

Estudio de especies reactivas de oxígeno producidas por nanopartículas de MnFe_2O_4 mediante espectroscopía EPR combinada con *spin trapping*

Ignacio Lembo Ferrari¹

¹*Instituto Balseiro*

(Dated: June 8, 2023)

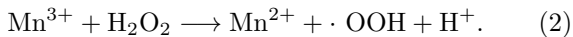
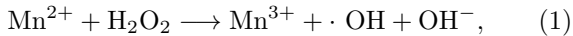
Se estudió la capacidad de las nanopartículas de MnFe_2O_4 para promover especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia de H_2O_2 mediante espectroscopía EPR junto con la técnica de *spin trapping* para detectar los radicales formados. Se empleó el compuesto 5,5-Dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) como *spin trap*. Se realizaron mediciones a los 10 y 40 minutos de inicio de la producción de ROS y se identificó la presencia de radicales hidroxilo a los 10 minutos, así como radicales hidroxilo y metilo a los 40 minutos. Utilizando un modelo de interacción Zeeman e hiperfina se describieron satisfactoriamente los espectros observados destacando la capacidad de esta técnica para caracterizar las ROS producidas por las nanopartículas de MnFe_2O_4 .

Keywords: EPR, Nanopartículas, ROS

INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son especies altamente reactivas derivadas del oxígeno que se generan como subproducto natural del metabolismo oxidativo celular [1]. El anión superóxido $\cdot\text{O}_2^-$, el oxhidrilo $\cdot\text{OH}$ (radicales libres) y el peróxido de hidrógeno H_2O_2 son ejemplos de ROS. En concentraciones normales, las ROS son esenciales para el metabolismo fisiológico, regulan la respuesta celular a la hipoxia y la resistencia a agentes infecciosos y participan en varios sistemas de comunicación celular. No obstante, un desbalance en el equilibrio entre la producción de ROS y antioxidantes puede ocasionar daños en proteínas, ADN y estrés oxidativo el cual se ha relacionado con diversas enfermedades como cáncer, diabetes o enfermedades neurodegenerativas [1].

Trabajos recientes [2, 3] han mostrado que existen nanopartículas de ferritas (MeFe_2O_4 donde Me es un metal con valencia 2) con la capacidad de catalizar la producción de ROS en presencia de H_2O_2 mediante una reacción en la superficie de las mismas. Este tipo de reacciones son catalizadas por un metal de transición, en este caso, el metal Me presente en la nanopartícula, y son conocidas como reacciones de Fenton [4]



Los radicales libres son moléculas que poseen al menos un electrón desapareado, son altamente inestables y de naturaleza paramagnética. Actualmente, la espectroscopía por resonancia paramagnética electrónica (EPR) es la técnica más precisa para la detección de radicales libres. No obstante, debido a que el tiempo de vida media de los radicales es muy corto (del orden de $1 \mu\text{s}$), no es posible detectarlos directamente mediante espectroscopía EPR. Para poder extender dicho tiempo de vida

media se utiliza una técnica conocida como *spin trapping*. Esta técnica consiste en añadir una molécula (*spin trap*) a la muestra en estudio, la cual se combina con los radicales libres formando una especie más estable conocida como aducto. Esto permite la detección y caracterización indirecta de los radicales formados en la muestra. En este trabajo se utilizó como *spin trap* 5,5-Dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO). Es importante destacar que los aductos formados radical-DMPO, además de detectar la presencia de radicales libres producidos, permite identificarlos.

Combinando técnicas de medición y clasificación de radicales libres junto con aplicación de nanopartículas magnéticas se puede optimizar la producción de ROS en el organismo, lo cual potencialmente se puede utilizar para producir muerte celular en terapias oncológicas, disminuir efectos dañinos en MRI o intervenciones oftalmológicas [5, 6]. En este trabajo se estudiaron las especies radicales producidas a los 10 y 40 minutos de agregar H_2O_2 en una muestra de nanopartículas de MnFe_2O_4 .

MARCO TEÓRICO

Dado que el objeto de estudio son moléculas con un electrón desapareado que interactúan fuertemente con el entorno molecular. Se detallarán dichas interacciones en general y luego se analizará el caso particular de los aductos de radical-DMPO.

Interacciones Zeeman e Hiperfina

Sea un sistema formado por un espín electrónico ($\hat{\mathbf{S}}$) y un espín nuclear ($\hat{\mathbf{I}}$) en un campo magnético \mathbf{B}_0 , el hamiltoniano que describe esta interacción es [7]

$$\mathcal{H} = g\mu_B \mathbf{B}_0 \cdot \hat{\mathbf{S}} + g_N\mu_N \mathbf{B}_0 \cdot \hat{\mathbf{I}}, \quad (3)$$

donde g y g_N son los factores de Landé asociados al electrón y al núcleo respectivamente, μ_B es el magnetón de Bohr y μ_N el magnetón nuclear. Este término se conoce como interacción Zeeman. Si además se considera la interacción de este espín electrónico con los espines nucleares vecinos, se debe adicionar al hamiltoniano de la Ec. (3) un término de interacción hiperfina que describa el acople entre espines electrónicos y nucleares. El hamiltoniano entonces queda

$$\hat{\mathcal{H}} = g\mu_B \mathbf{B}_0 \cdot \hat{\mathbf{S}} + g_N\mu_N \mathbf{B}_0 \cdot \hat{\mathbf{I}} + \sum_{i=1}^N A_i \hat{\mathbf{S}} \cdot \hat{\mathbf{I}}_i, \quad (4)$$

donde A_i es la constante hiperfina correspondiente al núcleo i . Despreciando el término de Zeeman nuclear en el hamiltoniano de la Ec. (4) debido a que μ_N es aproximadamente 2000 veces menor que μ_B y suponiendo que $\mathbf{B}_0 = B_0 \hat{z}$ se tiene

$$\mathcal{H} = g\mu_B B_{0z} \hat{S}_z + \sum_{i=1}^N A_i (\hat{S}_x \hat{I}_{i,x} + \hat{S}_y \hat{I}_{i,y} + \hat{S}_z \hat{I}_{i,z}) \quad (5)$$

A partir de la definición de los operadores \hat{F}_+ , \hat{F}_- con $\hat{F} = \hat{S}, \hat{I}$,

$$\hat{F}_+ = \hat{F}_x + i\hat{F}_y \quad \hat{F}_- = \hat{F}_x - i\hat{F}_y, \quad (6)$$

se puede reescribir el hamiltoniano como

$$\hat{\mathcal{H}} = g\mu_B B_{0z} \hat{S}_z + \sum_{i=1}^N \frac{A_i}{2} (\hat{S}_+ \hat{I}_{i,-} + \hat{S}_- \hat{I}_{i,+}) + A_i \hat{S}_z \hat{I}_{i,z}. \quad (7)$$

Tomando como base los espinores de \hat{S}_z y \hat{I}_z , $|M, m_i\rangle$, el operador \hat{I}_i solo opera sobre el número cuántico m_i mientras que \hat{S} solo lo hace sobre M . En la expresión (7) los términos con \hat{S}_z y $\hat{I}_{i,z}$ solo aportan a componentes diagonales del hamiltoniano, mientras que los términos con $\hat{S}_+ \hat{I}_{i,-}$ y $\hat{S}_- \hat{I}_{i,+}$ solo aportan a elementos no diagonales de la forma

$$\begin{aligned} & \langle M+1, m_i-1 | \hat{S}_+ \hat{I}_{i,-} | M, m_i \rangle, \\ & \langle M-1, m_i+1 | \hat{S}_- \hat{I}_{i,+} | M, m_i \rangle. \end{aligned} \quad (8)$$

Entonces el hamiltoniano del sistema no es diagonal en esta base. No obstante, para lo que sigue se despreciará el término $\frac{A_i}{2} (\hat{S}_+ \hat{I}_{i,-} + \hat{S}_- \hat{I}_{i,+})$ del hamiltoniano de la Ec. (7), lo cual es válido solo si se cumple que $g\mu_B B_0 \gg |A_i|$. No obstante, esto se verifica en experimentos EPR y el hamiltoniano queda

$$\mathcal{H} = g\mu_B B_{0z} \hat{S}_z + \sum_{i=1}^N A_i \hat{S}_z \hat{I}_{i,z}. \quad (9)$$

Transiciones electrónicas

Aplicando una perturbación dependiente del tiempo $\mathcal{H}_1(t)$ al hamiltoniano original de la Ec. (9), de la teoría

de perturbaciones dependientes del tiempo [8] se pueden escribir los autoestados del hamiltoniano total como

$$|\psi\rangle = \sum_n a_n(t) |n\rangle e^{-iE_n t/\hbar} \quad (10)$$

donde $|n\rangle \equiv |M, m_i\rangle$ son los autoestados del hamiltoniano no perturbado y donde $a_n(t)$, a primer orden se puede escribir como

$$a_n(t) = -\frac{i}{\hbar} \sum_m a_m(0) \int_0^t \langle n | \mathcal{H}_1 | m \rangle e^{i\omega t'} dt' \quad (11)$$

donde $\omega_{if} = (E_{M, m_i} - E_{M', m'_i})/\hbar$. La probabilidad de que se produzca una transición está dada por $|a_n|^2$, luego partiendo de una condición inicial tipo $a_n(0) = \delta_{m,i}$ se llega [9] a que la probabilidad de transición está dada por

$$P_{if} = |\langle M', m'_i | \mathcal{H}_1 | M, m_i \rangle|^2 \delta(\omega - \omega_{if}) \quad (12)$$

Dado un campo magnético oscilante $\mathbf{B}_1 = B_1 \hat{x}$ (perpendicular a \mathbf{B}_0) resonante con frecuencia ω_{if} y cuyo módulo cumple que $B_0 \gg B_1$, el hamiltoniano perturbativo dependiente del tiempo será

$$\mathcal{H}_1 = g\mu_B B_1 \hat{S}_x. \quad (13)$$

Luego, el elemento de matriz de la Ec. (12) será

$$\begin{aligned} \langle M', m'_i | \mathcal{H}_1 | M, m_i \rangle &= g\mu_B B_1 \langle M', m'_i | S_x | M, m_i \rangle \\ &= g\mu_B B_1 \langle M' | S_x | M \rangle \langle m'_i | m_i \rangle, \end{aligned} \quad (14)$$

y de las relaciones (6) se tiene que el elemento de matriz de S_x en la expresión sera no nulo solo cuando se cumpla que $M' = M \pm 1$ y $m_i = m_i$, llegando a las reglas de transición de EPR

$$\Delta M = \pm 1, \quad y \quad \Delta m = 0. \quad (15)$$

Análisis de los aductos de DMPO formados

En las secciones anteriores se trató de forma generica las interacciones presentes en el estudio de una muestra examinada por espectroscopía EPR. En base a los resultados de Moreno Maldonado [2] para un sistema similar al de este trabajo, donde se observó que los radicales oxhidrilo ($\cdot\text{OH}$) y metilo ($\cdot\text{CH}_3$) son las especies formadas mayoritariamente a tiempos entre 10 y 40 minutos, se analizarán las interacciones presentes en los aductos de radical-DMPO formados. Los dos posibles aductos formados se muestran en las Figs. 1C y 1D.

Para ambos aductos, las constantes de interacción hiperfina se encuentran estandarizadas por el NIH de Estados Unidos (National Institute of Environmental Health Sciences) [10]. Los valores de las constantes hiperfinas tabulados por el NIH para el aducto DMPO-OH son

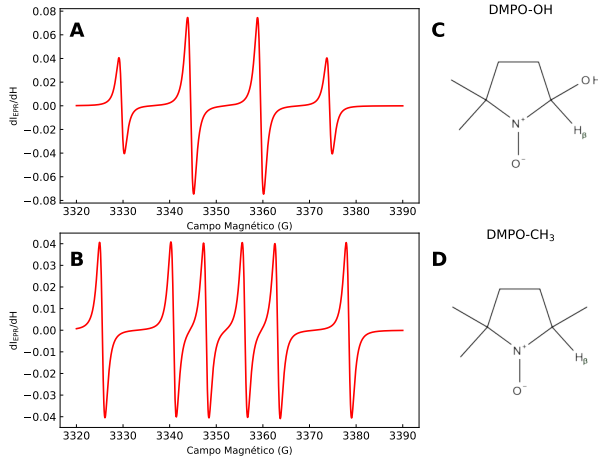


FIG. 1. A y B muestran la simulación de los espectros esperados para los aductos DMPO-OH y DMPO-CH₃ respectivamente en base a las constantes hiperfinas tabuladas por el NIH [10]. C y D muestran un esquema de la molécula correspondiente a los aductos DMPO-OH y DMPO-CH₃ respectivamente.

$a_N = 14.9$ G y $a_H = 14.9$ G, mientras que para el aducto DMPO-CH₃ son $a_N = 16.1$ G y $a_H = 23.3$ G. Por lo tanto, en base a los valores de referencia del NIH, se propone un modelo para los aductos formados donde el acople hiperfino se da entre el electrón desapareado del oxígeno y el espín nuclear del nitrógeno ($I_N = 1$) y el espín nuclear del hidrógeno H_β ($I_H = 1/2$). Entonces, al aplicar el campo magnético estático $\mathbf{B}_0 = B_0 \hat{z}$, según la Ec. (9), el hamiltoniano que describe estas interacciones es

$$\mathcal{H} = g\mu_B B_0 S_z + A_N S_z I_{N,z} + A_H S_z I_{H,z}. \quad (16)$$

Para escribir los autoestados de este sistema se necesitan los números cuánticos M , m_N y m_H . Debido a las aproximaciones mencionadas anteriormente, este hamiltoniano es diagonal en la base de estados $|M, m_N, m_H\rangle$

$$\begin{aligned} \mathcal{H}|M, m_N, m_H\rangle = & g\mu_B B_0 |M, m_N, m_H\rangle + \\ & A_N S_z I_{N,z} |M, m_N, m_H\rangle + \\ & A_H S_z I_{H,z} |M, m_N, m_H\rangle \end{aligned} \quad (17)$$

y las autoenergías del sistema, es decir los términos diagonales del hamiltoniano son

$$E_{M, m_N, m_H} = M g \mu_B B_0 + A_N M m_N + A_H M m_H \quad (18)$$

donde $M = -1/2, 1/2$, $m_N = -1, 0, 1$ y $m_H = -1/2, 1/2$.

Finalmente, de la condición de resonancia $E_{M, m_N, m_H} = \hbar \omega_{if}$, se determinan los 6 campos de resonancia $B_{0,R}$ para un aducto con las interacciones propuestas

$$B_{0,R} = \frac{\hbar \omega_{if}}{g \mu_B} - M m_N a_N - M m_H a_H, \quad (19)$$

donde $a_N = \frac{A_N}{g \mu_B}$ y $a_H = \frac{A_H}{g \mu_B}$.

En la Fig. 2 se muestran, para valores genéricos de a_N y a_H , los niveles de energía dados por la Ec. (18) y las correspondientes transiciones energéticas dadas por las Ecs. (15). En base a la Ec. (18) para los niveles de energía y de las constantes hiperfinas tabuladas por el NIH para cada aducto formado, se simularon los espectros EPR como se muestra en las Figs. 1A y 1B. Para DMPO-OH se esperan ver 4 líneas en relación 1:2:2:1 mientras que para el DMPO-CH₃ se esperan ver 6 líneas en relación 1:1:1:1:1:1.

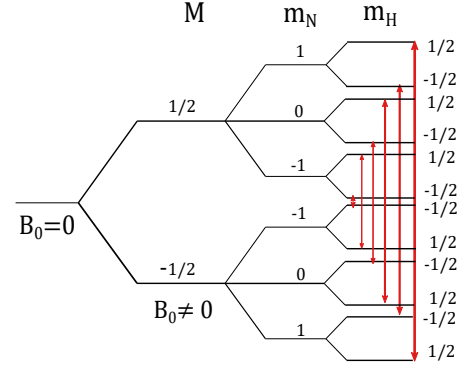


FIG. 2. Espectro de energías para el hamiltoniano $\mathcal{H} = g\mu_B S_z + A_N S_z I_{N,z} + A_H S_z I_{H,z}$ que modela las interacciones principales del electrón desapareado en la molécula de DMPO. Además, se muestran las posibles transiciones energéticas dadas por las reglas de selección $|\Delta M| = 1$ y $\Delta m = 0$.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Medición del espectro EPR

Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker ELEXSYS II E500, equipado con una cavidad rectangular de banda X (9.5 GHz). Se prepararon las nanopartículas con el DMPO disuelto en agua, se agregó H₂O₂ y se tomó este momento como el tiempo inicial $t = 0$. El pH de la muestra era de 5. Se midieron espectros EPR a los 10 y 40 minutos de añadir el H₂O₂.

Análisis de datos

Con el objetivo de caracterizar el o los aductos de DMPO formados se ajustó el espectro EPR con una superposición de 6 curvas por aducto correspondientes a derivadas de funciones Lorentzianas [11], cada una centrada en el campo de resonancia prescrito por la Ec. (19). Como se puede ver en dicha expresión, los campos de transición $B_{0,R}$ se calculan a partir de g y de las con-

stantes hiperfinas a_N y a_H . Para cada aducto formado se obtuvieron como parámetro de ajuste la intensidad, el ancho de línea, g y las constantes hiperfinas correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 3A muestra el espectro medido a los 10 minutos. En primer lugar, se observa un conjunto de 3 líneas simbolizadas con (*) que no corresponden a los radicales esperados. En trabajos anteriores [2] se identificó esto como un radical debido a configuraciones de la molécula de DMPO y que interacciona solo con el núcleo de nitrógeno por lo que el espectro tiene 3 líneas. Por lo tanto, se ajustó considerando la interacción del radical con el núcleo del nitrógeno junto con las interacciones debido al radical oxhidrilo. De dicho ajuste se obtuvieron las constantes de acoplamiento hiperfino para el oxhidrilo $a_N = (15.00 \pm 0.05)$ G, $a_H = (14.64 \pm 0.05)$ G, valores que no discrepan de los tabulados por el NIH para el aducto de DMPO con el radical $\cdot\text{OH}$. Para el radical del DMPO se obtuvo $a_N = (14.77 \pm 0.05)$ G. Esto es consistente con observaciones [2] anteriores donde también se detectó una presencia predominante de radicales oxhidrilo a estos tiempos.

Por otro lado, la Fig. 3B muestra el espectro medido a los 40 minutos de añadir el H_2O_2 , aquí nuevamente se detecta la presencia predominante de radical oxhidrilo, la presencia del radical de DMPO y además se observa un nuevo conjunto de líneas adicionales (indicadas con ^) de muy baja intensidad por lo que se ajustó suponiendo la presencia del oxhidrilo junto con el radical metilo cuyo hamiltoniano también es de la forma (16). El ajuste resultó satisfactorio y los resultados de las constantes hiperfinas para el radical oxhidrilo fueron $a_N = (15.01 \pm 0.05)$ G y $a_H = (14.63 \pm 0.05)$ G, valores que no discrepan de los obtenidos en el espectro tomado a 10 minutos lo cual indica que se trata de las mismas especies. Para el radical metilo, $a_N = (15.30 \pm 0.06)$ G y $a_H = (22.35 \pm 0.09)$ G valores que coinciden con lo reportado para dicho radical [2]. Para el radical del DMPO se obtuvo $a_N = (14.8 \pm 0.1)$ G.

Los modelos de interacción propuestos resultaron correctos para describir las interacciones presentes dado que se pudieron ajustar bien las líneas presentes en ambos espectros. Además estos resultados fueron consistentes con trabajos anteriores de muestras muy similares.

CONCLUSIONES

Se estudió la capacidad de promover la producción de ROS mediante nanopartículas de MnFe_2O_4 en H_2O_2 utilizando espectroscopía EPR. Debido al corto tiempo de vida de las ROS se implementó la técnica de *spin trapping*

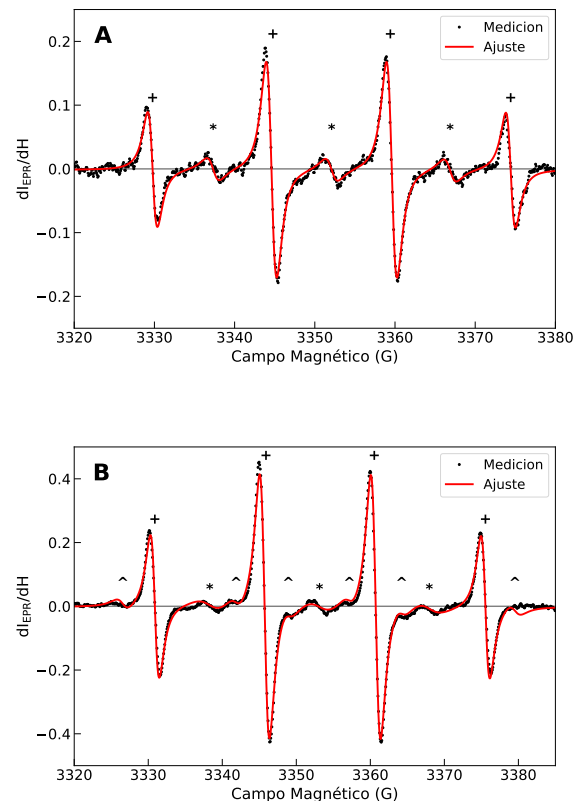


FIG. 3. Espectro EPR de la muestra de nanopartículas a 10 minutos de añadir H_2O_2 (A) y a 40 minutos (B). La curva negra corresponde a los datos experimentales y la curva roja es la simulación a partir de los resultados del ajuste. Se marcan las líneas de los grupos radicales $\cdot\text{OH}$ (+), $\cdot\text{CH}_3$ (^) y el radical debido al DMPO (*).

para poder detectar la presencia de los radicales formados. El *spin trap* utilizado fue DMPO. En base a trabajos anteriores, se propuso un hamiltoniano para describir las interacciones presentes en los aductos de DMPO formados.

Se analizaron mediciones tomadas a 10 y 40 minutos del comienzo de producción de ROS y, comparando con trabajos anteriores y la base de datos del NIH se determinó la presencia de radical oxhidrilo a los 10 minutos, con constantes hiperfinas $a_N = (15.00 \pm 0.05)$ G, $a_H = (14.64 \pm 0.05)$ G. A los 40 minutos, se detectó la presencia de radicales oxhidrilo, con $a_N = (15.01 \pm 0.05)$ G, $a_H = (14.63 \pm 0.05)$ G y de radicales metilo $a_N = (15.30 \pm 0.06)$ G, $a_H = (22.35 \pm 0.09)$ G.

El modelo de interacción Zeeman e hiperfina para el aducto de DMPO formado resultó ser adecuado para describir los espectros observados. Los resultados obtenidos muestran la capacidad de la técnica de espectroscopía por EPR + *spin trapping* para caracterizar las especies radicales formadas en el proceso de producción de ROS mediante nanopartículas de MnFe_2O_4 en presencia de H_2O_2 .

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Teobaldo Torres por proveer las mediciones analizadas en este trabajo

-
- [1] J. Liu, Y. Li, S. Chen, Y. Lin, H. Lai, B. Chen, and T. Chen, *Frontiers in Chemistry* **8**, 838 (2020).
 - [2] A. C. M. Maldonado, E. L. Jr, and E. Winkler, .
 - [3] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, and X. Yan, *Nature Nanotechnology* **2**, 577 (2007).
 - [4] H. J. H. Fenton, *Journal of The Chemical Society, Transactions* **65**, 899 (1984).
 - [5] Z. Zhou, J. Song, L. Nie, and X. Chen, *Chemical Society Reviews* **45**, 6597 (2016).
 - [6] A. Abdal Dayem, M. Hossain, S. Lee, K. Kim, S. Saha, G.-M. Yang, H. Choi, and S.-G. Cho, *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 120 (2017).
 - [7] J. A. Weil and J. R. Bolton, A John Wiley & Sons, Inc., publication (2007).
 - [8] R. O. Barrachina, (1993).
 - [9] A. Messiah and A. Messiah, *Quantum mechanics: two volumes bound as one* (Dover Publications, Mineola, NY, 2000).
 - [10] National Institutes of Health, National Institutes of Health (2023), accedido el 02 06 2023.
 - [11] B. L. Bales, M. Meyer, S. Smith, and M. Peric, *The Journal of Physical Chemistry A* **113**, 4930 (2009), publisher: American Chemical Society.