratos compartidos, y a los profesores de la Maestría en Física Medica, por sus enseñanzas.

A los inquilinos del pabellón Sábado, y a las bellas amistades formadas, Anto, Sabri, Maki y Anita, mis locas hermosas gracias por todo y más! A las patricias, en especial a Ro y Pao, gracias lindas.

A mis compañeros y profesores, de la UNT, por darme las herramientas para continuar mi viaje, en especial a la queridísima Dra. Gomez Marigliano Ana Clelia.

A la Comisión Nacional de Energía Atómica, por su ayuda económica.

Al Instituto Balseiro y a la Fundación Escuela de Medicina Nuclear por la formación brindada.

Y a todos aquellos que me ayudaron y apoyaron en este camino...

..MUCHAS MUCHAS GRACIAS!

INDICE

RESUMEN	6
Capítulo 1 INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Efectos biológicos de ROS.....	10
1.2 Actividad catalítica de NPs generación de ROS	12
1.3 Magnetismo de Nanopartículas	13
1.4 Hipertermia de fluido magnético.....	18
BIBLIOGRAFÍA	21
Capítulo 2 MÉTODOS EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS 23	
2.1 Nanopartículas de óxido de hierro	23
2.2 Morfología y composición	24
2.2.1. Microscopía por transmisión electrónica.....	24
2.2.2. Espectroscopía infrarroja.....	27
BIBLIOGRAFÍA	32
Capítulo 3 ESPECTROSCOPIA EPR CON SPIN TRAPPING.....	33
3.1 Descripción de la técnica.....	33
3.2 Spin trapping	34
3.3 Parte experimental.....	37
3.3.1. Muestra patrón	38
3.3.2. Preparación de las muestras.....	39
3.3.3. Resultados de la Formación de Radicales Libres por las NPs.....	40
BIBLIOGRAFÍA	50
Capítulo 4 MAGNETISMO E HIPERTERMIA.....	51
4.1 Propiedades magnéticas	51

4.2	Hipertermia.....	54
	BIBLIOGRAFÍA	58
Capítulo 5	CONCLUSIONES.....	59
	Anexo A.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

NPs	Nanopartículas.
RL	Radical libre.
DMPO	5,5-Dimetil-1-pirrolina N-oxido
DMSO	Dimetil sulfóxido
ROS	Especie Reactiva del Oxígeno.
RNS	Especie Reactiva del Nitrógeno.
MCP	Muerte celular programada.
LMP	Permeabilidad de la membrana lisosomal.
ATP	Adenosina trifosfato.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
TEM	Microscopía por transmisión electrónica.
IR	Infrarrojo.
XPS	Espectroscopía de fotoelectrones por rayos X.
EPR	Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica.
T _B	Temperatura de bloqueo.
M _s	Magnetización de saturación.
ZFC	Zero field cooling.
FC	Field cooling.

RESUMEN

Las nanopartículas (NPs) magnéticas de ferritas, especialmente la magnetita, son ampliamente estudiadas para usos en medicina debido a su alta magnetización, estabilidad química y supuesta baja toxicidad, contando actualmente con protocolos de aplicación aprobados para usos clínicos. Recientemente, Gao et al. (Gao, 2007) demostraron la capacidad catalítica de las nanopartículas de magnetita para la producción de radicales libres (RL) en presencia de H_2O_2 en una reacción tipo-peroxidasas. Los RL son químicamente muy activos, y están presentes en procesos bioquímicos naturales en el cuerpo, pero en altas concentraciones pueden inducir estrés oxidativo. Por esta razón y debido a la creciente demanda en aplicación clínicas, la determinación de la actividad catalítica similar a la peroxidasas de NP magnéticas en diferentes medios es de vital importancia.

La cuantificación de la formación de RL puede ser determinada a partir de espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR). Debido a la alta reactividad de los RL es necesario utilizar un *spin trapping* DMPO, esta molécula estabiliza el defecto paramagnético y permite detectarlos a partir de su espectro EPR. En esta tesis, se estudió la actividad peroxidasas de tres sistemas de NPs: Fe_3O_4 , $MnFe_2O_4$ y $NiFe_2O_4$. Estas fueron preparadas por la descomposición térmica del acetilacetonato de Fe a alta temperatura; fueron caracterizadas morfológicamente por microscopía TEM, se determinaron los grupos funcionales presentes en las NPs por FTIR, y magnéticamente mediante mediciones de magnetización en función del campo y la temperatura. A partir de los espectros de EPR se identificaron los diferentes RL que se forman en la reacción y se evaluó la evolución temporal, a diferentes temperaturas y pH. Los espectros revelan radicales hidroxilo ($\cdot OH$) y superóxido ($\cdot OOH$) de la descomposición de H_2O_2 y el radical metilo ($\cdot CH_3$) del DMSO en el que se disolvió el DMPO. Además del análisis cualitativo se realizó una cuantificación de los radicales formados comparando los espectros de EPR con una muestra patrón de Mn^{2+} : MgO .

Palabras claves: Nanopartículas magnéticas, Hipertermia, Actividad peroxidasas.

PEROXIDASE TYPE ACTIVITY OF Fe_3O_4 NANOPARTICLES FOR MAGNETIC FLUID HYPERTHERMIA

ABSTRACT

Ferrite magnetic nanoparticles (NPs), especially magnetite, are widely studied for medical applications due to their high magnetization, chemical stability and supposedly low toxicity, and they currently have application protocols for clinical uses. Recently, Gao et al. (Gao, 2007) have demonstrated the catalytic capacity of the NPs for the production of free radicals (RL) in the presence of H_2O_2 in a peroxidase-type reaction. The RL are present in natural biochemical processes in the body, however, in high concentrations they can induce oxidative stress due to their high reactivity. For this reason and because of the growing demand in clinical applications, the determination of the magnetic NPs similar to peroxidase catalytic activity in different media is of vital importance.

The quantification of the RL formation can be determined by the Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy with the DMPO spin trapping. In this thesis, peroxidase activity was studied for three NP systems: Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 and NiFe_2O_4 . These NPs were prepared by the thermal decomposition of metal acetylacetonate at high temperature; they were characterized morphologically by TEM microscopy, the functional groups present in the NPs were determined by FTIR, and magnetically by magnetization measurements as a function of field and temperature. From the EPR spectra, the different RLs that are formed in the reaction were identified and the temporal evolution was evaluated at different temperatures and pH. The spectra revealed hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) and superoxide ($\cdot\text{OOH}$) of the decomposition of H_2O_2 and the methyl radical ($\cdot\text{CH}_3$) of the DMSO in which the DMPO was dissolved. In addition to the qualitative analysis, a quantification of the formed radicals was performed comparing the EPR spectra with a standard sample of Mn^{2+} : MgO.

Keywords: Magnetic nanoparticles, Hyperthermia, Peroxidase activity.

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es hoy una de las ramas más activas de la ciencia, y tiene como inicio oficial la renombrada charla del físico Richard Feynman en el año 1959, donde predecía las enormes potencialidades de la directa manipulación a nivel atómico de la materia. Esta es una rama científica con un enorme carácter interdisciplinario, con participación de áreas como la comunicación, física de superficies, física de semiconductores, química, biología.

Dentro de la rama de la nanotecnología, las nanopartículas, especialmente las magnéticas, tienen un papel destacado. Debido a su pequeño tamaño, del orden de las biomoléculas; al avance de los métodos de síntesis, que permiten controlar el proceso de fabricación (Wei Wu, 2015), y de la posibilidad de manipular sus propiedades magnéticas, se ha extendido enormemente el campo de aplicación de partículas magnéticas nanométricas como herramientas en medicina. Por ejemplo se aplican estas nanoestructuras para diagnóstico, detección y tratamiento, siendo ya muy utilizadas como contraste para imágenes de resonancia magnéticas, como distribuidor de drogas, entre otros (Leena Mohammed, 2017);(Daniel Bobo, 2016).

Según la Organización Mundial de la Salud el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo (segunda causa de muerte en el mundo), por lo que el desarrollo de tratamientos es de vital importancia. En esta línea, se ha desarrollado una técnica utilizando nanopartículas magnéticas conocida como hipertermia de fluido magnético (MFH por su siglas en inglés) (Ziba Hedayatnasab, 2017). La terapia térmica, hipertermia o termoterapia, es un tipo de tratamiento contra el cáncer mediante el cual se expone el tejido del cuerpo a altas temperaturas globales o locales. En la MFH, el calor es promovido por las pérdidas magnéticas de nanopartículas (NPs) magnéticas con la aplicación de campos magnéticos alternos. Para optimizar los resultados, las NPs magnéticas son alojadas en el tejido dañado por diferentes técnicas y se logra obtener un aumento localizado de la temperatura. Al modificar el tamaño de las NPs, sus propiedades magnéticas, o bien variando la frecuencia y amplitudes del campo externo, se logran diferentes respuestas y se pueden diseñar diferentes tratamientos. Para una mayor

efectividad de la MFH es importante estudiar la distribución de NPs a nivel celular, para lograr el menor detrimento posible del tejido sano.

Dentro de las nanopartículas magnéticas, las más estudiadas para uso en biomedicina e incluso aprobadas para uso en diversos protocolos clínicos son las NPs de óxido de hierro del tipo ferrita, específicamente la magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Esto se debe a sus excepcionales propiedades magnéticas y por ser consideradas químicamente inertes. Sin embargo, Gao y sus colaboradores (Gao, 2007) reportan que la magnetita (Fe_3O_4) posee una actividad catalítica de oxidación de un sustrato orgánico por medio de la formación de radicales hidroxilos $\cdot\text{OH}$ del tipo-peroxidasa. La actividad peroxidasa tiene un amplio rango de aplicaciones prácticas, como en el tratamiento de aguas o como herramienta de detección. A nivel celular la producción de RL específicamente las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) se dan naturalmente y son neutralizadas por antioxidantes naturales y enzimas específicas. Pequeños cambios en este frágil balance pueden resultar en un desequilibrio que lleva a una condición de estrés oxidativo (Niki, 2009), (Zhongwen Chen, 2012) (Lijun Wang, 2014) (Tongwei Zhang, 2017). Consecuentemente estas NPs de Fe_3O_4 resultarían tóxicas dependiendo de su concentración en el medio biológico. Este fenómeno no necesariamente resulta perjudicial, conociendo su efecto podrían ser utilizadas correctamente y aprovecharse sus capacidades nocivas.

La técnica más precisa actualmente conocida para la detección, identificación y cuantificación de RL es la espectroscopía por resonancia paramagnética electrónica (EPR). La propiedad tan reactiva de los RL dificulta su medición, ya que su tiempo de vida media promedio es del orden de las décimas de micro-segundos (R. G. McIntosh, 1959). Por ello, para aumentar su tiempo de vida media y lograr una lectura confiable suelen utilizarse *spin trapping*, moléculas de naturaleza paramagnética que capturan al radical aumentando su tiempo de vida (llegando al orden del minuto) y posibilitando su medición. Otra ventaja que presenta el uso de un *spin trapping* es que cada reacción con un radical específico lleva a diferentes interacciones hiperfinas para el radical formado en la molécula paramagnética, permitiendo la identificación de los radicales formados (Florina, 1990); (Janzen, 1971).

En esta tesis se estudia la producción de ROS en condiciones fisiológicas por la actividad catalítica de NPs magnéticas para su potencial uso en hipertermia de fluido

magnético. Se analiza la actividad catalítica de diferentes sistemas: Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 y NiFe_2O_4 , inicialmente estas partículas fueron caracterizadas morfológica y magnéticamente. Seguidamente, se propone una metodología cuantificable, sencilla y repetible para la identificación y medición de radicales libres a partir de la resonancia paramagnética electrónica. Para ello se evalúa el uso del *spin trapping* comercial DMPO como marcador de ROS. Se analiza la producción de ROS en función del pH, de la temperatura y su dependencia temporal. Finalmente, se mide la producción de calor por pérdidas magnéticas en presencia de un campo ac de 200 G y frecuencia entre 220 y 820 kHz para determinar su potencial para la MFH, evaluando el mecanismo físico del proceso de calentamiento de cada sistema.

A continuación se introducen brevemente conceptos básicos que serán necesarios para la discusión de los resultados.

1.1 Efectos biológicos de ROS

La unidad funcional y estructural de todo organismo vivo es la célula. Es un ente vital muy estudiado por su extremada complejidad, proporcionando herramientas y avances en la biología, medicina, etc. Por ser un sistema vivo cumple con el ciclo de vida: nacer, crecer, reproducirse y finalmente morir.

La muerte celular es un fenómeno común y necesario fisiológicamente, que ocurre continuamente en el organismo. Puede clasificarse, sencillamente, en muerte celular por necrosis y muerte celular programada (MCP). La primera ocurre cuando la célula es avasallada por tantas agresiones que no tiene posibilidad de adaptarse o defenderse. Puede ser causada por anoxia, radiación ionizante, estrés térmico, etc. Una vez atacada, la célula no produce adenosina trifosfato (ATP) y se altera la permeabilidad de la membrana plasmática y otras membranas de organelas. Como respuesta, la necrosis produce una reacción inflamatoria en el tejido (Dr. Saraví, 2012)

En la MCP, la célula tiene la capacidad de defenderse de las avasallantes agresiones a partir de diferentes mecanismos, es un proceso que puede revertirse y no produce reacción inflamatoria. Una MCP muy común es la apoptosis, este proceso regulado e inocuo puede ser puesto en marcha por mecanismos extrínsecos o intrínsecos. Sin importar el estímulo de iniciación, el final resulta en cambios morfológicos y funcionales en la célula afectada.

Otro tipo de MCP es la autofagia, que es llevada a cabo por los lisosomas, estos orgánulos contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas que ayudan a cumplir su función de digestión celular y reciclado de otras organelas; este paquete de enzimas rodeado por una única membrana fosfolipídica, posee un pH bajo (~4 a 5) con respecto al pH neutro del citosol. Se encuentran únicamente en células eucariotas, excepto en los eritrocitos.

Otra forma de MCP mediada por los lisosomas es la permeabilización de la membrana de los lisosomas (LMP, por sus siglas en inglés), la permeabilización parcial de esta simple membrana libera fuertes enzimas contenidas en su interior. Diferentes señales pueden iniciar la LMP como las inducidas por fármacos, los radicales libres de las especies reactivas del oxígeno, que a su vez activan a fosfolipasas A2, etc. Una vez activada la LMP esta podrá ser una MCP del tipo apoptosis o tipo necrosis.

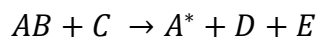
Las células están compuestas por macromoléculas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos; por azúcares, aminoácidos y casi el 70% de su peso es agua, todos estos componentes conviven en un perfecto y sincronizado equilibrio que resulta en la vida. Éste es un proceso muy estudiado, como ser el equilibrio entre el sistema oxidante y el antioxidante llamado capacidad de balance redox, un desbalance entre estos sistemas produce estrés o daño oxidativo, se ha descubierto que este efecto nocivo está relacionado con enfermedades, síndromes y procesos degenerativos. Por lo tanto la comprensión de la generación y disminución de estos sistemas para el posterior control representan un avance en la medicina.

Los compuestos antioxidantes se caracterizan por reaccionar con los radicales libres, son cualquier sustancia que retarda o previene la oxidación. Pueden clasificarse en enzimáticos, como la catalasa, el glutatión peroxidasa; y en no enzimáticos, como el cloruro la melatonina.

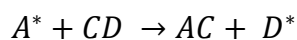
El sistema oxidante está formado por las especies reactivas, que pueden ser tanto radicales libres como no. Este conjunto de moléculas se forman como resultado del metabolismo celular, fisiológicos normales y patológicos, en el sistema biológico se los conoce como especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y especies reactivas del nitrógeno (RNS). Los radicales libres (RL) son moléculas que en su último orbital tienen un electrón o más desapareados, con una disposición electrónica inestable, de naturaleza paramagnética, son altamente reactivos y poco específicos; por esta

característica disponibilidad presentan un tiempo de vida media corta, dificultando su detección. Para ganar estabilidad los radicales interactúan con otras moléculas con reacciones de óxido de reducción (redox), la molécula puede ganar electrones, se reduce, o perder electrones, oxidándose. Esta reacción en cadena consiste en tres etapas: (Lucía Constanza Corrales MSc, 2012)

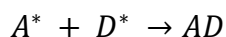
Reacción de iniciación: se forma un radical libre a partir de dos grupos no radicales



Reacciones de propagación: se produce un radical libre a partir de una molécula estable y un radical libre



Reacción de terminación: se obtiene una molécula estable a partir de dos radicales



La peroxidación es una reacción redox, que utiliza como oxidante al peróxido de hidrogeno H_2O_2 , por lo que recibe este nombre especial. También recibe el nombre de reacción tipo peroxidasa porque este proceso se asemeja a las reacciones catalizadas por la enzima peroxidasa, cuya función es catalizar la función redox que involucra al peróxido de hidrógeno.

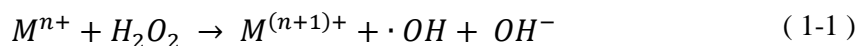
En recientes estudios de RL, más específicamente de las ROS se ha demostrado que pueden ser protectores o nocivos para el organismo vivo (Trang Mai, 2017). Las bajas concentraciones de ROS son utilizadas como mensajeros, pero las altas concentraciones en un periodo de tiempo prolongado resultan perjudiciales para la supervivencia celular, debido a que la producción de ROS participa en la destrucción oxidativa de macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN. Por lo tanto la manipulación de las ROS sería una puerta para la muerte celular.

1.2 Actividad catalítica de NPs generación de ROS

Gao y colaboradores (Gao, 2007) han demostrado la producción de ROS por la actividad catalítica de NPs de ferritas en presencia de H_2O_2 con similitudes a la reacción de las Peroxidasas (tipo-peroxidasa) que contienen el grupo HEMO (grupo que consiste en un ion de Fe coordinado a una profirina que actúa como un ligando tetra-dentado). Esta actividad catalítica está ligada a la reacción catalítica de Fenton que ocurre para iones en

solución. Sin embargo, en este caso los resultados de Gao y colaboradores indican que se trata de una reacción superficial de las NPs conteniendo hierro.

La reacción de Fenton, llamada así por su descubridor en 1894, es un proceso mediante el cual se acelera la velocidad de producción de radicales libres. Se usa el peróxido de hidrogeno que es catalizado por un metal de transición, como ser Fe, Cu, Mn, Ni. Las fórmulas básicas de la química de Fenton son, generalizando:



siendo M un metal de transición. La primera de estas reacciones tiene una constante de velocidad k mayor que la segunda reacción, motivo por lo cual la última es mucho más lenta.

Originalmente se han utilizado marcadores fotoluminiscentes y espectroscopía óptica para estudiar la formación de ROS por la actividad catalítica de las NPs de ferritas y determinar su concentración. Estos métodos, a pesar de prácticos, tienen dos deficiencias: la baja especificidad y la baja sensibilidad. Zhongwen y colaboradores (Zhongwen Chen, 2012) demostraron que se puede utilizar un *spin trapping* para identificar a partir de espectroscopia EPR esta actividad catalítica de las NPs con mayor sensibilidad, observando la producción de oxidrilos por NPs de Fe₃O₄ cuando se encuentran en pH 4,8. Esta técnica es extremadamente sensible, como veremos más adelante, y con un límite de detección de picomoles de espines. En esta tesis se muestra que la producción de diferentes especies de ROS por la actividad catalítica de las NPs de Fe₃O₄, MnFe₂O₄ y NiFe₂O₄ depende de la composición, del pH, de la temperatura y del estado de oxidación superficial de las NPs. El uso de *spin trapping* DMPO proporciona una ventaja ante los marcadores fotoluminiscentes ya que permite identificar la especie de radical producida y cuantificar de modo mucho más preciso la cantidad producida.

1.3 Magnetismo de Nanopartículas

Cuando se aplica un campo magnético \vec{H} a un material, su respuesta se llama inducción magnética \vec{B} y depende de las propiedades del medio de la siguiente manera (en unidades cgs):

$$\vec{B} = \vec{H} + 4\pi \vec{M} \quad (1-3)$$

siendo \vec{M} la magnetización del medio.

Un material puede definirse por su inductancia magnética, su magnetización y la manera en la que estas cantidades varían con un campo aplicado. La relación entre \vec{M} y \vec{H} se llama susceptibilidad, e indica la respuesta del material a un campo magnético aplicado:

$$\chi = \frac{\vec{M}}{\vec{H}} \quad (1-4)$$

La relación entre \vec{B} y \vec{H} se llama permeabilidad μ e indica cuán permeable al campo magnético es el material.

$$\mu = \frac{\vec{B}}{\vec{H}} \quad (1-5)$$

Usando las ecuaciones (1-3), (1-4) y (1-5)

$$\mu = 1 + 4\pi \chi \quad (1-6)$$

Con respecto al magnetismo, los materiales pueden ser diferenciados en diamagnéticos, con una χ negativa; paramagnéticos, donde los momentos internos del material fluctúan con la energía térmica y los materiales ordenados, que a grosso modo pueden presentar un ordenamiento ferromagnético (todos los momentos acoplados paralelamente), antiferromagnético (dos subredes de momentos acopladas de modo anti-paralelo entre sí) y ferrimagnético (un ordenamiento antiferromagnético pero con las dos subredes descompensadas). Las ferritas estudiadas en este trabajo tienen el ordenamiento ferrimagnético.

Los momentos en un material magnético ordenado están relacionados por la energía de intercambio. La energía de intercambio se produce cuando un momento magnético atómico individual se acopla al resto de los momentos magnéticos, es una energía de corto alcance. Otro factor importante para determinar las propiedades magnéticas del material es la energía de anisotropía, que es la tendencia de los momentos a ordenarse en una dirección preferencial, el eje fácil. Buscando minimizar la energía magnetostática se crean grandes regiones de magnetización uniforme (dominios magnéticos) separados por pequeñas regiones donde la magnetización rota de una dirección fácil a otra, llamadas paredes de dominio, o paredes de Bloch, cuyo tamaño depende del balance entre la energía de intercambio (que prefiere paredes anchas) y la anisotropía (prefiere paredes angostas).

Cuando se trabaja a escalas muy pequeñas (nm) el gasto energético para generar paredes de dominios es muy grande comparado con la disminución de la energía magnetoestática debido a la formación de dominios magnéticos. Por lo tanto, al reducir la dimensión de un material a escala nanométrica, del orden de la pared de dominio, el material presenta un monodominio magnético. Por lo tanto, debajo de la temperatura de orden magnético del material, las NPs se ordenan formando un monodominio magnético. En el caso de un material ferromagnético todos sus momentos interiores se encuentran orientados entre sí, generando un gran momento del orden de miles de momentos magnéticos atómicos. Para el caso de las partículas de ferritas, el ordenamiento es ferrimagnético.

Si se aplica un campo magnético a una NP monodominio con anisotropía uniaxial, su energía magnética puede ser descrita por:

$$E_B = K V \sin^2 \theta - \mu H \cos(\gamma - \theta) \quad (1-7)$$

siendo K la constante de anisotropía uniaxial, V el volumen de la partícula y los ángulos γ y θ como se muestran en la figura:

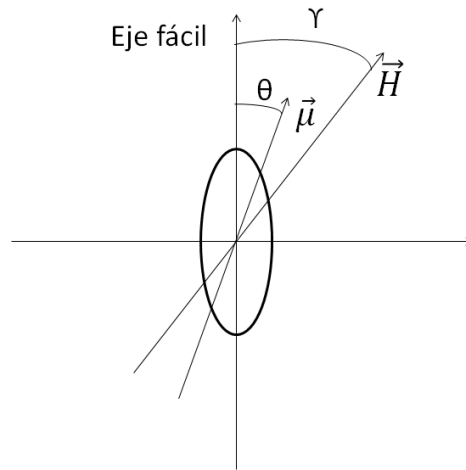


Figura 1-1. Definición de ejes del sistema de NP monodominio con campo aplicado \vec{H} .

En ausencia de campo magnético (**Figura 1-2**, izquierda), se observan dos mínimos de energía para $\theta = 0$ y π , en donde el momento magnético está alineado al eje de anisotropía. La barrera de energía entre estos dos niveles es KV y la partícula tiene igual probabilidad de estar en cualquiera de los dos pozos. Debido a las fluctuaciones térmicas el momento magnético de la partícula puede superar la barrera de energía (KV) e invertir su

magnetización. Al aplicar un campo magnético \vec{H} (Figura 1-2, derecha), esta situación de equilibrio no se mantiene, siguen presentándose dos mínimos de energía pero uno de ellos se muestra con mayor probabilidad, es decir que la dinámica de inversión tiene un sentido privilegiado.

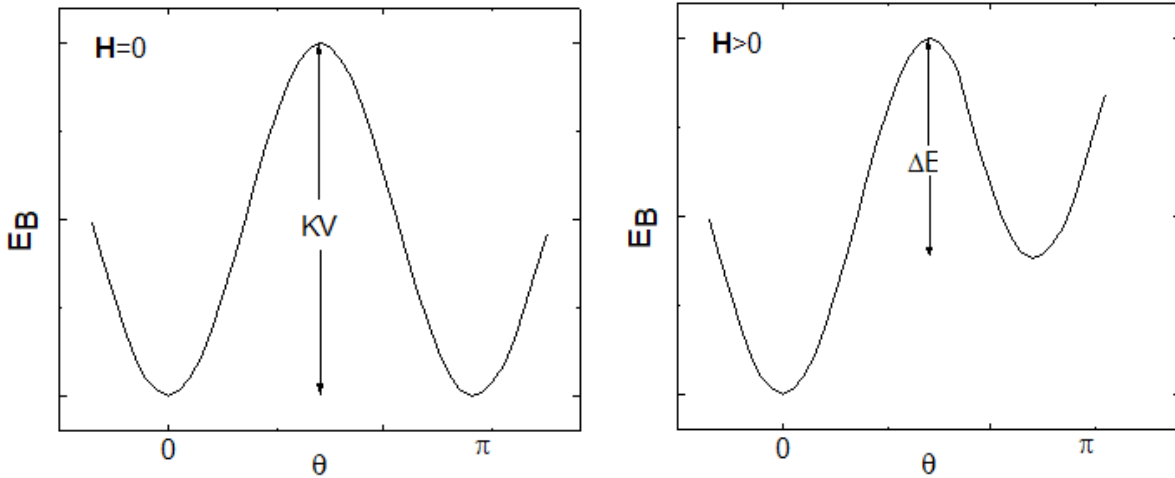


Figura 1-2. Dependencia angular de la energía magnética, con campo nulo (izquierda) y con campo aplicado (derecha).

La magnetización de estas partículas relaja al estado de equilibrio siguiendo la ley Arrhenius:

$$M(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1-8)$$

siendo M_0 la magnetización inicial y τ el tiempo de relajación característico

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad (1-9)$$

donde ΔE es la barrera de energía, que para el caso de partículas sin campo magnético aplicado es KV , k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura y τ_0 tiempo característico del sistema.

La determinación de las propiedades magnéticas del sistema depende de la barrera de energía, la temperatura del sistema y el tiempo de medición t_m , es decir del observador. Este tiempo recibe el nombre *ventana temporal* y corresponde al tiempo total en el que se realiza la medición del momento magnético. Si t_m es lo suficientemente largo para observar las variaciones de magnetización, $t_m \gg \tau$, se dice que el sistema está en equilibrio termodinámico. En cambio, si $t_m \ll \tau$, el sistema se encuentra en un estado de no equilibrio

termodinámico. Cuando $t_m \gg \tau$ el momento de las NPs fluctúa entre los mínimos de energía durante la medida de modo similar a un paramagneto pero con un momento grande, por ello a este régimen se lo denomina superparamagnético. En cambio, cuando $t_m \ll \tau$, las NPs están en un régimen bloqueado, donde el momento magnético se encuentra en uno de los mínimos durante la medida. A partir de la ecuación (1-9) se puede calcular la temperatura que separa ambos regímenes, la cual depende de t_m y de la energía de la barrera, por lo tanto de K y del tamaño de la NP, denominada temperatura de bloqueo T_B :

$$KV = \ln\left(\frac{t_m}{\tau_0}\right) k_B T_B \quad (1-10)$$

Cuando el sistema se encuentra en un estado de no equilibrio termodinámico, se observa una dependencia con su historia magnética (irreversibilidad), además de la temperatura y el campo magnético aplicado. Una manera de estudiar la temperatura de bloqueo del sistema, y por lo tanto su barrera de energía, es por medidas de magnetización en función de la temperatura según los protocolos denominados Zero-field-cooling (ZFC) y Field-cooling (FC): en el primero se realiza la medición de magnetización en función de la temperatura con un pequeño campo aplicado después de enfriar la muestra a una temperatura inferior a la T_B sin el campo aplicado, con la población en los dos mínimos igualmente poblados; y el segundo consiste en la misma medida pero después de enfriar la muestra con un campo magnético aplicado que prioriza uno de los mínimos.

Los resultados esperados para las curvas de medidas ZFC y FC son mostrados en la figura 1-3. Ambas curvas se superponen en el régimen superparamagnético, es decir, por arriba de la T_B , en la zona reversible de la curva de magnetización. Para temperaturas inferiores a T_B , cuando se enfría el sistema sin campo aplicado (curva ZFC) los mínimos de energía están igualmente poblados, resultando en una magnetización nula. A medida que aumentamos la temperatura, con el pequeño campo magnético aplicado (que cumpla con la condición $\mu H \ll k_B T$), los momentos magnéticos permanecerán bloqueados hasta alcanzar la T_B , durante este recorrido el τ disminuye al aumentar la temperatura, al alcanzar $\tau < t_m$ el sistema pasa al régimen estacionario y se obtiene una curva superparamagnética característica, que puede ser ajustada con la ley de Curie:

$$M = \frac{C}{T} H, C = \frac{N\mu^2}{3K_B} \quad (1-11)$$

donde el momento magnético corresponde a la suma de todos los momentos en el interior de la partícula.

Para el caso de la medición FC, debajo de T_B hay una descompensación entre los mínimos, resultando en una magnetización neta no-nula dada por $M = \frac{C}{T_B} H$.

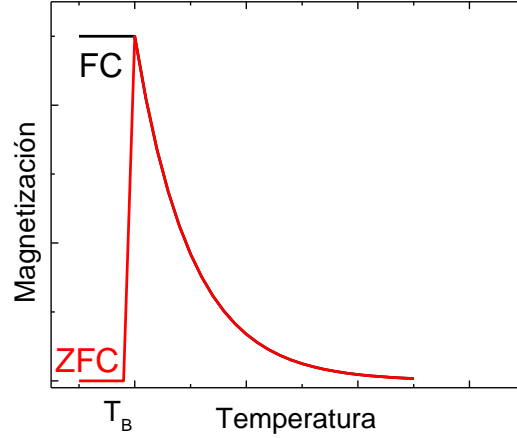


Figura 1-3. Mediciones de magnetización en función de la temperatura en condiciones de FC (-) y ZFC (-).

Un sistema de NPs monodominio presenta una distribución de tamaños y de constantes de anisotropía, como consecuencia las barreras de energía no son las mismas para todas las partículas, llevando a una distribución de T_B . Es por este motivo que las gráficas de ZFC y FC para un sistema real son diferentes para $T < T_B$ en comparación con la **Figura 1-3**, presentando un pico máximo en la ZFC y un pequeño crecimiento en la FC. En este caso, la temperatura de bloqueo media $\langle T_B \rangle$ puede ser determinada a partir de la distribución de temperaturas de bloqueo: (E Lima Jr, 2010)

$$f(T_B) = \left(\frac{1}{T_B} \right) \frac{d(M_{ZFC} - M_{FC})}{dT} \quad (1-12)$$

1.4 Hipertermia de fluido magnético

El Instituto Nacional de Salud (NIH) define a la hipertermia o termoterapia como el tratamiento de cáncer basado en un sobre-calentamiento con $T > 42^\circ\text{C}$ en el tejido del cuerpo, dañando principalmente al maligno y produciendo el mínimo daño en el sano.

Existen diversas maneras de generar calor para la termoterapia, global o localmente. Por ejemplo, mediante estados febriles prolongados, calentando la sangre que luego llegará

al tumor, con radiación, con agua o vapor, con radiación electromagnética de radiofrecuencias, microondas y/o ultrasonido. Una manera de generar calor local es aplicando un campo magnético alterno a un medio líquido con NPs magnéticas, que por pérdidas magnéticas (histéresis) producen un aumento en la temperatura del sistema.

Cuando se aplica un campo magnético alterno (AMF por sus siglas en inglés) a las NPs magnéticas inmersas en un medio líquido, el momento magnético de cada partícula monodominio se alinea con el campo para disminuir la energía libre. Hay dos mecanismos posibles para la relajación del momento magnético: o por una rotación del momento magnético de la partícula contra la barrera de energía, a través de una rotación física de la NP con el momento fijo en el eje fácil, produciendo un torque en el medio viscoso. El primer mecanismo recibe el nombre de relajación de Néel y el segundo se denomina relajación de Brown.

El tiempo de relajación de Néel τ_N puede ser descrito como un proceso térmicamente activado (Ley de Arrhenius) por:

$$\tau_N = \tau_0 \exp(K_{eff}V/K_B T) \quad (1-13)$$

siendo τ_0 una constante de tiempo característico (normalmente de 10^{-9} - 10^{-11} segundos), V el volumen de la NP, K_{eff} es la constante de anisotropía efectiva, $K_B T$ es la energía térmica del sistema. Este mecanismo de relajación depende por lo tanto de la temperatura, de la morfología y propiedades magnéticas de las NPs.

El tiempo asociado a la relajación de Brown puede describirse por:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{K_B T} \quad (1-14)$$

donde η es la viscosidad dinámica del fluido y V_H es el volumen hidrodinámico. Por lo tanto, depende de las propiedades reológicas del sistema medio/NPs.

Si consideramos los dos mecanismos independientes, el tiempo de relajación efectivo τ_{eff} producido por ambos mecanismos resulta (Rosensweig, 2002):

$$\frac{1}{\tau_{eff}} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (1-15)$$

Para evaluar la producción de energía necesaria para calentar y dañar al tumor es necesario conocer la cantidad de calor absorbido por el sistema por unidad de masa. Una manera de evaluarlo es a partir de la tasa de absorción específica (Specific Power

Absorption, SPA). El SPA permite obtener una medición del poder térmico disipado por unidad de masa de material magnético en Watts por gramo (W/g). Entre otras cosas la cuantificación de este fenómeno es importante para optimizar la concentración de partículas en el tumor.

Si se aplica un campo magnético alterno $\vec{H} = H_0 \cos(\omega t)$ con frecuencia f , el poder de absorción P del sistema, es la variación de energía interna ΔU por ciclo

$$P = f \Delta U \quad (1-16)$$

Por lo tanto, el poder de absorción por unidad de masa o SPA es:

$$SPA = \frac{P}{m} \quad (1-17)$$

Siendo m la masa del material magnético responsable del calentamiento. El SPA es un parámetro que determina la eficiencia de un sistema para absorber energía de un campo aplicado.

Muchos modelos (E., 2015) describen al fenómeno de relajación magnética de una NP como el proceso clave para calentar, evaluando a partir de la tasa de absorción de las NPs en un campo magnético alterno. Uno de estos modelos es la Teoría de la Respuesta Lineal (LRT), que considera que la magnetización del sistema M depende linealmente del campo magnético H (1-4). Esta suposición es válida en el límite donde $H=0$ o cuando se tiene anisotropía infinita.

$$SPA = \mu_0 \pi H_0^2 \chi_0 \frac{2\pi f^2 \tau_{eff}}{(2\pi f \tau_{eff})^2 + 1} \quad (1-18)$$

En los experimentos de hipertermia, el SPA es determinado a partir de la variación de temperatura del líquido en función del tiempo durante el cual se aplica el campo. En este caso, si consideramos un sistema adiabático, el SPA puede ser determinado directamente por calorimetría:

$$SPA = C \frac{m_L}{m_{NPs}} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad (1-19)$$

donde C es el calor específico del medio, m_L es la masa del líquido, m_{NPs} es la masa de Nanopartículas dispersas en el líquido y $\Delta T/\Delta t$ es la tasa de variación temporal de la temperatura. El valor de $\Delta T/\Delta t$ se obtiene del ajuste lineal de la parte inicial de la curva de calentamiento donde la condición adiabática es válida.

BIBLIOGRAFÍA

- Daniel Bobo, K. J., et al. (2016). "Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date" . *Pharmaceutical Research* 33 , 2373–2387.
- Dr. Saraví, F. (2012). *Radiobiología. Capítulo 8: muerte celular*. Instituto Balseiro.
- E Lima Jr, E. D., et al.(2010). "Surface effects in the magnetic properties of crystalline 3 nm ferrite nanoparticles chemically synthesized". *J. Appl. Phys.* 108.
- E., T. M., et al. (2015). *Power absorption mechanism in high-anisotropy CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles*. Zaragoza, España.
- Florina, F. Y., et al. (1990). "a chemical and kinetic evaluation of spin trapping by 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-n-oxide in the reaction of [Fe(III)-EDTA]-1 with peroxide" . Florina, USA.
- Gao, L. e., et al. (2007). *Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles*. Nature Nanotechnology: 577-583.
- Janzen, E. G., et al. (1971). "Spin trapping". *Accounts of Chemical Research* 4, 31-40.
- Leena Mohammed, H. G.et al. (2017). "Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review" . *Particuology* 30, 1-14.
- Lijun Wang, Y. M., et al. (2014). Membrane lipid peroxidation by the peroxidase-like activity of magnetite nanoparticles. *Royal Society of chemistry*, 11147-11150.
- Lucía Constanza Corrales MSc, M. M. (2012). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*. Colombia.
- Niki, E., et al. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.*, 469-484.
- R. G. McIntosh, R. L., et al. (1959). "Mean Lifetime of Free Radical Chains Determined by a Flow Technique" . *Science* 131.
- Rosensweig, R. E., et al. (2002). "Heating Magnetic Fluid with Alternating Magnetic Field. Journal of Magnetism and Magnetic Materials". *J. Magn. Magn. Mater.* 252, 370-374.
- Tongwei Zhang, C. C., et al. (2017). Enhanced peroxidase activity and tumour tissue visualization by cobalt-doped magnetoferritin nanoparticles. *IOP Publishing*.

- Trang Mai, J. Z., et al. (2017). *Magnetic nanoparticles: reactive oxygen species generation and potencial therapeutic applications*. J Nanopart Res 19:253.
- Wei Wu, Z. W.-S., et al. (2015). “Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications” . *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16.
- Zhongwen Chen, J.-J. Y.-T. (2012). *Dual Enzyme-like Activities of Iron Oxide Nanoparticles and Their Implication for Diminishing Cytotoxicity*. American Chemical Society Nano.
- Ziba Hedayatnasab, F. A., et al. (2017). “Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application” . *Materials & Design* 123, 174-196.

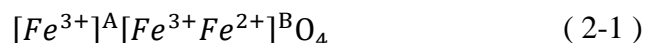
Capítulo 2 MÉTODOS EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para los estudios realizados en este trabajo, se utilizaron tres sistemas diferentes de nanopartículas de ferritas fabricadas previamente en el laboratorio de Resonancias Magnéticas por el método de descomposición térmica de precursores órgano-metálicos en altas temperaturas. La caracterización morfológica de estas muestras se realizó por microscopia TEM, y su funcionalización fue investigada por FT-IR. A continuación se describe el sistema de NPs y se da un detalle de las técnicas experimentales utilizadas.

2.1 Nanopartículas de óxido de hierro

En esta tesis se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de diferentes sistemas de nanopartículas de ferritas Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 y NiFe_2O_4 . Las mismas fueron preparadas por la descomposición térmica en alta temperatura (630 K) de los respectivos precursores acetilacetatos en presencia de surfactantes, similar a los descritos en las referencias (S Sun, 2004) (AD Arelaro, 2007). A partir de este método de síntesis las partículas obtenidas son hidrofóbicas debido a que están recubiertas con ácido oleico. Por lo tanto para los experimentos en medio acuoso, se utilizó un proceso post-síntesis para recubrirlas con DEXTRAN y poder dispersarlas en agua conforme lo reportado en la referencia (ML Mojica Piscioti, 2014).

La magnetita tiene la fórmula general Fe_3O_4 , para otros metales de transición como Al, Cu, Mn, Ni se utiliza la fórmula genérica de las ferritas MFe_2O_4 . La ferrita tiene una estructura del tipo espinela con una celda unitaria formada por 56 átomos (Bragg., 1915) 32 oxígenos formando una estructura fcc, 64 sitios tetraédricos (zona A) ocupados por 8 Fe^{+3} , y 32 sitios octaédricos (zona B) ocupados por 8 Fe^{+2} y 8 Fe^{+3} . Su fórmula estructural puede escribirse como:



Estas espinelas pertenecen al grupo espacial $Fd3m$, su estructura cristalina se muestra en la Figura 2-1. En particular la magnetita tiene un parámetro de red $a = (8,3970 \pm 1)\text{\AA}$ y su temperatura de Curie, T_C , es 851 K.

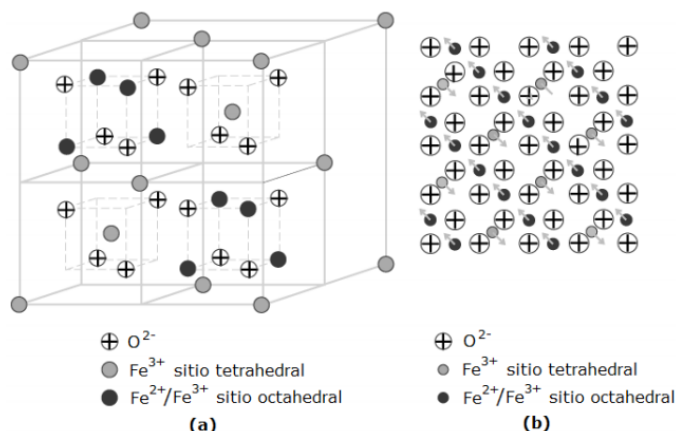


Figura 2-1. Estructura cristalina de la magnetita. (a) El lado frontal de una celda cúbica unidad (b) Organización ferrimagnética en la magnetita: ilustración del plano $[1,1,1]$.

2.2 Morfología y composición

2.2.1. Microscopía por transmisión electrónica

La morfología y estructura cristalina de las nanopartículas fue investigada a partir de microscopía de transmisión electrónica, TEM por sus siglas en inglés. En esta técnica un haz de electrones es transmitido a través de una muestra delgada generando una imagen aumentada con una resolución menor a 0.2 nm.

El TEM consiste en una fuente de electrones conectada a una fuente de 100-300KV. Un sistema de campos magnéticos enfoca el haz de electrones en la muestra, actuando como una lente en un microscopio común. La muestra se encuentra suspendida sobre una grilla cuyo material es transmisor de electricidad, comúnmente de cobre u oro. Al interactuar el haz de electrones con la muestra, una porción de éste será absorbida por la muestra, otra reflejada y otra transmitida, y a partir de una serie de imanes la imagen obtenida es amplificada en una pantalla fluorescente. Todo este sistema requiere estar en ultra alto vacío.

Para determinar la forma y tamaño de las NPs se obtuvieron imágenes a partir de microscopía TEM, en el laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la División Física de Metales del Centro Atómico Bariloche, con el microscopio electrónico de transmisión marca PHILIPS modelo CM200UT. Es un microscopio de 200 kV con filamento de emisión termoiónica de LaB6, lente de alta resolución con resolución puntual de 0,2 nm. Se pueden capturar imágenes digitales con una cámara KeenView de 1,3k x 1k pixeles. Con este instrumento se pueden obtener imágenes de alta resolución, con contraste y patrones de difracción. Las imágenes representativas que se adjuntan fueron adquiridas por el Dr. Horacio Troiani, también investigador en el Centro Atómico. Se realizaron curvas de distribución de tamaño en cada caso.



Figura 2-2. TEM marca PHILIPS modelo CM200UT.

Como se ha mencionado anteriormente, la muestra a analizar debe ser muy delgada para que los electrones puedan atravesarla, por lo tanto su preparación es muy importante. Se diluyó una pequeña cantidad de nanopartículas en el disolvente orgánico tolueno, se sónico la muestra y con la ayuda de una micropipeta se colocó una pequeña gota sobre una rejilla de oro recubierta con un filme ultra-fino de Carbono.

Una vez adquiridas las imágenes se utilizó el programa GATAN digital micrograph para simular las NPs con circunferencias y triángulos, y obtener su tamaño. Se midieron aproximadamente 800 nanopartículas de cada sistema y se realizó el histograma

correspondiente en cada caso. La distribución de tamaño se ajustó una función log-normal, que responde a la relación

$$f(d) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma d} \right) \exp \left[-\ln^2 \left(\frac{d/d_0}{2\sigma^2} \right) \right] \quad (2-2)$$

donde d_0 es el diámetro más probable y σ es la dispersión, la desviación estándar y el diámetro medio fueron calculados $\sigma_d = \langle d \rangle [\exp(\sigma^2) - 1]^{1/2}$, y $\langle d \rangle = d_0 \exp\left(\frac{\sigma^2}{2}\right)$ (Lavorato G., 2014).

Para las NPs de Fe_3O_4 , se obtuvieron los valores $\langle d \rangle = 10 \text{ nm}$, $\sigma=0,3$ y $\sigma_d = 3 \text{ nm}$. Para las de MnFe_2O_4 se obtuvieron los valores $\langle d \rangle = 11 \text{ nm}$, $\sigma=0,3$ y $\sigma_d = 3 \text{ nm}$. Y para las NPs de NiFe_2O_4 se obtuvieron dos picos con los valores $\langle d \rangle = 10 \text{ nm}$, $\sigma=0,9$ y $\sigma_d = 5 \text{ nm}$, y $\langle d \rangle = 18 \text{ nm}$, $\sigma=0,2$ y $\sigma_d = 4 \text{ nm}$.

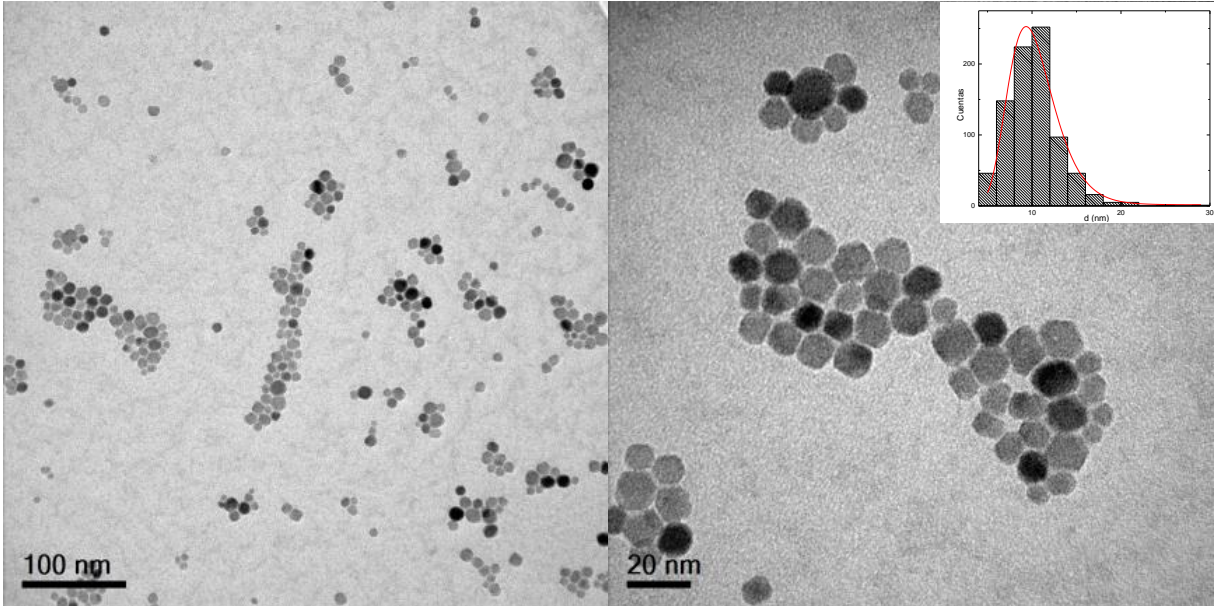


Figura 2-3. Imágenes TEM de nanopartículas de Fe_3O_4 , junto con el histograma que representa la distribución de tamaño de las partículas y el correspondiente ajuste con una función log-normal.

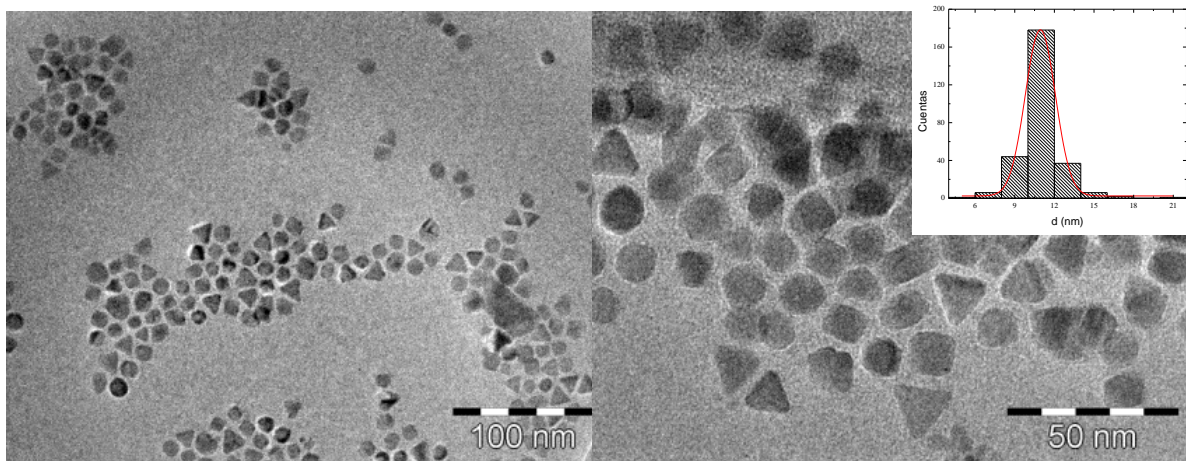


Figura 2-4. Imágenes TEM de nanopartículas de MnFe_2O_4 , junto con el histograma que representa la distribución de tamaño de las partículas y el correspondiente ajuste con una función log-normal.

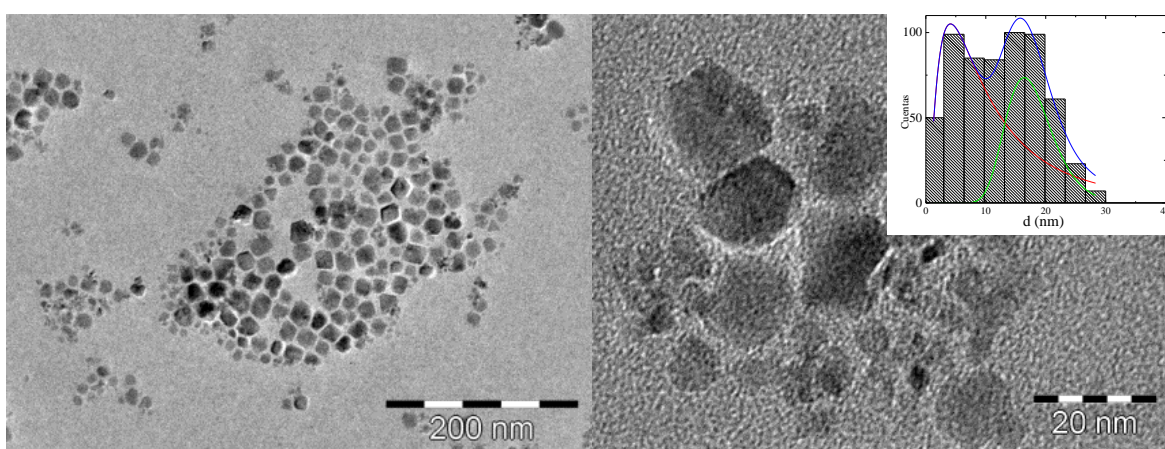


Figura 2-5. Imágenes TEM de nanopartículas de NiFe_2O_4 , junto con el histograma que representa la distribución de tamaño de las partículas y el correspondiente ajuste con una función log-normal.

2.2.2. Espectroscopía infrarroja

Al analizar la energía de una molécula, es posible describirla como la contribución de tres energías: energía rotacional, energía vibracional y energía electrónica. En primera aproximación estas contribuciones pueden ser consideradas en forma separada. En general, una variación de energía puede calcularse de la expresión:

$$\Delta E = h\nu$$

(2-3)

donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia.

Al realizarse una transición entre diferentes niveles de energía de un sistema se absorbe o emite energía. Para transiciones electrónicas, las frecuencias de la radiación electromagnética emitidas o absorbidas estarán en la región ultravioleta y visible del espectro electromagnético. Las frecuencias correspondientes a las vibraciones moleculares aparecen en la región infrarroja del espectro, mientras que las de rotación pura se encuentran en la región de microondas y del infrarrojo lejano.

Las vibraciones moleculares producen oscilaciones en las cargas eléctricas con frecuencias gobernadas por las frecuencias normales de vibración del sistema. Un dipolo molecular oscilante puede interactuar directamente con una radiación electromagnética de la misma frecuencia, produciendo la absorción de energía por resonancia. Estas absorciones se observan en el infrarrojo.

Para comprender el mecanismo de absorción de radiación infrarroja (IR) por las moléculas, podemos compararlo con el modelo del oscilador simple, cuya solución a la ecuación de movimiento es una función periódica del tiempo. En consecuencia, al cambiar la distancia entre los átomos también varía la distribución electrónica y, por lo tanto, el momento dipolar de la molécula variará en forma periódica y con la misma frecuencia ν que el desplazamiento.

Como ν depende de la constante de fuerza, del enlace involucrado así como también de la masa reducida del sistema, se puede esperar que los grupos funcionales, tales como C=O, C-H, OH, etc., tengan una zona de vibración característica, que variará ligeramente debido a la influencia del resto de la molécula y del entorno, siempre que las interacciones sean débiles comparadas con la energía del enlace.

Para poder analizar la composición de nuestras muestras se adquirieron sus espectros IR. Se utilizó el espectrómetro FT-IR marca PerkinElmer modelo Spectrum Two que se encuentra en el laboratorio. Con un rango de trabajo de $8,300 - 350 \text{ cm}^{-1}$ y una resolución de $0,5 \text{ cm}^{-1}$, este espectrómetro cuenta con un sistema del tipo U-ATR que utiliza un cristal en el camino óptico permitiendo realizar tanto mediciones en vidrio como en pequeñas cantidades de material.



Figura 2-6. Espectrómetro FT-IR marca PerkinElmer modelo Spectrum Two utilizado.

Gracias a la practicidad y sensibilidad de este espectrómetro, para realizar la medición sólo es necesario colocar una pequeña cantidad de muestra sobre el cristal del sistema ATR. Para realizar las mediciones utilizamos una solución de las nanopartículas en diferentes solventes (tolueno para las recubiertas con ácido oleico y agua destilada para las recubiertas con DEXTRAN) la cual se depositaba a gotas sobre el cristal y de esta manera el solvente se evaporaba, quedando una película homogénea y delgada sobre toda el área del cristal. Para la limpieza del equipo se usó etanol.

Los espectros obtenidos, para las NPs con recubrimiento de ácido oleico se muestran en la Figura 1-8.

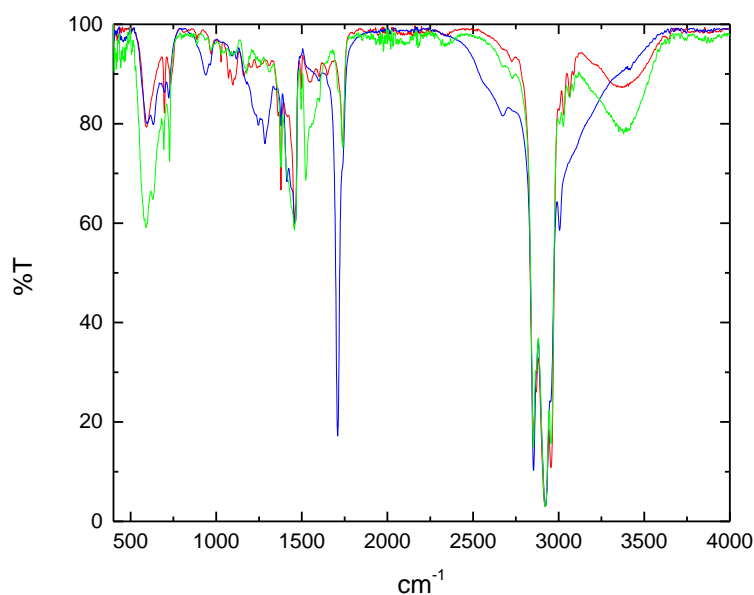


Figura 2-7. Espectro IR de NPs de Fe_3O_4 (-), MnFe_2O_4 (-) y NiFe_2O_4 (-), recubiertas con ácido oleico.

Del espectro se observa la presencia del ácido oleico en las tres muestras, con algunas características muy marcadas de este compuesto cuando se encuentra ligado a las nanopartículas (L Zhang, 2006):

- Las bandas características de los grupos de grupos C-H ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$) con intensidades variable entre $3330\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, siendo estas bandas muy similares entre las 3 muestras.

- Las bandas entre $600\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ corresponden a las ligaduras metal-oxígeno.

- La presencia de un pico intenso entre $1700\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ corresponde al grupo C=O característico de ácido oleico, presente en las 3 muestras.

- Las bandas entre $1610\text{ y }1400\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los modos asimétrico y simétrico del grupo v-COO^- que indican la ligación de la molécula orgánica con la superficie de la partícula: la mayor distancia entre bandas observadas para la MnFe_2O_4 indica un enlace monodentado (por solamente un oxígeno) entre la partícula y el oleico, y para Fe_3O_4 y NiFe_2O_4 , la menor distancia entre estas bandas indica un enlace del tipo bidentado (por los dos oxígenos).

Además, en las tres muestras hay una banda muy pronunciada y ancha cerca de los 3000 cm^{-1} , este pico se debe a enlaces oxhidrilos (-OH).

En la **Figura 2-89**, se muestran los espectros obtenidos para la muestra de Fe_3O_4 durante las etapas involucradas en el proceso de recubrimiento de estas partículas con DEXTRAN: primero éstas se encuentran cubiertas con ácido oleico, después sin ninguna cobertura (desnudas) y finalmente se recubren con DEXTRAN. Los espectros de las ferritas de Mn y Ni son similares a estos en las diferentes etapas. En los tres espectros de la magnetita con diferentes recubrimientos se observa la coincidencia de las bandas próximas a 600 cm^{-1} correspondiente a la ligadura metal-oxígeno. Además, en la muestra desnuda no se observa la presencia de ninguna molécula orgánica, y las bandas del DEXTRAN pueden ser identificadas en el espectro restante conforme la referencia (Z Wang, 2014). Esto indica claramente que al final del proceso las partículas resultan recubiertas con DEXTRAN, consistente con el cambio de carácter de estas nanopartículas: de hidrofóbico a hidrofílico. El espectro de las partículas desnudas muestra claramente la ausencia de material orgánico, este resultado es muy importante, pues estas partículas serán las utilizadas para el estudio de la actividad catalítica.

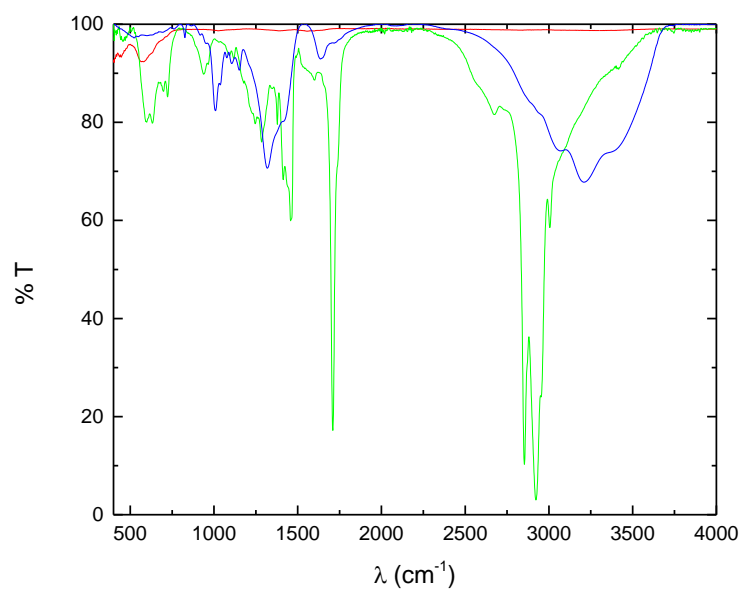


Figura 2-8. Espectro IR de NPs de Fe₃O₄ desnudas (-), con recubrimiento de ácido oleico (-) y DEXTRAN (-)

BIBLIOGRAFÍA

- AD Arelaro, E. L., et al. (2007). *Magn. Magn. Mater.* 320, e335-e338.
- Bragg., W. , et al. (1915). *Philosophical Magazine* 30 , 305-315.
- D. Wilson, M. L. , et al. (2014). *XPS analysis of oleylamine/oleic acid capped Fe₃O₄ nanoparticles as a function of temperature*. Elsevier.
- L Zhang, R. H.-C. , et al. (2006). *Applied Surface Science* 253 , 2611–2617.
- Lavorato G., L. J. (2014). Size effects in bimagnetic CoO / CoFe₂O₄ core/shell nanoparticles . *IOPScience*.
- ML Mojica Piscioti, E. L.-P. (2014). *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 102, 860-868.
- Moulder J., S. W. , et al. (1992). *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. Minnesota. United States of America: Perkin-Elmer Corporation.
- S Sun, H. Z. , et al. (2004). *Chemical Society* 126, 273-279.
- Toru Yamashita, P. H. , et al. (2007). *Analysis of XPS spectra of Fe²⁺ and Fe³⁺ ions in oxide materials*. Elsevier.
- Z Wang, J. Z. , et al. (2014). *RSC Adv.* 4 , 7483-7490.

Capítulo 3 ESPECTROSCOPIA EPR CON SPIN TRAPPING

3.1 Descripción de la técnica

La resonancia paramagnética electrónica (EPR) es una técnica espectroscópica donde un campo magnético oscilante induce transiciones entre los niveles de energía de un sistema paramagnético que se encuentra sometido a un campo externo \vec{H} . Para analizar el espectro de resonancia de un radical libre, consideremos el sistema más simple compuesto por un electrón desapareado ($s = \frac{1}{2}$) que interactúa con el campo externo \vec{H} . La interacción Zeeman produce un desdoblamiento de los niveles de energía del sistema debido al acople entre el momento magnético del electrón $g\mu_B S$ y \vec{H} , donde g es el factor giromagnético que para un electrón libre es de $g_e = 2,0023$, el magnetón de Bohr. El hamiltoniano \mathcal{H} que describe los niveles de energía de este sistema resulta:

$$\mathcal{H} = g \mu_B \vec{H} \cdot \vec{S} \quad (3-1)$$

Para producir una transición resonante se aplica, entonces, un campo magnético oscilante \vec{H}_1 perpendicular al campo externo (por ejemplo $\vec{H} = H_0 \hat{k}$ y $\vec{H}_1 = H_1 \cos \omega t \hat{i}$), cuya frecuencia $\nu = \frac{\omega}{2\pi}$ se encuentra en el rango de las microondas (1-100 GHz). La intensidad del campo de microondas es mucho más pequeña que la del campo estático y se considera una perturbación; por ejemplo en la resonancia $H_0 \sim 3000$ Oe y $H_1 \sim 1$ Oe. El campo perturbativo \vec{H}_1 induce transiciones cuando la energía de la radiación incidente coincide con la diferencia de energía de los niveles electrónicos con $\Delta m = \pm 1$, donde m corresponde a la proyección de espín. Esto ocurre cuando se cumple la condición de resonancia:

$$\hbar\omega = g \mu_B H_0 \quad (3-2)$$

En un experimento de EPR la frecuencia de resonancia está fija y se varía la amplitud del campo estático hasta que se satisface la condición **(0-2)**. Si además el spin electrónico \vec{S}_i interactúa con su núcleo o un núcleo vecino con un spin nuclear \vec{I} , ocurre un acople entre \vec{S} y \vec{I} , al hamiltoniano del sistema debe adicionarse un término correspondiente a la interacción hiperfina, siendo a_i la constante hiperfina.

$$\mathcal{H} = g \mu_B \vec{H} \cdot \vec{S} + \sum_i^N a_i \vec{S}_i \cdot \vec{I}_i \quad (3-3)$$

A partir del espectro de EPR se puede obtener información de las especies resonantes, de su entorno, y de los mecanismos de relajación del sistema. Los parámetros que caracterizan el espectro son: el campo magnético resonante H_R , el ancho de la línea de EPR ΔH y su intensidad I_{EPR} . El H_R corresponde al centro de la línea de resonancia y da información de la especie que resuena ya que está relacionado con el factor giromagnético g que depende de la configuración electrónica y de la disposición de los orbitales. El ancho de línea ΔH se ve gobernado por los mecanismos de relajación de los spines. El área total de la curva de absorción I_{EPR} es proporcional a la susceptibilidad magnética del sistema χ , cuando todos los iones paramagnéticos contribuyen a la resonancia.

$$I_{EPR} \propto V\chi = \frac{N g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{3k_B T} \quad (3-4)$$

donde V es el volumen de la muestra, N es el número total de espines, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura. Por una cuestión de sensibilidad, experimentalmente se trabaja con la derivada de la curva de absorción de energía, por lo tanto el área corresponde a la segunda integral del espectro que se mide. Si se cuenta con una muestra de referencia cuyos parámetros son bien conocidos, podemos independizarnos de las condiciones del espectrómetro y obtener los parámetros de una muestra incógnita $I_{EPR A}$:

$$\frac{I_{EPR A}}{I_{EPR 0}} = \frac{N_A g_A^2 S_A(S_A + 1)}{N_0 g_0^2 S_0(S_0 + 1)} \quad (3-5)$$

Por lo tanto, a partir del área de la curva de absorción podemos cuantificar el número de espines comparando el espectro con el de una muestra patrón.

3.2 Spin trapping

La espectroscopía por EPR es una técnica muy útil, sensible y precisa para la detección de RL. Sin embargo, debido a su alta reactividad, el tiempo de vida media de muchos radicales libres es muy corto comparado con los tiempos característicos del experimento de EPR y como consecuencia se dificulta su detección. Por esta razón se desarrollaron los *spin trapping*, moléculas diseñadas para aumentar la vida media de los RL las cuales permiten conseguir una concentración estacionaria adecuada para ser detectados.

El uso de los *spin trapping* amplió las posibilidades del uso del EPR en diversas ramas de la ciencia como química, biología, medicina y física. Básicamente, el *spin trapping*, que es diamagnético, reacciona con el RL paramagnético resultando en un estado oxidado paramagnético con un tiempo de vida media muchísimo más largo. Otra ventaja del uso de los *spin trapping* es que se obtiene un espectro EPR diferente dependiendo del radical libre con el que la molécula reacciona. Esta característica permite diferenciar la naturaleza de los RL generados en la reacción, información que no se obtiene a partir de otras técnicas de cuantificación de RL, como por ejemplo el uso de marcadores ópticos.

Para este trabajo se utilizó el *spin trapping* comercial 5,5-Dimetil-1-pirrolina N-oxido, por sus siglas DMPO, disuelto en Dimetil sulfóxido DMSO, **Figura 3-1**. Nótese la naturaleza asimétrica de su estructura. Los RL que se producen en una reacción interactúan con el DMPO rompiendo el doble enlace entre el nitrógeno N y el carbono en la posición β y forman un radical mucho más estable que puede ser detectado por EPR. Una ventaja que presenta la molécula de DMPO es que presenta diferentes espectros de EPR según el radical con el que reacciona. En este trabajo se lograron detectar diferentes radicales libres: radical oxhidrilo ($\cdot\text{OH}$), radical superóxido ($\cdot\text{OOH}$), radical metilo ($\cdot\text{CH}_3$) y un radical interactuante con nitrógeno debido a la presencia del disolvente DMSO. En la **Figura 3-3** se muestran la estructura molecular de los radicales formados en el DMPO.

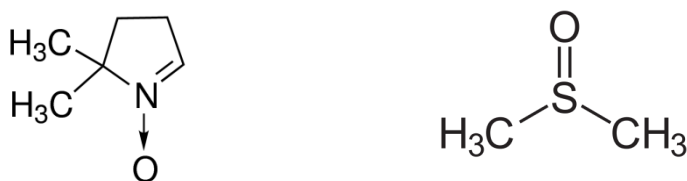


Figura 3-1. Estructura química del *spin trapping* DMPO (izquierda) y del disolvente DMSO (derecha).

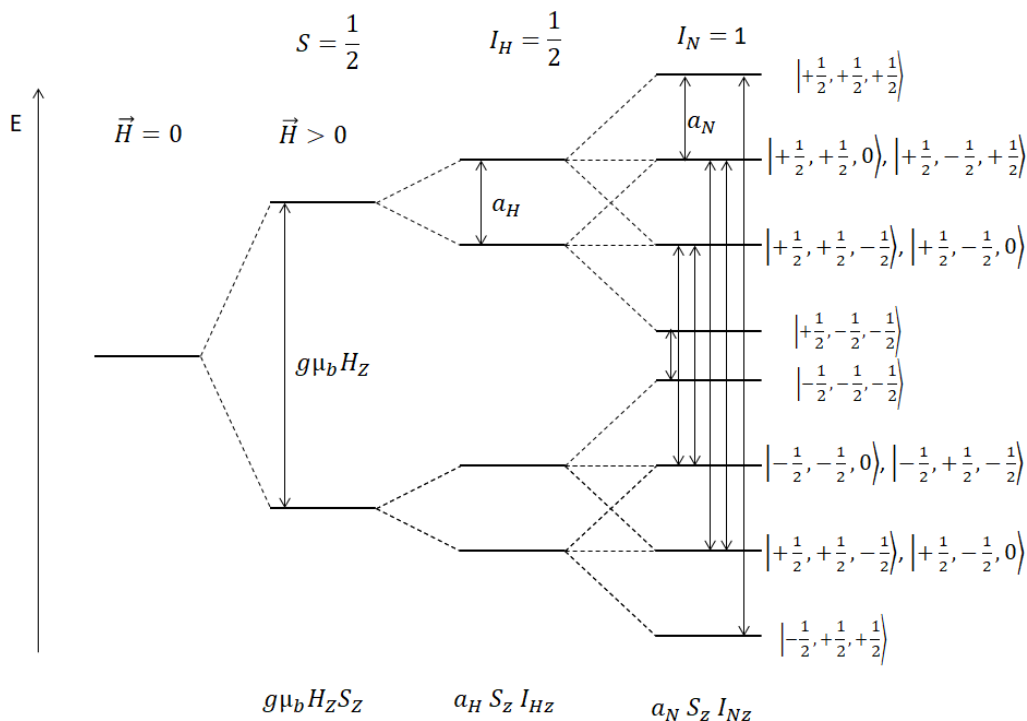


Figura 3-2. Esquema de niveles de energía para la interacción DMPO + $\cdot\text{OH}$, se considera dos constantes hiperfinas $a_H = a_N = 15 \text{ G}$. Las flechas indican las posibles transiciones según la regla de selección $\Delta s = 1$, $\Delta m = 0$. El gráfico no está a escala.

El electrón desapareado que se encuentra en los productos del DMPO, interactúa con los núcleos vecinos. Las constantes hiperfinas son diferentes para cada caso y se encuentran estandarizadas por el NIH de Estados Unidos (National Institute of Environmental Health Sciences) para cada producto. Por ejemplo, en el radical oxhidrilo ($\cdot\text{OH}$), el electrón libre interactúa con el spin nuclear del nitrógeno N ($I=1$) y del hidrógeno H_β ($I=1/2$). A partir de los valores tabulados para las constantes hiperfinas que describen la interacción del electrón desapareado con el N y el H_β , $a_N = 14,9 \text{ G}$ y $a_H = 14,9 \text{ G}$ respectivamente, se encuentran los niveles de energía, los cuales se esquematizan en la **Figura 3-2**. En la figura también se ilustran las transiciones permitidas. En este caso se espera observar 4 líneas de EPR con intensidad relativa 1:2:2:1, como se ilustra en la **Figura 3-3**. Al considerar otros radicales la estructura molecular del producto del DMPO es diferente (como se observa en la **Figura 3-3**) y por lo tanto las constantes hiperfinas son diferentes y también el espectro de EPR. Por ello, en el caso del radical $\text{CH}_3\cdot$ se espera observar un sexteto de líneas con intensidades relativas 1:1:1:1:1:1, aunque las mismas se produzcan por las interacciones del N y H_β , debido a que en este caso $a_N = 16,1 \text{ G}$ y

$a_H = 23,3 \text{ G}$. Para el $\cdot\text{OOH}$, se consideran 3 constantes hiperfinas $a_N = 14,1 \text{ G}$, $a_H = 11,4 \text{ G}$ y $a_H = 1,24 \text{ G}$, correspondiente al N, hidrógeno H_β e H_γ .

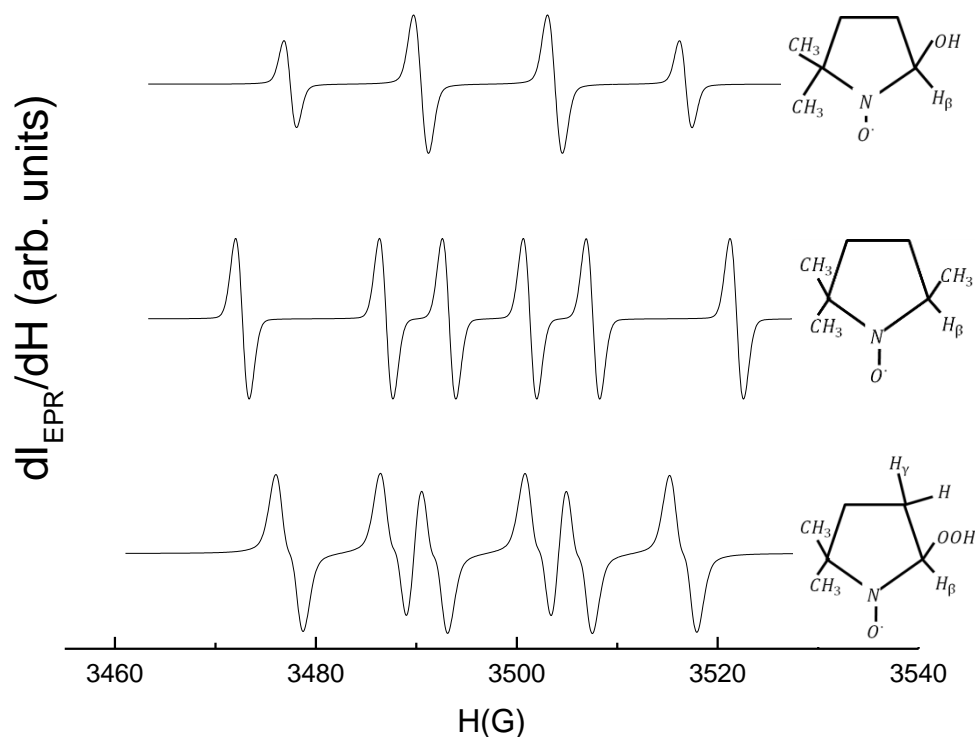


Figura 3-3. Espectros EPR de radical + DMPO. De arriba a abajo, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{CH}_3$ y $\cdot\text{OOH}$.

Además, el *spin trapping* utilizado tiene la característica de presentar un valor de estructura hiperfina del H_β menor a 20 G para radicales con oxígeno-centrado, y mayor o igual a 20 G para radicales carbono-centrado.

3.3 Parte experimental

Todos los espectros presentados en este capítulo fueron medidos en el resonador EPR del Laboratorio de Resonancias Magnéticas del Centro Atómico ELEXYS 500 utilizando el Generador de Microondas para la banda X ($\sim 9.4 \text{ GHz}$). Los espectros fueron ajustados con el programa XEPR de Bruker y todos los parámetros obtenidos son mostrados en el Anexo A. El equipamiento posee una configuración donde se utiliza un criostato de cuarzo con flujo controlado de nitrógeno para controlar la temperatura entre 100 K y 400 K.



Figura 3-4. Espectrómetro EPR marca Bruker modelo elexsys banda X.

3.3.1. Muestra patrón

Para poder cuantificar el número de moles de radicales formados en el volumen medido utilizamos un patrón que corresponde a un monocristal de MgO dopado con Mn^{2+} ($S=5/2$, $I=5/2$) con un número de espines conocido $N= 2,22 \times 10^{13}$ spins o 37 pMoles. El número de espines fue calculado a partir de mediciones de la susceptibilidad magnética del cristal patrón. El cristal utilizado como patrón es muy pequeño y puede ser considerado como una masa puntual, pero las muestras a medir tienen una dimensión finita, por lo que se debe tener en cuenta la atenuación de la señal con la distancia al centro dentro de la cavidad de EPR: la muestra líquida que contiene la producción de los radicales es relativamente grande (3 cm). Para corregir el área debemos tener en cuenta el factor de llenado FN, y así considerar toda la señal que aporta la muestra líquida macroscópica. Considerando el barrido espacial de la señal de Mn^{2+} puntual (tipo gaussiana) llegamos a

$$FN = 2 = \left(\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \right)^{-1} \text{ con } \sigma = 0,2. \quad (3-6)$$

Una vez realizada esta corrección las áreas de los espectros de EPR de los defectos pueden ser directamente comparada con el área de la resonancia del Mn^{2+} (3-5).

$$\frac{I_{EPR\ RADICAL}}{3I_{EPR\ Mn}} = \frac{N_{RAD}g_{RAD}^2S_{RAD}(S_{RAD} + 1)}{N_{Mn}g_{Mn}^2S_{Mn}(S_{Mn} + 1)} \quad (3-7)$$

Despejando

$$N_{RAD} = N_{Mn} \frac{g_{Mn}^2 S_{Mn} (S_{Mn} + 1)}{g_{RAD}^2 S_{RAD} (S_{RAD} + 1)} \frac{I_{EPR RADICAL}}{3 I_{EPR Mn}} \quad (3-8)$$

Considerando el g_{RAD} aproximadamente igual al g_{Mn} nos dará un número total de moles de radicales producidos en total. Además debemos considerar que tenemos un volumen de $94,2 \times 10^{-3}$ ml de solución en las muestras medidas, de esta manera podemos fácilmente deducir la concentración de radicales.

3.3.2. Preparación de las muestras

Se trabajó con los sistemas de NPs de óxidos de hierro: Fe_3O_4 , $MnFe_2O_4$ y $NiFe_2O_4$, fabricadas en el laboratorio de Resonancias Magnéticas. Las muestras que se obtienen de la síntesis resultan recubiertas con ácido oleico (muestras recién preparadas) y con DEXTRAN, muestras hidrofílicas y biocompatibles. Sin embargo, los estudios de producción de radicales fueron realizados en muestras “desnudas”, sin un recubrimiento superficial. Esta elección se puede justificar en términos fisiológicos porque estos compuestos en la superficie de las partículas tienen una ligación con la parte inorgánica con un carácter débil, siendo normalmente eliminado, durante el metabolismo celular una vez que las NPs son incorporadas a las células. Por otro lado se utilizaron las partículas desnudas para limitar el número de variables del problema, quedando solamente la composición del material inorgánico y eliminado la influencia del material orgánico de funcionalización de las nanopartículas.

Para remover el recubrimiento de ácido oleico de las muestras se siguió el procedimiento:

- 1° Se colocaron las NPs en tubo de ensayo, se agregó tolueno y se sonicó la muestra.
- 2° Se guardó en horno por 1 hora a $80^\circ C$, para evaporar el tolueno.
- 3° Se agregó etanol al tubo de ensayo y se continuó con el mismo proceso anterior, con la diferencia de que se dejó en horno toda la noche a $40^\circ C$.

Para realizar las mediciones en el equipo de EPR se utilizó un tubo de cuarzo con un diámetro interno de 1 mm que no produce señal. Para colocar las muestras se utilizaron

jeringas esterilizadas, asegurando un total de 30 mm de solución. La muestra patrón era posicionada en la parte externa del tubo a 15 mm del fondo del tubo.

Para emular los diferentes entornos celulares se utilizaron buffers de diferentes pH. El citoplasma, que generalmente ocupa el mayor volumen en la célula, tiene un pH neutro, por lo cual se utilizó para imitarlo un pH fosfato neutro (pH= 7). Los lisosomas debido a su tarea de digestión contienen una gran cantidad de ácidos que le proporcionan un pH entre 4-5. En este caso se utilizó un buffer de acetato con pH = 4,8.

Se utilizó agua oxigenada al 30% (Sigma-Aldrich), que es una sustancia tóxica y fotosensible. Como ya se mencionó se usó el *spin trapping* DMPO disuelto en DMSO.

Las proporciones utilizada para todas las muestras y el orden en que se colocaron en el tubo de ensayo es la siguiente:

- 1- 120 µg de NPs (Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 o NiFe_2O_4 desnudas)
- 2- 200 µl de buffer acetato (pH=4,8) o buffer neutro (pH=7)
- 3- 10 µl de agua oxigenada (H_2O_2)
- 4- 50 µl de DMPO/DMSO (1 gr DMPO/ 3 ml DMSO)

Para determinar la actividad catalítica de las nanopartículas se utilizaron soluciones de control idénticas a la descrita anteriormente pero sin la adición de las nanopartículas, denominadas muestras “blanco”.

Se utilizó una mayor cantidad de DMPO que H_2O_2 (5 veces más) para aumentar la probabilidad de recombinación.

Toda la preparación de las muestras se realizó bajo campana, a temperatura ambiente y con el equipamiento adecuado, debido a las sustancias utilizadas.

3.3.3. Resultados de la Formación de Radicales Libres por las NPs

Como el objetivo de esta tesis es determinar la actividad catalítica de sistemas de nanopartículas para futuros usos en experimentos *in vitro* de hipertermia de fluido magnético, los estudios de EPR se realizaron a 313K y a temperatura ambiente 295K. Estudios *in vitro* previos (M. L. Mojica Piscioti, 2015) indican que las nanopartículas hidrofílicas utilizadas en el Laboratorio de Resonancias Magnéticas tienden a estar retenidas en el lisosoma (NPs recubiertas con DEXTRAN) o a esparcirse por el citoplasma

(NPs recubiertas con PEG). Para emular estas dos condiciones se midió a pH=4,8 y pH=7,0.

Se obtuvieron una serie de espectros en función del tiempo de reacción, tomando como punto inicial el momento donde el H_2O_2 fue introducido en la solución. En la **Figura 3-5** se observa el espectro de la solución con Fe_3O_4 y una representación de las líneas esperadas y sus posiciones.

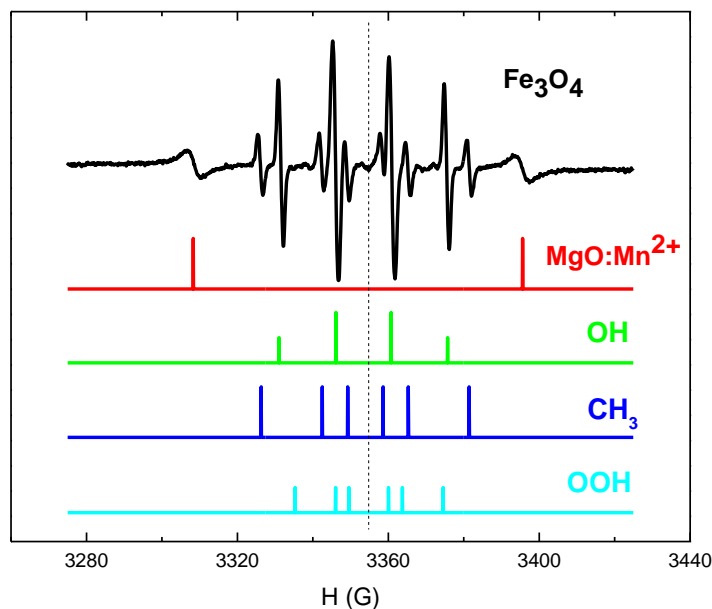


Figura 3-5. Espectro EPR de NPs de Fe_3O_4 , a los 60 min de reacción $T=313\text{K}$ y $\text{pH}=4,8$, junto con las líneas esperadas de cada radical.

En la **Figura 3-6**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los espectros correspondientes a las soluciones que contienen los tres sistemas de NPS medidos a pH 4,8 y 313 K después de 60 min, también se muestra el espectro correspondiente al blanco medido en las mismas condiciones. Como se ha mencionado anteriormente, los radicales formados fueron el $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OOH}$, $\cdot\text{CH}_3$ y un radical que se debe a la presencia del DMSO que interactúa solamente con el núcleo de nitrógeno. Por lo tanto, enfocándose en la actividad de las NPs, se ajustaron los espectros considerando las especies $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{CH}_3$ y $\cdot\text{OOH}$ para las tres muestras y para las muestras “blanco” los ajustes se muestran en la **Figura 3-6** con los correspondientes residuos obtenidos del fiteo de datos.

Como ya se ha mencionado, para la cuantificación se utilizó el monocristal de MgO dopado con Mn^{2+} ($S=5/2$, $I=5/2$), por ello en todos los espectros se observarán dos resonancias adicionales correspondientes a las dos líneas centrales del espectro del Mn^{2+} .

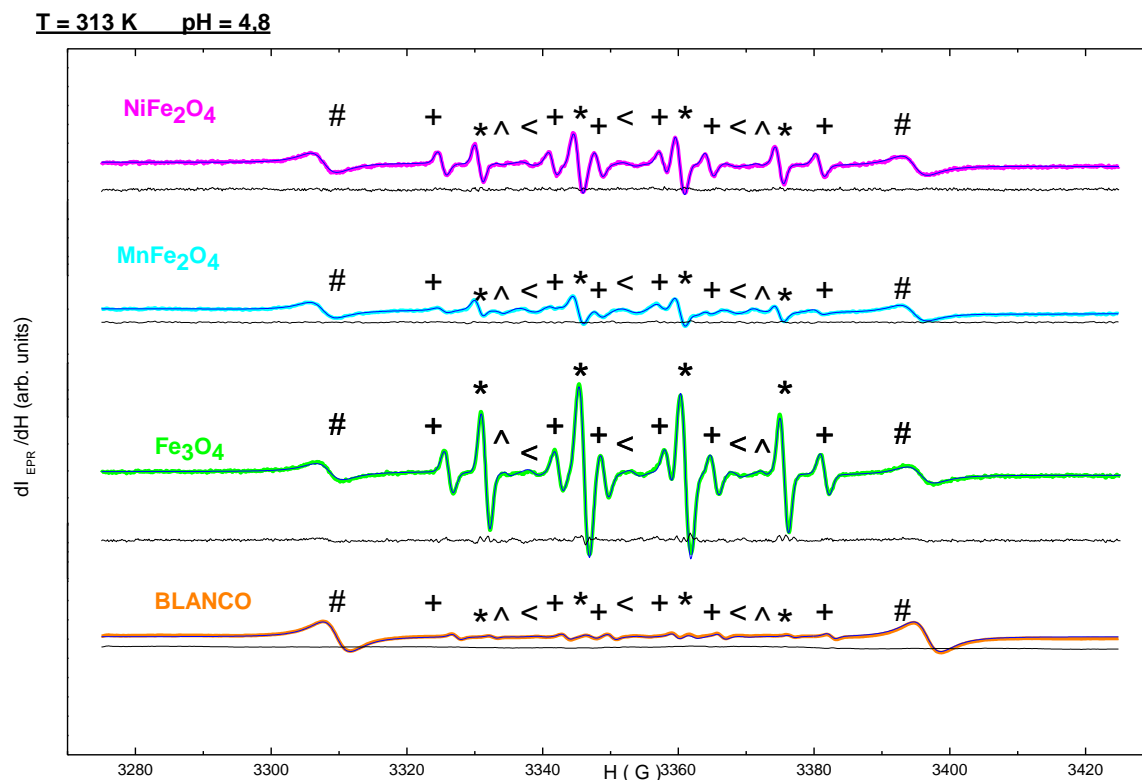


Figura 3-6. Espectro EPR, ajuste (-) y residuo (-), del blanco (sin NPs) y de los sistemas de NPs $NiFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$ y Fe_3O_4 , para $T=313K$ y $pH=4,8$, a los 60 minutos de reacción. Se marcan las líneas de los grupos radicales $\cdot OH$ (*), $\cdot CH_3$ (+), Mn^{2+} (#), $\cdot OOH$ (^) y el radical Nitrógeno de la interacción con el DMSO (<).

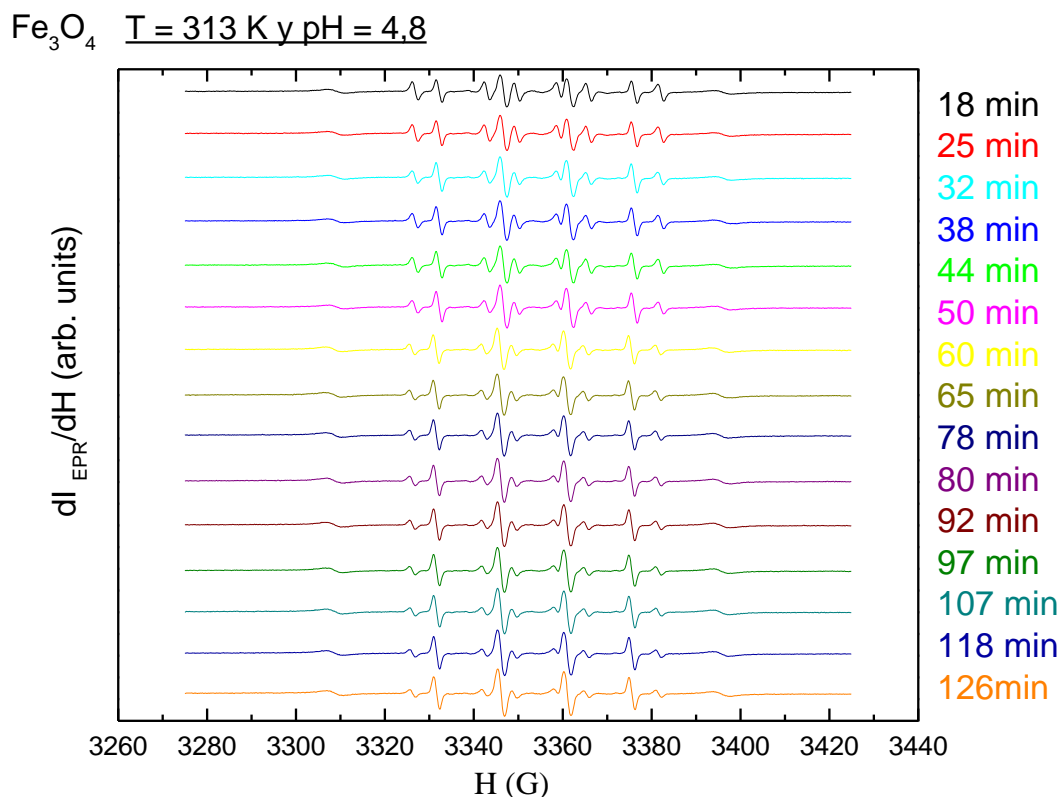


Figura 3-7. Evolución temporal de magnetita a $T=313\text{K}$ y $\text{pH}=4,8$.

Para conocer las concentraciones de los radicales se calcularon las áreas totales a partir de los ajustes de los espectros y se compararon con la muestra patrón. Éstos se grafican en la **Figura 3-8** se grafican la producción de los diferentes radicales formados en unidades de picoMoles. Se cuantificaron la generación de radicales formados en la muestra de control “blanco”. La **Figura 3-9** se grafica la concentración de radicales relativa a la muestra de control. Durante toda la medición se obtuvo un error experimental porcentual del 20% considerando los errores aleatorios introducidos principalmente durante la medición del volumen y la masa de las soluciones, además de los errores del ajuste y de la ubicación del cristal en la cavidad.

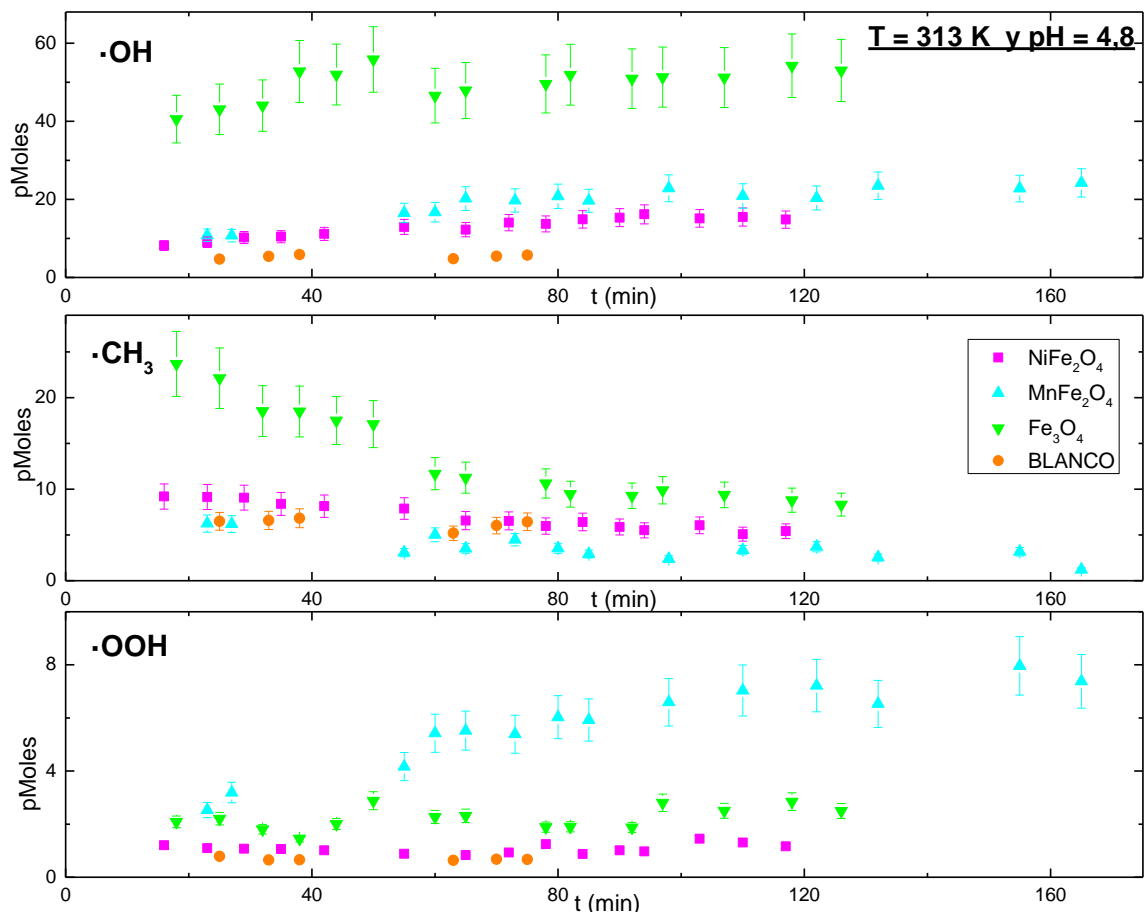


Figura 3-8. Concentraciones en picoMoles en función del tiempo de los radicales $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{CH}_3$ y $\cdot\text{OOH}$, para las NPs de Fe_3O_4 (∇), MnFe_2O_4 (\blacktriangle), NiFe_2O_4 (\blacksquare) y blanco (\bullet). A $T=313\text{K}$ y $\text{pH}=4.8$.

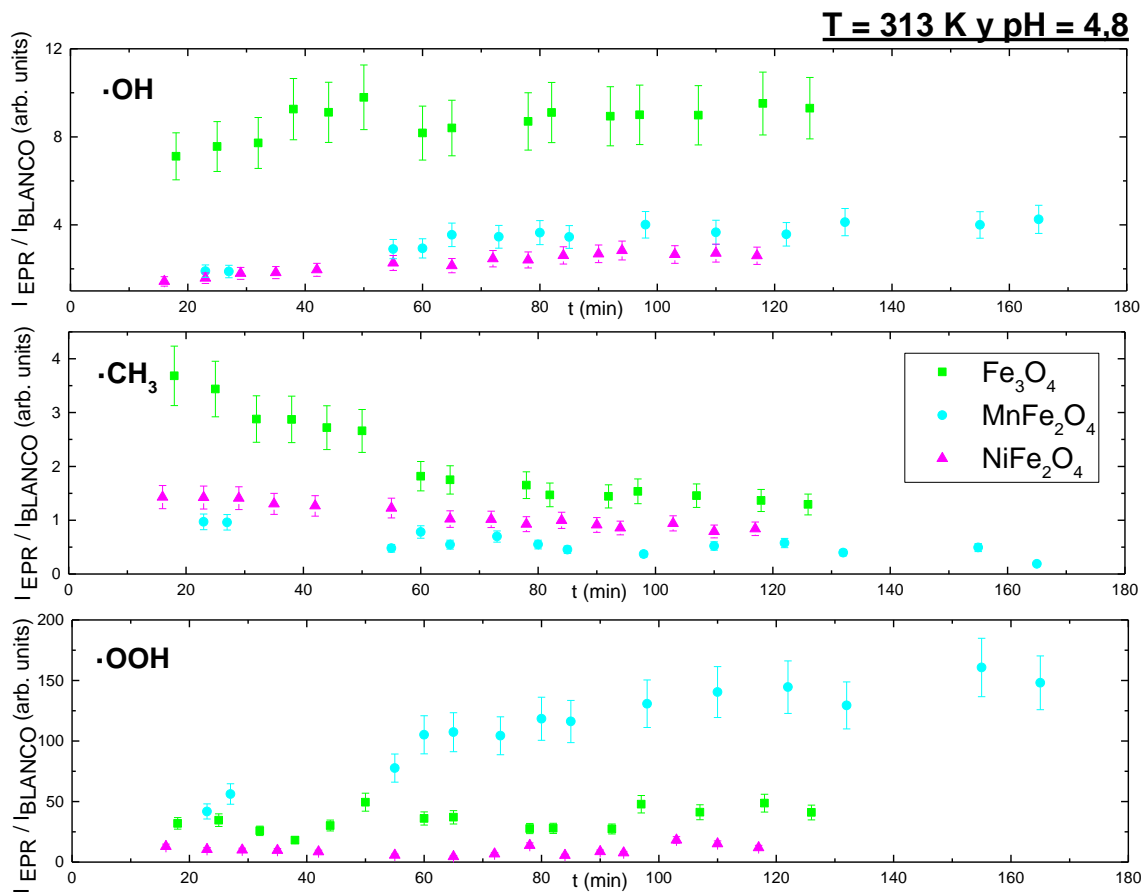


Figura 3-9. Concentraciones relativas a la concentraciones del blanco (sin NPs) en función del tiempo para $T=313K$ y $pH=4,8$, para NPs de Fe_3O_4 (■), $MnFe_2O_4$ (●) y $NiFe_2O_4$ (▲).

Para todos los casos se observó una dependencia temporal hasta un equilibrio en el cual la producción de los productos se mantiene constante. Para el radical oxhidrilo se observa un aumento de la concentración en función del tiempo para las tres muestras, a diferencia del radical metilo que tiene un comportamiento decreciente en todos los casos. La producción de superóxido se mantiene constante para Fe_3O_4 y $NiFe_2O_4$, pero presenta una dependencia creciente para las NPs de $MnFe_2O_4$, con una producción promedio de 20 pMoles alcanzada a los 110 min de reacción.

Para las NPs de Fe_3O_4 se presenta la mayor generación y concentración de radical $\cdot OH$, con una producción promedio de 50 pMoles alcanzada a los 40 minutos de la reacción; para el caso del radical metilo inicialmente presenta un máximo de concentración (25 pMoles) pero desciende rápidamente a 10 pMoles donde permanece constante. Las ferritas de $MnFe_2O_4$ presentan la peculiaridad de producir la mayor cantidad de radical

superóxido (8 pMoles) que las demás NPs. En el caso de las NPs de NiFe_2O_4 la producción de los 3 tipos de ROS no es dominante. En términos generales, todas las muestras presentan alguna actividad catalítica cuando se comparan con la muestra “blanco”, siendo mucho mayor la presentada por las NPs de Fe_3O_4 , con fuerte predominancia del radical $\cdot\text{OH}$, seguido por la muestra de MnFe_2O_4 y por último las NPs de NiFe_2O_4 . Un resultado interesante es la formación de superóxido en la Fe_3O_4 por arriba de la muestra “blanco” y especialmente la cantidad formada por la MnFe_2O_4 de este radical, debido a que su presencia no era predicha.

La producción del radical metilo ($\cdot\text{CH}_3$) se obtiene de la interacción de un grupo oxhidrilo con el solvente DMSO que luego reacciona con el *spin trapping*. La mayor producción del radical CH_3 es generada por las NPs de Fe_3O_4 . Por lo tanto, la producción total de oxhidrilo debe considerar ambas interacciones.

Un resultado que es importante remarcar es que durante las mediciones realizadas con las NPs de Fe_3O_4 la generación de radicales fue tan abrupta y de tal escala, que se observó una notable producción de burbujas en el tubo de cuarzo durante la reacción, un fenómeno que introdujo dificultades durante la medición. Otro ejemplo claro de la producción de ROS de estas NPs se presentó al preparar la solución a estudiar, la cual resultó exotérmica. Estos efectos no se observaron en las soluciones que contenían las NPs de MnFe_2O_4 o de NiFe_2O_4 indicando claramente que las NPs de Fe_3O_4 catalizan la reacción tipo peroxidasa en una mayor medida, observación que es consistente con la cuantificación de RL realizada a partir de los ajustes de los espectros.

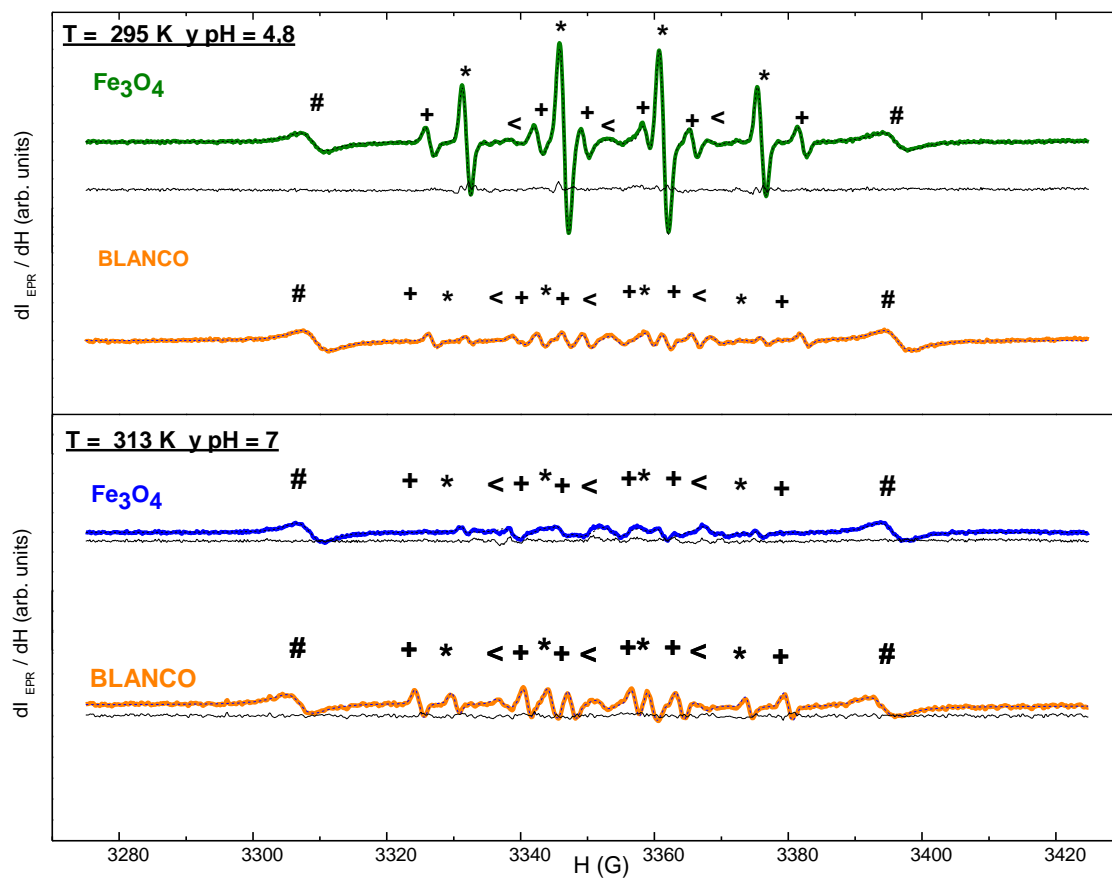


Figura 3-10. Espectro EPR, ajuste (··) y residuo (-) de NPs de Fe₃O₄ a T=295K y pH=4,8, y T=313K y pH=7, junto con sus respectivos blancos. Se marcan las líneas de los grupos radicales ·OH (*), ·CH₃ (+), Mn²⁺ (#) y el radical Nitrógeno de la interacción con el DMSO (<).

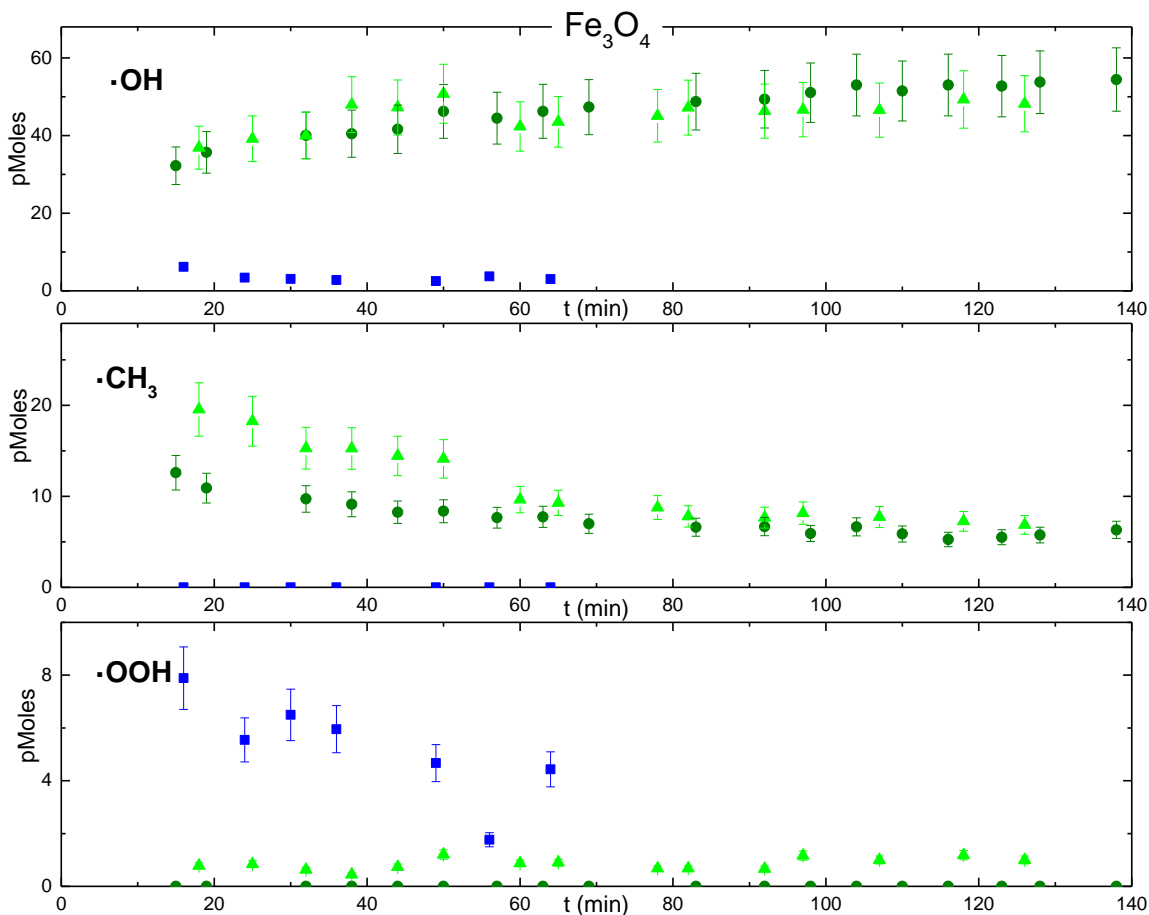


Figura 3-11. Concentraciones en pMoles de NPs de Fe_3O_4 para diferentes temperaturas y pH, para $T=313\text{K}$ y $\text{pH}=4,8$ (\blacktriangle), $T=295\text{K}$ y $\text{pH}=4,8$ (\bullet) y para $T=313\text{K}$ y $\text{pH}=7,0$ (\blacksquare).

Al cambiar el medio fisiológico, $\text{pH}=4,8$ y $\text{pH}=7,0$ (Figura 3-11), para las NPs de Fe_3O_4 , se observan comportamientos totalmente opuestos, la máxima producción de radicales oxhidrilos y metilos se presenta para el pH ácido, pero la máxima concentración de radicales superóxido (15 pMoles) ocurre inicialmente para el pH neutro. Para el caso de la variación con la temperatura no se observan cambios considerables.

Un resultado muy importante y novedoso que esta técnica introduce es la detección y cuantificación del radical superóxido ($\cdot\text{OOH}$), presente en todas las muestras de NPs.

Al comparar la concentración total de radical oxhidrilo producido en los diferentes sistemas de NPs, parecería indicarse que la acción catalítica aumenta con la concentración superficial del Fe^{2+} . Para confirmar esta hipótesis propusimos estudiar diferentes sistemas de NPs modificando el estado de oxidación superficial de los iones hierro. A continuación

se presentan resultados de EPR preliminares donde se comparan tres sistemas diferentes: i) las partículas Fe_3O_4 presentadas en la sección anterior ii) las mismas partículas sometidas a un proceso de oxidación utilizando agua y catalizando la reacción con una solución básica de NaOH a pH=12 por 24 horas y iii) NPs $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oxidadas naturalmente, ya que fueron fabricadas hace 12 años. Comparando los tres espectros EPR (**Figura 3-12**) de las diferentes magnetitas se observa una notable disminución del grupo de 4 líneas del oxidrilo y una reducción también del grupo metilo al disminuir la concentración de iones Fe^{2+} . En cambio, al observar con detalle las líneas correspondientes al superóxido se observa el comportamiento inverso, aunque la intensidad de estas resonancias presentan un área mucho menor. A pesar de que estos datos preliminares parecen confirmar la hipótesis de que la acción catalítica aumenta con la concentración de Fe^{2+} falta realizar un estudio sistemático, en función de la oxidación y morfología de las NPs para confirmar este resultado.

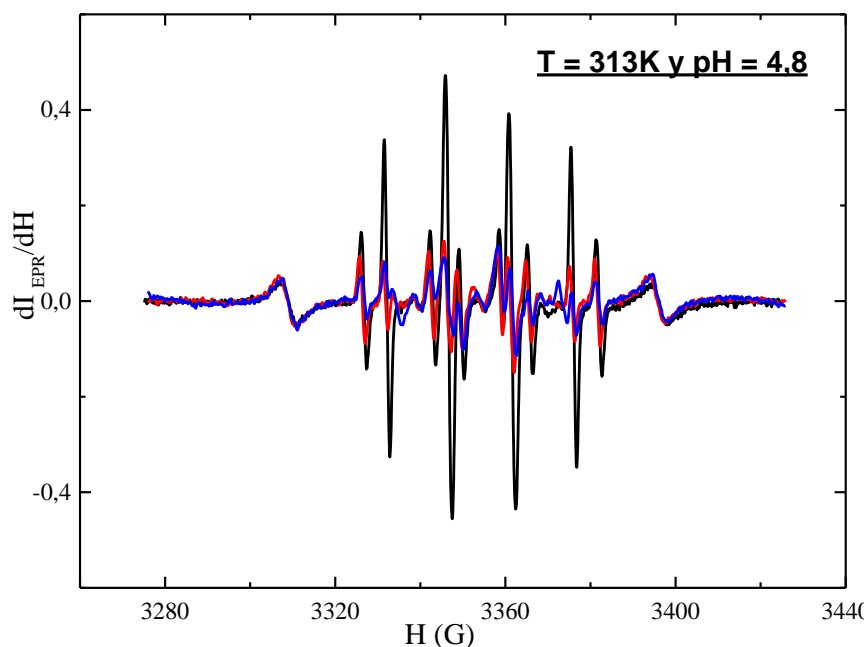


Figura 3-12. Espectro EPR de NPs de Fe_3O_4 (-), $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ (-) y Fe_3O_4 oxidado (-), a $T=313\text{K}$, $\text{pH}=4,8$ a los 45 minutos de reacción.

BIBLIOGRAFÍA

- Bruker. (s.f.). EPR Detection of the Superoxide Free Radical with the Nitron Spin Traps DMPO and BMPO. *Bruker BioSpin*.
- M. L. Mojica Piscioti, R. D. (2009). *Estudio del proceso de calentamiento de nanopartículas magnéticas con campos magnéticos AC para su utilización en tratamiento de tumores por hipertermia*. Argentina: Centro Atómico Bariloche.
- Services, N. I.-D. (s.f.). *National Institute of Environmental Health Sciences*. Recuperado el 2017, de <https://tools.niehs.nih.gov/stdb/index.cfm>

Capítulo 4 MAGNETISMO E HIPERTERMIA

4.1 Propiedades magnéticas

Para caracterizar magnéticamente las NPs de MeFe_2O_4 ($\text{Me} = \text{Fe}, \text{Ni}, \text{Mn}$), se realizaron medidas de magnetización en función de temperatura y campo aplicado. Para estas medidas las muestras recubiertas en ácido oleico, fueron dispersadas en tolueno y mezcladas en una solución con resina epoxi diluida también en tolueno. Una vez evaporado el solvente, las nanopartículas se encuentran dispersas en una matriz rígida, evitando la aglomeración entre las mismas y la rotación física de las nanopartículas en las medidas con campo aplicado.

Las curvas de magnetización en función de la temperatura medidas en los modos zero field cooling (ZFC) y field cooling (FC) fueron realizadas con un campo aplicado de 20 G (para las medidas y campo de FC) para las partículas de NiFe_2O_4 y MnFe_2O_4 , y 100 G para la Fe_3O_4 . Las mismas fueron medidas en el magnetómetro SQUID Quantum Design MPMS-5S del laboratorio de Bajas Temperaturas del Centro Atómico Bariloche, con una sensibilidad de 10^{-7} emu, y el rango de medición es de hasta 5 T en campo magnético, y de 1,4 a 300 K en temperatura.



Figura 4-1. Magnetómetro SQUID Quantum Design MPMS-5S.

La curvas ZFC y FC mostraron en términos generales comportamientos similares para las NPs de Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 y NiFe_2O_4 (**Figura 4-2**), conforme lo discutido en el

capítulo 1. Debido a que las NPs presentan una distribución de tamaños calculamos la distribución de temperaturas de bloqueo $f(T_B)$ a partir de las curvas ZFC y FC por medio de la expresión:

$$f(T_B) \propto \frac{1}{T} \frac{d(M_{ZFC} - M_{FC})}{dT} \quad (4-1)$$

donde el máximo valor corresponde a la temperatura de bloqueo más probable. Para las partículas de $MnFe_2O_4$ y $NiFe_2O_4$ se observa un pico bien definido de distribuciones de barreras de energía. Y para las NPs de Fe_3O_4 el valor más probable de T_B se identifica por un quiebre en la tendencia de la curva, ya que el pico está indefinido, probablemente debido al alto valor de campo aplicado con el que se realizó la medida y por el menor tamaño de estas nanopartículas. La distribución de temperaturas de bloqueo puede ser ajustada con una distribución log-normal con el programa Origin (**Figura 4-2**), como se puede ver en los respectivos gráficos. Para evidenciar la T_B en la muestra Fe_3O_4 , mostramos también los gráficos de $d(M_{ZFC} - M_{FC})/dT$ en la **Figura 4-2**, donde vemos de los ajustes que no hay grandes cambios en los valores medios de la temperatura de bloqueo ($\langle T_B \rangle$) con respecto a los ajustes anteriores. Como se esperaba, $\langle T_B \rangle$ crece a medida que el tamaño de las NPs aumenta.

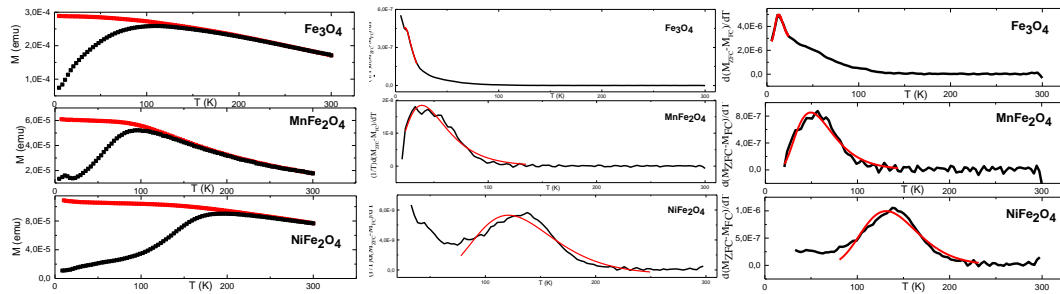


Figura 4-2. $M(T)$ medida en los modos FC(■) y ZFC(■) con campo de 20G, para las NPs de, $MnFe_2O_4$ ($\langle d \rangle = 12$ nm) y $NiFe_2O_4$ ($\langle d \rangle = 18$ nm), y de 100 G para las NPs de Fe_3O_4 ($\langle d \rangle = 10$ nm). Y distribución de temperatura de bloqueo con ajuste log-Normal.

Las curvas de magnetización normalizadas en función del campo se obtuvieron para todas las muestras a temperatura ambiente (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La ausencia de histéresis para las tres muestras a temperatura ambiente ($T \approx 293K$) coincide con el comportamiento superparamagnético predicho por las curvas de $M(T)$ (ZFC y FC) (**Figura 4-2**). Las mediciones fueron realizadas en un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) de la empresa Lakeshore modelo 7300 del Laboratorio de

Resonancias Magnéticas del CAB, la sensibilidad del equipo es de aproximadamente 10 μemu y las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente en un rango de ± 1 Tesla.

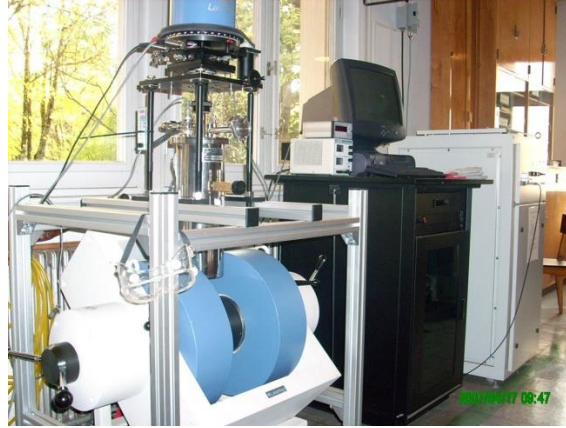


Figura 4-3. Magnetómetro de muestra vibrante (VSM), marca Lakeshore modelo 7300.

Para obtener directamente de las curvas de magnetización el valor de la magnetización de la saturación M_s sería necesario conocer de forma muy precisa el valor de la masa de material magnético medido. Para nuestras muestras esto no se puede lograr fácilmente por dos razones: primero, debido a la alta magnetización de las partículas, pequeñas cantidades de este material tuvieron que ser dispersadas en una matriz polimérica; y segundo, porque es difícil determinar el recubrimiento de masa de ácido oleico que presentan las NP. Sin embargo, analizando el comportamiento superparamagnético del sistema en estas temperaturas podemos determinar el momento magnético de esos sistemas. Un sistema superparamagnético tiene una respuesta de magnetización con campo aplicado dada por:

$$\frac{M}{M_s} = L(x) = \coth x - \frac{1}{x} \quad (4-2)$$

con $x = \frac{H\mu}{k_B T}$ siendo μ el momento magnético total de la partícula, $\mu = M_s V$. En un sistema real con una serie de componentes diamagnéticos y paramagnéticos, se debe adicionar a la curva de magnetización una variación lineal con el campo ($B.H$). Realizando este ajuste, suponiendo $\rho_{ferrita} = 5,3 \text{ g/cm}^3$, se encuentran los valores de M_s para las tres muestras, los cuales se observan en la **Tabla 4-1**. Como se esperaba la magnetita presenta el mayor valor de $M_s \sim 71 \text{ emu/g}$ comparado con las otras dos muestras y se encuentra entre los valores tabulados para la magnetita (92 emu/g) y la maghemita (60 emu/g). A continuación

se encuentra la ferrita de manganesio $M_S \sim 53 \text{ emu/g}$ y, por último, la ferrita de Ni presenta el menor valor de M_S con $\sim 25 \text{ emu/g}$. Como se mencionó en el capítulo 1, los valores de M_S definen junto con la potencia del campo aplicado la magnitud del SPA, ya que esta depende de la susceptibilidad inicial del sistema ($\chi \propto M_S^2 V$).

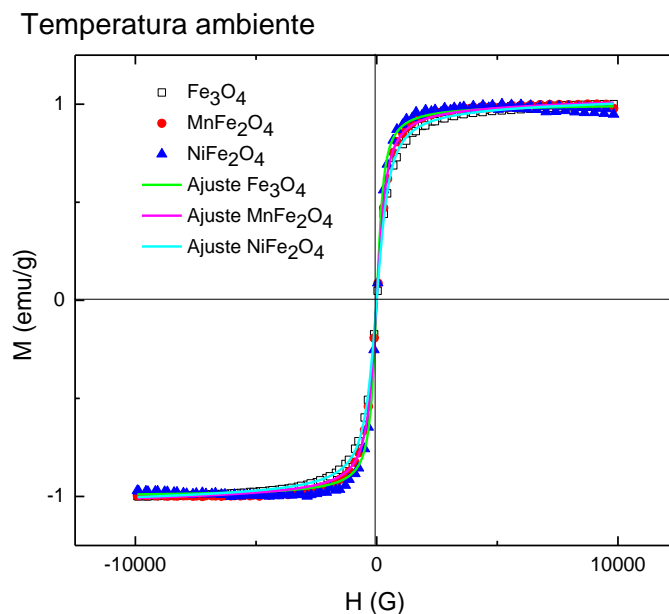


Figura 4-4. Magnetización en función del campo magnético H , medido a temperatura ambiente, para las muestras en polvo de Fe_3O_4 (\square), MnFe_2O_4 (\bullet) y NiFe_2O_4 (\blacktriangle); con sus respectivos ajustes.

Tabla 4-1. Diámetro promedio $\langle d \rangle$, temperatura de bloqueo promedio $\langle T_B \rangle$ y magnetización de saturación M_S para las muestras de Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 y NiFe_2O_4 .

MUESTRA	$\langle d \rangle$ (nm)	$\langle T_B \rangle$ (K)	M_S (emu/g)
Fe_3O_4	10,5	15	71
MnFe_2O_4	11,5	58	53
NiFe_2O_4	16,3	137	25

4.2 Hipertermia

Para estudiar el poder de calentamiento del sistema de NPs magnéticas, se realizarán experimentos en presencia de un campo magnético alterno. Estas mediciones fueron realizadas en el equipo DM1 nB Nanoscale Biomagnetics de la Universidad de Zaragoza, España, usando un campo magnético $H_0=200\text{G}$ para el rango de frecuencias entre 220-820

KHz. Para estas medidas, las nanopartículas recubiertas en ácido oleico fueron dispersas en hexano ($\eta = 0,003$ P), y las NPs recubiertas de DEXTRAN se dispersaron en agua ($\eta = 0,009$ P), en ambos casos con una concentración de 0.5 % wt. La tasa de calentamiento (Specific Power Absorption, SPA) fue medida en condiciones de distintas viscosidades y diámetros hidrodinámicos; de este modo es posible evaluar el mecanismo dominante en el experimento de hipertermia: relajación por Brown (donde la viscosidad y diámetro hidrodinámico son dominantes) o la relajación por Néel (donde $K_{\text{eff}}V$ domina). Cabe destacar que los sistemas de NPs tienen distintos valores de $K_{\text{eff}}V$, como se observó del cambio en $\langle T_B \rangle$.

La variación de la temperatura en función del tiempo para los diferentes sistemas se observa en la **Figura 4-5**, todos los gráficos presentan un tiempo inicial en el que el equipo estabiliza la frecuencia con un campo muy pequeño ($H_0=2$ G).

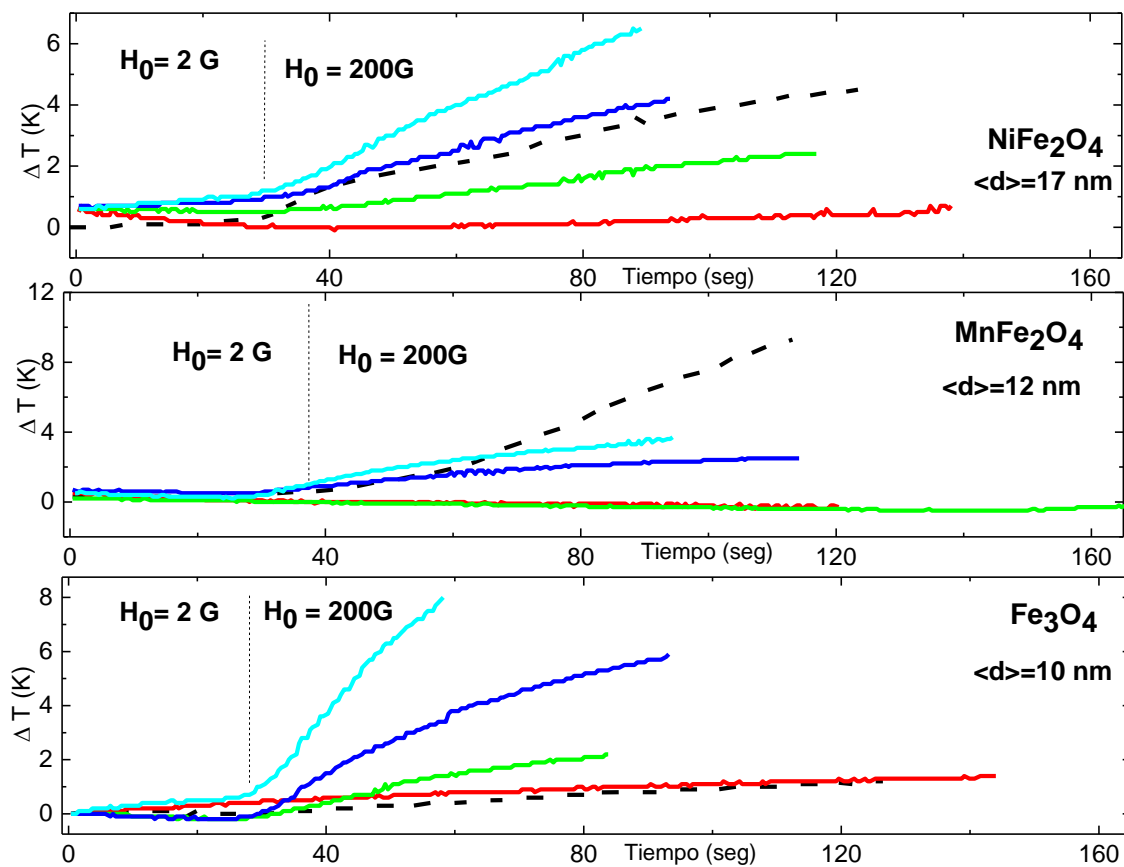


Figura 4-5. ΔT en función del tiempo (segundos) con un campo aplicado de $H_0=200$ G, para los sistemas Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 y NiFe_2O_4 recubiertas con ác. oleico en hexano a 228KHz(-), 350KHz(-), 570KHz(-) y 817KHz(-), y para las suspensiones recubiertas en DEXTRAN en agua a 570kHz(- -).

De la **Figura 4-5** se observa que no todas las NPs calientan, una dependencia con la frecuencia, y no se presenta una dependencia lineal con el tamaño de la NPs. En todos los casos la mayor variación de temperatura se obtiene para las frecuencias altas (817KHz), siendo el sistema Fe_3O_4 el que obtiene una mayor ΔT , que para 817KHz llega a 8K a los 60 segundos. Al variar el medio, se observa un descenso pronunciado en la producción de calor para el sistema Fe_3O_4 , por lo que se puede argumentar que la generación de calor para este sistema se debe tanto a la relajación de Néel como a la de Brown. Cuando el sistema presenta baja viscosidad (NPs diluidas en hexano) con un diámetro hidrodinámico menor (NPs recubiertas con ácido oleico) los tiempos de Brown y Néel son equiparables llevando a un tiempo de relajación efectivo menor que los dos. En cambio, cuando aumentamos el valor de la viscosidad y del radio hidrodinámico (NPs con recubrimiento de DEXTRAN diluidas en agua), el tiempo de Brown crece significativamente, y como consecuencia la relajación de Néel es la que gobierna el proceso de calentamiento (E Lima Jr., 2014). Este comportamiento es el esperado para nanopartículas de Fe_3O_4 con estos diámetros (E Lima, 2015). En cambio para los sistemas NiFe_2O_4 y MnFe_2O_4 , no se observan grandes variaciones cuando se cambian las condiciones de viscosidad y radio hidrodinámico, indicando fuertemente que estos sistemas calientan principalmente debido a las pérdidas magnéticas promovidas por el mecanismo de relajación de Néel en todas las condiciones analizadas.

Para caracterizar la eficiencia de calentamiento de las suspensiones coloidales magnéticas se calcula el poder específico de absorción a partir de la relación (1-18). Para disminuir el error se ajusta la primera porción de cada curva con una recta, donde se está más próximo a la condición adiabática deseada. Estos resultados son mostrados en la **Figura 4-6**.

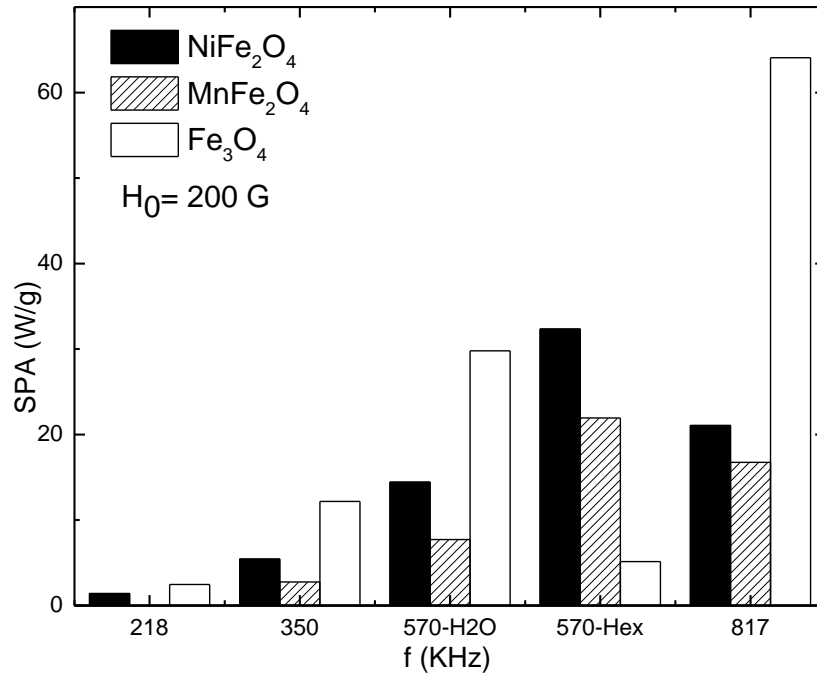


Figura 4-6. SPA en función de la frecuencia para las partículas en H_2O y Hexano.

Además de lo mencionado anteriormente con respecto al cambio de viscosidad, radio hidrodinámico y de $K_{\text{eff}}V$, otra característica interesante que se observa en la **Figura 4-6** es que el SPA crece siempre con la frecuencia en el rango medido, indicando que el tiempo efectivo de relajación para este sistema es aún más rápido que el período de las frecuencias utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- E Lima Jr., E. D. (2014). “Relaxation time diagram for identifying heat generation mechanisms in magnetic fluid hyperthermia” . *J. Nanopart Res* 16.
- E Lima, T. T. (2015). “Size dependence of the magnetic relaxation and specific power absorption in iron oxide nanoparticles” . *J Nanopart Res* 15.

Capítulo 5 CONCLUSIONES

El principal objetivo de esta tesis fue estudiar la actividad tipo peroxidasa de las nanopartículas de óxido de hierro Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 y NiFe_2O_4 . Para ello se realizaron medidas en un espectrómetro EPR con el uso del *spin trapping* comercial DMPO. La técnica empleada es muy sensible, precisa, repetible y necesita poca muestra para la detección.

Las NPs utilizadas fueron caracterizadas por microscopia TEM, y con el análisis de las imágenes se obtuvo la distribución de diámetros de las NPs cuyos valores promedios son: 10,5 nm para las NPs de Fe_3O_4 , 11,5 nm para MnFe_2O_4 y los dos picos 14,4 nm y 17,8 nm para NiFe_2O_4 .

A partir de la suspensión coloidal de las nanopartículas sin ningún recubrimiento en la solución de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), buffer acetato pH =4,8 y el *spin trapping* comercial DMPO, a temperatura constante de 313K, se obtuvieron los espectros EPR de los diferentes radicales libres formados y la respectiva evolución temporal de las reacciones. Una ventaja del uso del *spin trapping* es que presenta un espectro EPR diferente según el radical libre que atrapa debido a que el electrón desapareado del RL tiene una constante de interacción hiperfina diferente con los núcleos vecinos. Este hecho permite caracterizar los picos obtenidos del espectro EPR e identificar los productos formados en la reacción, que se encuentran estandarizados en la bibliografía. En todas las muestras se detectaron los radicales oxhidrilo ($\cdot\text{OH}$), metilo ($\cdot\text{CH}_3$) y superóxido ($\cdot\text{OOH}$). Del ajuste de los espectros con el uso del programa Bruker XEPR, se obtuvo las correspondientes áreas de cada radical y, comparando con una muestra patrón se obtuvieron las concentraciones de los mismos.

La evolución temporal de las concentraciones de todos los radicales en todas las muestras varía hasta alcanzar un equilibrio de producción. El radical oxhidrilo presentó una dependencia creciente, mientras que el radical metilo una disminución en función del tiempo. La producción de superóxido se mantiene constante para Fe_3O_4 y NiFe_2O_4 , pero presenta una dependencia exponencial creciente para las NPs de MnFe_2O_4 .

Para cuantificar la producción de radicales libres se compararon las muestras con un cristal patrón de MgO dopado con Mn^{2+} . Para ello, todas las muestras fueron medidas en forma simultánea con el cristal patrón adosado al capilar de cuarzo a la misma altura.

Conocido el número de spines o moles presentes en el cristal, se realizó un análisis comparativo, obteniendo el número de spines o moles en cada radical.

De las especies reactivas del oxígeno (ROS) la más peligrosa es el radical $\cdot\text{OH}$ debido a que no presenta una enzima antioxidante específica que la controle, y el más dañino es el radical $\cdot\text{OOH}$. A partir de la **Figura 3-8** se observa que la mayor generación y concentración de radical $\cdot\text{OH}$, con una producción promedio de 50 pMoles alcanzada a los 40 minutos de la reacción, es para las NPs de Fe_3O_4 y, el mayor productor de radical $\cdot\text{OOH}$ son las magnetitas de MnFe_2O_4 con un máximo de 8 pMoles. La generación de los ROS fue mínima para las NPs de NiFe_2O_4 .

Si se compara la producción de radicales de las NPs con la producción normal del sistema sin NPs (blanco), se observa que todas las muestras presentan alguna actividad catalítica. Sin embargo, la magnetita es la que produce la mayor concentración del radical $\cdot\text{OH}$, aumentando hasta 10 veces la concentración de radicales respecto al blanco. Es importante destacar que a partir de este análisis relativo se aprecia la formación de superóxido en la Fe_3O_4 y una gran cantidad también para las NPs de MnFe_2O_4 que llegan a producir hasta 150 veces más radicales relativo al blanco, pero que mantienen su valor absoluto bajo llegando a 8 pMoles.

Se estudió la dependencia de la actividad catalítica con su entorno variando la temperatura y el pH de las NPs de Fe_3O_4 . Al variar el pH del medio fisiológico, $\text{pH}=4,8$ y $\text{pH}=7,0$ a $T=313\text{K}$ fija, se observaron comportamientos opuestos, una mayor producción de radicales oxhidrilo y metilo a pH ácido, pero se obtuvo un máximo de radical superóxido a pH neutro. No se observaron cambios significativos al variar la temperatura.

Se estudiaron las propiedades magnéticas del sistema de NPs de óxido de hierro, observando la variación de la magnetización en función de temperatura y campo aplicado. Utilizando el magnetómetro SQUID se realizaron las curvas de magnetización en función de la temperatura medidas en los modos zero field cooling (ZFC) y field cooling (FC), con un campo aplicado de 20 G para las partículas de NiFe_2O_4 y MnFe_2O_4 , y 100 G para la Fe_3O_4 . Se obtuvo la distribución de la $\langle T_B \rangle$ para los tres sistemas, la cual aumenta en función del diámetro de las nanopartículas. A partir de las curvas de magnetización en función del campo, se obtuvo el valor de la magnetización de saturación para los tres

sistemas, cuyo valor fue máximo para la magnetita $M_S \sim 71 \text{ emu/g}$, seguido por MnFe_2O_4 $M_S \sim 53 \text{ emu/g}$ y por último NiFe_2O_4 $M_S \sim 25 \text{ emu/g}$.

Finalmente se estudió la producción de calor de los sistemas de NPs magnéticas. Para ello se realizaron experimentos en presencia de un campo magnético alterno, con un campo aplicado de $H_0 = 200 \text{ G}$ para el rango de frecuencias entre 220-820 KHz. No se observa una dependencia lineal entre la variación de temperatura y el diámetro de las NPs. Todas las NPs calientan siendo el sistema Fe_3O_4 la que obtiene una mayor ΔT , que alcanza 8K a los 60 segundos cuando la medición se realiza aplicando 817 KHz. Se observa que para este sistema de NPs la producción de calor depende de la viscosidad del medio, por lo que la generación de calor se debe tanto a la relajación de Néel como a la de Brown. Este comportamiento no se observa para el caso de las NPs de MnFe_2O_4 y NiFe_2O_4 , indicando que los sistemas calientan principalmente por el mecanismo de relajación de Néel. Se calculó el poder específico de absorción SPA, caracterizando la eficiencia de calentamiento de las suspensiones coloidales magnéticas. El mayor valor de SPA se obtuvo para las frecuencias altas de 817 KHz en cada sistema.

A partir del análisis realizado se propone que el principal catalizador del radical oxhidrilo es el Fe^{2+} ubicado en la superficie de las NPs. Para confirmar esta hipótesis se realizaron medidas preliminares en diferentes muestras de NPs variando la concentración de Fe^{2+} superficial. Éstos sistemas fueron preparados a partir de la oxidación de los mismos se midieron dos sistemas: el primero compuesto por NPs de hematita oxidadas naturalmente (producidas hace 12 años) el segundo oxidado artificialmente (con agua y catalizada en medio alcalino de $\text{pH}=12$) y se compararon los resultados con los obtenidos para las partículas “frescas” estudiadas en esta tesis. A partir de los espectros EPR se observa una gran disminución de la intensidad de las líneas de EPR correspondientes al radical $\cdot\text{OH}$. Este resultado preliminar abre las puertas a un nuevo tema de investigación de gran interés ya que posibilitaría un mecanismo de control para la producción de RL a partir de la oxidación controlada de las NPs magnéticas.

Finalmente queremos destacar que la producción de radicales libres es un proceso natural y conocido en los organismos vivos, incluso algunas enzimas presentan Fe^{2+} o Fe^{3+} para realizar su trabajo de síntesis. Por lo tanto, si conocemos la concentración de radicales libres que producen daño en la célula, y si utilizando NPs magnéticas podemos controlar la

producción de los mismos y su toxicidad, aumentaría enormemente la posibilidad de aplicación de NPs magnéticas, tanto para producir muerte celular en terapias oncológicas como para disminuir los efectos dañinos en MRI o intervenciones oftalmológicas.

Tablas de ajuste de Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica.

A los espectros obtenidos por EPR se les restó una línea de base de tercer orden correspondiente al background de la cavidad resonante, estas curvas se ajustaron con el programa Bruker XEPR. Del análisis se obtienen los parámetros: constante hiperfina (HFS) de cada radical, la constante giromagnética g , ancho de curva ΔH , forma de la curva (LS) ya sea totalmente lorentziana o gaussiana por lo que este valor varía de 1 a 0 y el área A.

Patrón MgO: Mn²⁺

	Mn
HFS	87.8
g	2.0032
ΔH	4.288
LS	0
A	7.1

Nanopartículas de Fe₃O₄, T = 313K y buffer acetato pH = 4,8.

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.013	14.87	16.20	14.4	14.82
	HFS:H _{β} (I=1/2)		14.16	22.86	10.4	
	HFS:H _{γ} (I=1/2)				1.4	
18 min	g	2.0034	2.0024	2.0023	2.0022	2.0024
	ΔH	4.019	1.27	1.30	1.52	2.15
	LS	0	0.94	0.80	0.64	1
	A	4.85	2.89	3.27	0.57	0.322

Tiempo	Mn	OH	CH3	OOH	N
--------	----	----	-----	-----	---

de reacción	HFS: N(I=1)	87.013	14.87	16.20	14.4	14.82
	HFS:H _β (I=1/2)		14.16	22.86	10.4	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.4	
25 min	g	2.0034	2.0024	2.0023	2.0022	2.0024
	ΔH	4.02	1.27	1.30	1.52	2.15
	LS	0	0.94	0.80	0.64	1
	A	4.85	2.89	3.27	0.57	0.322

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.87	16.21	14.23	14.79
	HFS:H _β (I=1/2)		14.16	22.86	10.61	
32 min	HFS:H _γ (I=1/2)				1.27	
	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0023	2.0024
	ΔH	3.97	1.28	1.32	1.16	1.80
	LS	0	0.98	0.82	0.45	1
	A	4.90	3.17	2.58	0.46	0.16

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.06	14.88	16.22	14.3	15.02
	HFS:H _β (I=1/2)		14.15	22.87	10.2	
38 min	HFS:H _γ (I=1/2)				1.64	
	g	2.0036	2.0024	2.0023	2.0022	2.0024
	ΔH	3.97	1.27	1.30	1.41	2.25
	LS	0	0.93	0.80	1	1
	A	4.81	3.73	2.53	0.32	0.22

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.06	14.87	16.22	14.3	15.02
	HFS:H _β (I=1/2)		14.14	22.87	10.2	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.64	
44 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0021
	ΔH	3.91	1.28	1.32	1.07	1.89
	LS	0	0.97	0.79	0.19	1
	A	4.66	3.56	2.32	0.51	0.14

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.97	14.88	16.23	14.4	15.02
	HFS:H _β (I=1/2)		14.16	22.86	10.34	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.38	
50 min	g	2.0034	2.0024	2.0023	2.0023	2.0024
	ΔH	3.85	1.28	1.31	1.28	2.17
	LS	0	0.97	0.79	0.02	1
	A	4.57	3.76	2.23	0.86	0.18

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.00	14.88	16.23	14.30	14.92
	HFS:H _β (I=1/2)		14.18	22.89	10.54	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.32	
60 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.95	1.28	1.33	1.17	1.73
	LS	0	0.98	0.87	0.34	1
	A	5.0	3.42	1.66	0.66	0.15

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.88	16.24	14.28	15.00
	HFS:H _β (I=1/2)		14.16	22.86	10.55	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.29	
65 min	G	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	4.039	1.29	1.32	1.16	1.90
	LS	0	0.98	0.86	0	1
	A	5.0	3.52	1.60	0.67	0.10

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.87	16.23	14.20	15.00
	HFS:H _β (I=1/2)		14.18	22.87	10.5	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.29	
78 min	g	2.0033	2.0024	2.0022	2.0023	2.0025
	ΔH	3.96	1.28	1.32	1.28	1.97
	LS	0	0.95	0.86	0.67	1
	A	5.2	3.79	1.57	0.53	0.10

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.04	14.88	16.23	14.29	15.12
	HFS:H _β (I=1/2)		14.17	22.87	10.46	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.35	
80 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0023	2.0024
	ΔH	3.93	1.29	1.33	1.23	1.88
	LS	0	0.96	0.88	0.74	1
	A	5.2	3.97	1.40	0.53	0.10

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.04	14.88	16.23	14.29	15.12
	HFS:H _β (I=1/2)		14.17	22.87	10.46	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.35	
92 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0023	2.0024
	ΔH	3.93	1.29	1.33	1.23	1.88
	LS	0	0.96	0.88	0.74	1
	A	5.3	3.97	1.40	0.53	0.10

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.88	16.24	14.25	15.51
	HFS:H _β (I=1/2)		14.17	22.87	10.43	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.33	
97 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.90	1.29	1.32	1.22	2.41
	LS	0	0.96	0.82	0	1
	A	5.3	4	1.49	0.92	0.15

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.88	16.24	14.27	15.34
	HFS:H _β (I=1/2)		14.16	22.87	14.46	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.27	
107 min	g	2.0033	2.0024	2.0022	2.0024	2.0024
	ΔH	3.93	1.30	1.34	1.22	2.27
	LS	0	0.97	0.83	0.36	1
	A	5.4	4.07	1.44	0.81	0.15

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.88	16.24	14.28	15.34
	HFS:H _β (I=1/2)		14.16	22.87	10.44	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.34	
118 min	g	2.0033	2.0024	2.0022	2.0024	2.0024
	ΔH	3.93	1.30	1.34	1.23	2.25
	LS	0	0.97	0.83	0	1
	A	5.4	4.31	1.35	0.96	0.14

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.88	16.24	14.28	15.37
	HFS:H _β (I=1/2)		14.17	22.88	10.46	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.32	
126 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0023
	ΔH	3.88	1.30	1.35	1.24	2.14
	LS	0	0.96	0.85	0.44	1
	A	5.4	4.21	1.28	0.81	0.13

Nanopartículas de MnFe₂O₄, T = 313K y buffer acetato pH = 4,8.

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.89	14.927	16.25	14.40	14.75
	HFS:H _β (I=1/2)		14.375	22.93	10.70	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.43	
23 min	g	2.0031	2.0023	2.0021	2.0023	2.0022
	ΔH	3.99	1.32	1.49	1.26	2.06
	LS	0.064	0.78	0.63	0	1
	A	5.433	0.8638	0.9647	0.8291	0.2964

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.92	14.90	16.21	14.24	14.77
	HFS:H _β (I=1/2)		14.30	22.91	10.80	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.46	
25 min	g	2.00312	2.0023	2.0021	2.0023	2.0022
	ΔH	4.08	1.30	1.38	0.99	2.02065
	LS	0	1	0.81	0	1
	A	6.588	0.455	1.21	0.086	0.282

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.89	14.93	16.25	14.41	14.75
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	22.94	10.70	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.43	
27 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	2.0023	2.0022
	ΔH	3.99	1.32	1.49	1.2622	2.06
	LS	0.06	0.78	0.63	0	1
	A	5.43	0.86	0.96	0.8291	0.2964

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.04	14.94	16.23	14.40	14.89
	HFS:H _β (I=1/2)		14.35	23.00	10.63	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.36	
55 min	g	2.0032	2.0022	2.0021	2.0023	2.0022
	ΔH	4.09	1.40	1.65	1.52	2.75
	LS	0.07	0.65	0.72	0	1
	A	4.938	1.2	0.43	1.4	0.33

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.022	14.93	16.20	14.33	14.90
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	22.95	10.68	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.41	
60 min	g	2.0032	2.002	2.0021	2.0023	2.0022
	ΔH	3.89	1.40	1.60	1.74	2.84
	LS	0	0.63	0.16	0	1
	A	4.68	1.15	0.67	1.80	0.37

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.04	14.92	16.27	14.40	14.98
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.00	10.49	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.34	
65 min	g	2.0032	2.0022	2.0021	2.0023	2.0023
	ΔH	3.87	1.45	1.70	1.65	2.81
	LS	0	0.55	0.60	0	0.56
	A	4.55	1.35	0.45	1.78	0.70

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.05	14.93	16.25	14.41	15.06
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	22.98	10.56	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.36	
73 min	g	2.0032	2.0022	2.0021	2.0023	2.0023
	ΔH	3.89	1.48	1.70	1.69	3.50
	LS	0	0.57	0.24	0.21	1
	A	4.73	1.37	0.60	1.80	0.50

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
80 min	HFS: N(I=1)	87.07	14.94	16.30	14.44	15.13
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	23.13	10.49	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.33	
	g	2.0032	2.0022	2.0021	2.0023	2.0023
	ΔH	3.90	1.48	1.51	1.67	3.45
	LS	0	0.50	0	0.02	1
	A	4.65	1.42	0.47	2.01	0.51
Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
85 min	HFS: N(I=1)	87.06	14.94	16.30	14.44	15.13
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	23.14	10.49	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.33	
	g	20032	2.0022	2.0021	2.0023	2.0023
	ΔH	3.91	1.45	1.59	1.67	3.27
	LS	0	0.46	0.26	0	1
	A	4.78	1.38	0.40	2.03	0.42
Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
98 min	HFS: N(I=1)	87.02	14.92	16.34	14.39	15.15
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	23.00	14.49	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.335	
	g	2.0032	2.0022	2.00021	2.0023	2.0023
	ΔH	3.88	1.49	1.00	1.78	3.54
	LS	0	0.34	0.78	0	1
	A	4.62	1.55	0.31	2.21	0.52

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.08	14.94	16.33	14.41	15.15
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.01	10.57	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.36	
110 min	g	2.0032	2.0023	2.0021	2.0023	2.0023
	ΔH	4.00	1.52	1.84	1.79	3.81
	LS	0.0	0.40	0	0.04	1
	A	4.80	1.47	0.46	2.46	0.62

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.05	14.94	16.26	14.41	15.17
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	22.93	10.65	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.47	
122 min	g	2.0032	2.0023	2.0021	2.0023	2.0023
	ΔH	3.87	1.54	1.90	1.80	3.60
	LS	0	0.43	0	0.15	1
	A	4.67	1.4	0.49	2.46	0.50

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.04	14.94	16.30	14.49	15.16
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	22.48	10.64	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.41	
132 min	g	2.0032	2.0023	2.0021	2.0023	2.0023
	ΔH	3.89	1.53	2.48	1.83	4.52
	LS	0	0.26	0.66	0.38	1
	A	4.64	1.60	0.34	2.19	0.66

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.92	16.28	14.45	15.16
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	22.70	10.51	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.38	
155 min	g	2.0032	2.0022	2.0021	2.0023	2.0023
	ΔH	3.99	1.55	2.05	1.72	3.82
	LS	0	0.39	0.33	0	1
	A	5.07	1.7	0.46	2.98	0.67

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.02	14.92	16.28	14.45	15.16
	HFS:H _β (I=1/2)		14.31	22.70	10.51	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.38	
165 min	g	2.0032	2.0022	2.0021	2.0023	2.0023
	ΔH	3.98	1.53	1.86	1.72	3.77
	LS	0	0.52	1	0.21	1
	A	5.05	1.	0.17	2.73	0.56

Nanopartículas de NiFe₂O₄, T = 313K y buffer acetato pH = 4,8.

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.94	16.27	14.30	14.79
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.04	10.5	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.4	
16 min	g	2.0033	2.0025	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.76	1.23	1.34	1.16	1.90
	LS	0	1	0.77	0.32	1
	A	5.16	0.62	1.35	0.24	0.17

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.94	16.27	14.29	14.75
	HFS:H _β (I=1/2)		14.35	23.03	10.5	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.40	
23 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.84	1.22	1.34	1.10	1.87
	LS	0	1	0.77	0	1
	A	5.26	0.70	1.37	0.20	0.17

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.07	14.95	16.27	14.34	14.83
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	23.04	10.90	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.35	
29 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0025
	ΔH	3.86	1.22	1.34	1.06	1.9
	LS	0	0.99	0.80	0.23	1
	A	5.31	0.8	1.37	0.19	0.18

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.95	16.26	14.3	14.72
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.06	10.5	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.3	
35 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0023	2.0024
	ΔH	3.90	1.23	1.34	1.01	1.88
	LS	0	0.98	0.76	0	1
	A	5.40	0.83	1.29	0.19	0.15

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.93	16.27	14.29	14.84
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.05	10.80	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.43	
42 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.84	1.22	1.32	1.04	1.84
	LS	0	0.97	0.74	0.14	1
	A	5.36	0.88	1.24	0.17	0.14

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.02	14.93	16.28	14.33	14.86
	HFS:H _β (I=1/2)		14.39	23.06	10.75	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.41	
55 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.80	1.25	1.33	0.85	1.89
	LS	0	0.96	0.72	0.24	1
	A	5.29	1.01	1.19	0.11	0.12

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.02	14.93	16.31	14.42	14.95
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.05	10.87	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.30	
65 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.84	1.26	1.33	107	1.98
	LS	0	1	0.79	1	1
	A	5.41	0.97	1.01	0.09	0.11

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.00	14.94	16.29	14.21	15.08
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	23.07	10.68	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.37	
72 min	g	2.0033	2.0024	2.0022	2.0024	2.0024
	ΔH	3.86	1.23	1.31	0.89	2.12
	LS	0	0.94	0.77	0.22	1
	A	5.32	1.10	0.99	0.13	0.14

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.0	14.95	16.30	14.42	15.07
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	23.06	10.83	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.38	
78 min	g	2.0033	2.0024	2.0022	2.0024	2.0024
	ΔH	3.86	1.24	1.32	1.12	2.26
	LS	0	0.98	0.82	0	1
	A	5.30	1.07	0.9	0.26	0.12

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.97	14.93	16.29	14.29	14.98
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.06	10.77	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.39	
84 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.82	1.25	1.34	1.04	1.88
	LS	0	0.96	0.82	0.77	1
	A	5.21	1.14	0.95	0.10	0.09

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.99	14.93	16.29	14.26	14.90
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.02	10.60	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.46	
103 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.84	1.24	1.30	1.28	2.47
	LS	0	0.97	0.73	0	1
	A	5.35	1.19	0.92	0.35	0.14

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.07	14.94	16.30	14.26	14.8
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	23.06	10.55	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.43	
110 min	g	2.0033	2.0024	2.0023	2.0024	2.0024
	ΔH	3.94	1.24	1.24	1.14	1.85
	LS	0	0.96	0.96	0	1
	A	5.53	1.26	0.8	0.30	0.08

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.02	14.93	16.28	14.44	15.09
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	23.05	10.73	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.21	
117 min	g	2.0033	2.0024	2.0022	2.0024	2.0023
	ΔH	3.90	1.26	1.30	0.99	2.30
	LS	0	1	0.73	0.18	1
	A	5.46	1.19	0.84	0.23	0.11

Nanopartículas de Fe₃O₄, T = 215K y buffer acetato pH = 4,8.

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
19 min	HFS: N(I=1)	87.11	14.87	16.22	-	14.72
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.17	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0024
	ΔH	3.94	1.22	1.30	-	1.82
	LS	0.17	0.93	0.79	-	1
	A	4.62	2.62	1.71	-	0.25

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
32 min	HFS: N(I=1)	87.11	14.87	16.23	-	14.75
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.17	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	4.00	1.23	1.29	-	1.83
	LS	0.18	0.92	0.80	-	1
	A	4.80	2.95	1.52	-	0.19

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
38 min	HFS: N(I=1)	87.07	14.87	16.23	-	14.76
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.17	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	3.76	1.22	1.29	-	1.82
	LS	0	0.92	0.79	-	1
	A	4.92	2.98	1.43	-	0.18

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.13	14.87	16.24	-	14.76
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.27	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
44 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	3.82	1.23	1.29	-	1.75
	LS	0.15	0.92	0.83	-	1
	A	4.56	3.06	1.29	-	016

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.10	14.87	16.23	-	14.83
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.17	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
50 min	g	2.0031	2.0023	2.0021	-	2.0025
	ΔH	3.93	1.22	1.29	-	1.83
	LS	0.18	0.91	0.80	-	1
	A	4.66	3.4	1.31	-	0.16

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.11	14.87	16.23	-	14.77
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.17	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
57 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	3.71	1.22	1.31	-	1.83
	LS	0.07	0.91	0.80	-	1
	A	4.59	3.27	1.20	-	0.16

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.07	14.87	16.24	-	14.82
	HFS:H _β (I=1/2)		14.31	23.15	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
63 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	3.77	1.22	1.29	-	2.76
	LS	0.04	0.91	0.81	-	1
	A	4.83	3.40	1.21	-	0.14

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.17	14.87	16.24	-	14.87
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.17	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
69 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	3.74	1.22	1.31	-	1.80
	LS	0.03	0.90	0.87	-	1
	A	4.89	3.48	1.09	-	0.13

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.10	14.87	16.24	-	14.91
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.17	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
83 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	4.03	1.22	1.22	-	1.82
	LS	0.09	0.89	0.89	-	1
	A	5.26	1.59	1.04	-	0.13

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.15	14.87	16.23	-	
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.17	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
92 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	3.91	1.22	1.29	-	1.79
	LS	0	0.90	0.86	-	1
	A	5.37	3.63	1.05	-	0.12

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.13	14.87	16.24	-	14.81
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.16	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
98 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	3.90	1.22	1.31	-	1.75
	LS	0	0.88	0.93	-	1
	A	5.38	3.75	0.93	-	0.10

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.10	14.87	16.25	-	14.80
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.16	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)					
104 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	4.01	1.22	1.28	-	1.60
	LS	0	0.9	0.86	-	1
	A	5.61	3.9	1.09	-	0.11

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.13	14.86	16.25	-	14.89
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.16	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)					
110 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0023
	ΔH	3.92	1.22	1.30	-	1.75
	LS	0	0.90	0.90	-	1
	A	5.32	3.79	0.92	-	0.10

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.15	14.86	16.23	-	14.88
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.16	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
116 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0023
	ΔH	3.97	1.22	1.51	-	1.78
	LS	0.1	0.89	0.95	-	1
	A	5.20	3.90	0.82	-	0.10

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.12	14.87	16.24	-	14.95
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.15	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
123 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	4.14	1.22	1.31	-	1.69
	LS	0.17	0.89	0.93	-	1
	A	5.2	3.88	0.86	-	0.10

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.13	14.87	16.25	-	14.85
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.16	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
128 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0023
	ΔH	3.98	1.22	1.29	-	1.62
	LS	0	0.89	0.89	-	1
	A	5.31	3.95	0.90	-	0.09

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.10	14.86	16.25	-	14.86
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.17	-	
	HFS:H _γ (I=1/2)				-	
138 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	-	2.0022
	ΔH	3.92	1.22	1.30	-	1.72
	LS	0	0.89	0.84	-	1
	A	5.39	4.0	0.99	-	0.10

Nanopartículas de Fe₃O₄, T = 313K y buffer acetato pH = 7,0.

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.04	14.96	-	13.67	14.72
	HFS:H _β (I=1/2)		14.26	-	12.44	
	HFS:H _γ (I=1/2)			-	1.07	
16 min	g	2.0032	2.0022	-	2.0023	2.0022
	ΔH	3.79	1.07	-	3.04	2.18
	LS	0.18	1	-	0.76	0.78
	A	3.09	0.31	-	3.65	0.96

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
24 min	HFS: N(I=1)	87.01	1497	-	14.44	14.83
	HFS:H _β (I=1/2)		14.28	-	12.19	
	HFS:H _γ (I=1/2)			-	2.79	
	g	2.0031	2.0022	-	2.0024	2.0022
	ΔH	4.01	1	-	2.79	2.21
	LS	0.25	1	-	0.51	0.65
	A	4.40	0.17	-	2.57	1.10
Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
30 min	HFS: N(I=1)	87.07	14.97	-	13.15	14.80
	HFS:H _β (I=1/2)		14.26	-	12.01	
	HFS:H _γ (I=1/2)			-	2.67	
	g	2.0032	2.0022	-	2.0024	2.0022
	ΔH	3.90	1.03	-	2.56	2.31
	LS	0.2	1	-	0	0.81
	A	4.35	0.15	-	3.006	0.86
Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
36 min	HFS: N(I=1)	87.07	14.95	-	13.06	14.87
	HFS:H _β (I=1/2)		14.28	-	11.8	
	HFS:H _γ (I=1/2)			-	2.64	
	g	2.0032	2.0022	-	2.0024	2.0022
	ΔH	3.84	0.98	-	2.32	2.35
	LS	0.1	1	-	0.06	0.60
	A	4.58	0.14	-	2.75	1.12

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
63 min	HFS: N(I=1)	87.11	14.97	-	13.0	14.85
	HFS:H _β (I=1/2)		14.26	-	11.84	
	HFS:H _γ (I=1/2)			-	2.52	
	g	2.0031	2.0022	-	2.0025	2.0022
	ΔH	4.04	1.01	-	2.13	2.42
	LS	0.32	1	-	0.12	0.93
	A	4.27	0.12	-	2.16	0.67
Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
49 min	HFS: N(I=1)	87.04	14.97	-	13.2	14.96
	HFS:H _β (I=1/2)		14.26	-	12.0	
	HFS:H _γ (I=1/2)			-	2.61	
	g	2.0032	2.0022	-	2.0025	2.0023
	ΔH	3.95	0.97	-	2.41	2.64
	LS	0.25	1	-	0.10	0.66
	A	4.36	0.11	-	2.74	1.21
Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
56 min	HFS: N(I=1)	87.13	14.99	-	13.2	15.22
	HFS:H _β (I=1/2)		14.26	-	12.0	
	HFS:H _γ (I=1/2)			-	2.51	
	g	2.0031	2.0022	-	2.0025	2.0023
	ΔH	4.16	0.97	-	2.32	2.71
	LS	0.75	1	-	1	1
	A	2.56	0.19	-	0.82	0.58

BLANCOS:**T = 313 K y buffer acetato pH=4,8.**

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
33 min	HFS: N(I=1)	86.94	14.89	16.21	14.2	14.78
	HFS: H _β (I=1/2)		14.21	22.92	10.89	
	HFS: H _γ (I=1/2)				1.4	
	g	2.0031	2.0023	2.0021	2.0024	2.0022
	ΔH	4.12	1.27	1.36	0.54	1.98
	LS	0	1	081	0.58	1
	A	6.66	0.53	1.25	0.01	0.22

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
38 min	HFS: N(I=1)	86.89	14.88	16.21	14.11	14.83
	HFS: H _β (I=1/2)		14.23	22.94	10.95	
	HFS: H _γ (I=1/2)				1.68	
	g	2.0031	2.0023	2.0021	2.0023	2.0022
	ΔH	4.05	1.24	1.35	0.73	1.99
	LS	0	0.98	0.78	1	1
	A	6.42	0.55	1.25	0.02	0.19

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
63 min	HFS: N(I=1)	86.89	14.88	16.21	14.12	14.83
	HFS: H _β (I=1/2)		14.23	22.94	10.95	
	HFS: H _γ (I=1/2)				1.68	
	g	2.0031	2.0022	2.0021	2.0022	2.0022
	ΔH	4.09	1.26	1.37	0.53	1.81
	LS	0	1	0.88	1	1
	A	6.70	0.47	0.99	0.01	0.12

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.92	14.87	16.19	14.47	14.87
	HFS:H _β (I=1/2)		14.22	22.94	10.5	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.23	
70 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	2.0021	2.0022
	ΔH	4.15	1.28	1.36	0.90	1.91
	LS	0	1	0.83	1	1
	A	6.78	0.54	1.16	0.03	0.14

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.93	14.88	16.21	14.5	14.95
	HFS:H _β (I=1/2)		14.22	22.95	10.84	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.2	
75 min	g	2.0031	2.0022	2.0021	2.0021	2.0022
	ΔH	4.10	1.26	1.33	0.79	1.88
	LS	0	1	0.78	1	1
	A	6.63	0.56	1.21	0.02	0.13

T = 313 K y buffer acetato pH=7,0.

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.98	14.86	16.17	14.4	14.71
	HFS:H _β (I=1/2)		14.15	22.81	10.5	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.3	
15 min	g	2.0037	2.0028	2.0026	2.0021	2.0028
	ΔH	3.98	1.22	1.29	2.22	2.05
	LS	0	1	0.76	0.94	1
	A	5.17	0.41	1.09	0.1	0.29

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.14	14.87	16.16	14.4	14.74
	HFS:H _β (I=1/2)		14.15	22.81	10.3	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.4	
19 min	g	2.0038	2.0028	2.0026	2.0032	2.0028
	ΔH	4.05	1.20	1.3	2.82	2.03
	LS	0	0.82	0.91	1	1
	A	5.33	0.66	0.89	0.1	0.26

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.09	14.87	16.16	14.3	14.66
	HFS:H _β (I=1/2)		14.16	22.83	10.56	
	HFS:H _γ (I=1/2)				1.72	
25 min	g	2.0037	2.0028	2.0026	2.0031	2.0028
	ΔH	4.03	1.20	1.31	3.05	2.13
	LS	0	1	0.81	1	1
	A	5.40	0.50	0.95	0.3	0.29

T = 298 K y buffer acetato pH=7,0.

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.07	14.88	16.24	12.89	14.75
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.13	11.77	
	HFS:H _γ (I=1/2)				2.22	
24 min	g	2.0031	2.0022	2.0020	2.0026	2.002
	ΔH	3.98	1.21	1.31	1.80	2.07
	LS	0	1	0.88	0.73	1
	A	6.13	0.18	0.49	0.36	0.34

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.09	14.90	16.26	13.15	14.78
	HFS:H _β (I=1/2)		14.38	23.09	11.37	
	HFS:H _γ (I=1/2)				2.82	
16 min	g	2.0031	2.0022	2.0023	2.0023	2.0022
	ΔH	3.96	1.14	1.31	1.92	2.13
	LS	0	1	6.84	1	1
	A	5.97	0.16	0.54	0.29	0.38

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.12	14.88	16.24	12.94	14.81
	HFS:H _β (I=1/2)		14.36	23.10	11.43	
	HFS:H _γ (I=1/2)				2.46	
30 min	g	2.0031	2.0022	2.0020	2.0024	2.0022
	ΔH	4.04	1.39	1.30	1.89	2.03
	LS	0	1	0.91	1	0.99
	A	6.24	0.18	0.46	0.32	0.33

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.01	14.88	16.23	12.94	14.84
	HFS:H _β (I=1/2)		14.37	23.11	11.49	
	HFS:H _γ (I=1/2)				2.44	
35 min	g	2.0031	2.0022	2.0020	2.0025	2.0022
	ΔH	4.19	1.17	1.30	1.87	2.05
	LS	0	1	0.79	1	1
	A	6.38	0.19	0.56	0.27	0.29

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	87.11	14.88	16.23	12.96	14.80
	HFS:H _β (I=1/2)		14.34	23.15	11.52	
	HFS:H _γ (I=1/2)				2.46	
42 min	g	2.0031	2.0022	2.0020	2.0025	2.0022
	ΔH	4.19	1.13	1.32	1.88	2.08
	LS	0	1	0.87	1	1
	A	6.64	0.18	0.50	0.28	0.27

Tiempo de reacción		Mn	OH	CH3	OOH	N
	HFS: N(I=1)	86.98	14.88	16.3	13.06	14.76
	HFS:H _β (I=1/2)		14.39	23.06	12.40	
	HFS:H _γ (I=1/2)				2.21	
47 min	g	2.0032	2.0023	2.0021	2.0026	2.0023
	ΔH	4.05	1.13	1.27	1.11	1.93
	LS	0	0.96	0.81	0	0.90
	A	6.14	0.18	0.52	0.25	0.27