



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

ESTUDIO DE SISTEMAS DE INTERÉS EN BIOLOGÍA
MEDIANTE RADIACIONES NUCLEARES

Cecilia Yamil Chain

(Alberto Pasquevich, Margarita G. de Bravo)

2013

*A mi amor y compañero Bruno,
por el orgullo que se reflejaba en sus ojos cada vez que mencionábamos
este trabajo de tesis.*

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis directores, Alberto F. Pasquevich y Margarita G. de Bravo, por guiarme en el camino de aprendizaje que recorrí durante el trabajo de tesis.

Agradezco a mis padres, Graciela y Ricardo, quienes me mostraron que los caminos de la vida se recorren mejor cuando la familia está cerca. Esta lección condicionó mi paso por el doctorado, ya que en estos cinco años de trabajo supe rodearme de una valiosa familia en el Departamento de Física, a quienes quiero agradecer de manera expresa:

A mis padres académicos Alberto Pasquevich y Laura Damonte. A Alberto le agradezco la paciencia paternal con la cual me explicó los detalles de la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas y el haberme mostrado la manera de desglosar un problema hasta sus partes más mínimas y luego ser capaz de reconstruirlo. A Laura le debo gran parte de lo que sé de la Espectroscopía de Aniquilación de Positrones además de muchos buenos momentos que se forjaron gracias a su sonrisa maternal y a su apoyo.

A mis tíos Toto Martínez y Patricia Rivas, con quienes tuve la suerte de compartir la oficina. Toto me mostró cómo tomar más de un atajo en el intrincado camino de los ajustes de las medidas de Correlaciones Angulares Perturbadas y supo hacer que comprendiera cientos de conceptos de la física sobre antiguas hojas de impresión. Patricia no sólo me tradujo el complicado lenguaje físico a nuestra lengua materna, el “químico básico”, sino que no se guardó ninguno de los secretos de cocina a la hora de auxiliarme en las síntesis químicas que se incluyen en este

trabajo de tesis. A pesar de todo esto, lo que más les agradezco a ambos es haber sido mi respaldo cuando tuve alguna tristeza personal que afrontar.

A Cristina Caracoche, quien con cariño propio de una abuela me apuntaló desde el principio en mi carrera docente y gracias a la cual ahora soy profesora de una asignatura que me da muchas satisfacciones.

Y finalmente a dos físicos a quienes quiero con cariño fraternal: Gustavo Pasquevich y Mariela Nieto. A Gustavo le agradezco el trabajo conjunto en los experimentos de Espectroscopía Mössbauer y a Mariela, cuyo trabajo de tesis no puede ser más distinto a éste, le doy las gracias por haber sido mi lugar de descanso y de alegría.

Mayo de 2013

Contenidos

1	Introducción	11
2	Las técnicas nucleares utilizadas	
2.1	Introducción	15
2.2	Técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas (PAC)	16
2.2.1	Conceptos teóricos	
2.2.1.1	La correlación angular entre rayos gama	18
2.2.1.2	Perturbación de la correlación angular en el caso de interacciones estáticas	18
2.2.1.3	Perturbación de la correlación angular en el caso de interacciones dinámicas	21
2.2.2	Método experimental	
2.2.2.1	El núcleo sonda	23
2.2.2.2	El equipo y el análisis de datos	26
2.3	Espectroscopía Mössbauer	
2.3.1	Conceptos teóricos	

2.3.1.1	El efecto Mössbauer	33
2.3.1.2	Espectroscopía Mössbauer de transmisión	36
2.3.1.3	La forma de la línea	37
2.3.1.4	El corrimiento isomérico	38
2.3.1.5	El desdoblamiento cuadrupolar	40
2.3.2	Método experimental	
2.3.2.1	El núcleo sonda	41
2.3.2.2	El equipo y el análisis de datos	43
2.3.2.3	Adaptación del equipo para las medidas a baja temperatura	46
2.4	Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de Medición de Vidas Medias (PALS)	
2.4.1	Conceptos teóricos	
2.4.1.1	Aniquilación de positrones en un material	48
2.4.1.2	Formación de positronio	49
2.4.1.3	Información obtenida a partir de una medida PALS	50
2.4.2	Método experimental	
2.4.2.1	La fuente de positrones	54
2.4.2.2	El equipo y el análisis de datos	57
3	Aplicaciones previas de las técnicas nucleares a sistemas de interés biológico	
3.1	Introducción	65

3.2	Revisión de los trabajos reportados en la literatura	
3.2.1	Correlaciones Angulares Perturbadas	66
3.2.2	Espectroscopía Mössbauer	71
3.2.3	Espectroscopía de Aniquilación de Positrones	74
3.3	Discusión de la información obtenida	78
4	Experimental	
4.1	Introducción	81
4.2	Experimentos PAC en complejos metálicos	
4.2.1	Estado del arte	82
4.2.2	Experimental	85
4.2.2.1	Estudios PAC de ^{111}In -DTPA	87
4.2.2.2	Estudios PAC de complejos poliaminocarboxílicos de ^{181}Hf	
4.2.2.2.1	Sólidos que resultan a partir de HfF_4 y EDTA (o DTPA)	92
4.2.2.2.2	Sólidos que resultan a partir de HfOCl_2 (o ZrOCl_2) y DTPA	98
4.3	Experimentos Mössbauer en clusters de Fe-S	
4.3.1	Estado del arte	120
4.3.2	Experimental	125
4.3.2.1	Medidas Mössbauer en el sistema $^{57}\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$	125
4.3.2.1.1	Muestra en estado sólido	126

4.3.2.1.2 Muestra en solución	128
4.3.2.1.3 Muestra en distintas condiciones de humedad	131
4.4 Experimentos de Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en sistemas tisulares	
4.4.1 Estado del arte	136
4.4.2 Experimental	144
4.4.2.1 Preparación de la fuente de positrones	145
4.4.2.2 Medidas PALS en tejidos	
4.4.2.2.1 Muestras estudiadas	147
4.4.2.2.2 Estudios preliminares	148
4.4.2.2.3 Estudio en tejidos tumorales	154
4.4.2.2.4 Estudios en tejidos normales	156
5 Discusión y conclusiones	161

Capítulo 1

Introducción

El área interdisciplinaria que yace entre la biología, la medicina, la química y la física posee un interés creciente. A este espacio convergen académicos de distinta preparación y con diferentes intereses. Del mismo modo que la contribución de la física a la tecnología actual es bien reconocida, es importante considerar el sustento que esta ciencia ha dado a la bioquímica, la biología y la medicina durante siglos.

En la segunda mitad del siglo pasado aparecieron varias técnicas nucleares basadas en las interacciones hiperfinas, esto es, las interacciones del espín nuclear con campos electromagnéticos extranucleares. Entre ellas se cuentan Resonancia Magnética Nuclear, Orientación Nuclear, Resonancia Doble Electrón–Núcleo, Resonancia de Espín Muónico, Correlaciones Angulares Perturbadas y Espectroscopia Mössbauer. Estas técnicas fueron aplicadas con éxito al estudio nanoscópico de materiales condensados, con distinto impacto según el caso.

Existe otra técnica nuclear, no hiperfina, aplicada al estudio de materiales: Espectroscopía de Aniquilación de Positrones (PAS). PAS tiene una importante vinculación con la Tomografía de Emisión de Positrones, técnica de creciente importancia en el diagnóstico oncológico. En el trabajo de tesis se utilizará la técnica PAS en el modo de medición de vidas medias (PALS). La inclusión de PALS en este trabajo se basa en que también permite caracterizar nanoscópicamente los materiales, en la compatibilidad instrumental con los métodos nucleares mencionados y en su disponibilidad en nuestra Facultad y en el país.

El objetivo general de este trabajo de tesis es establecer hasta dónde algunas de estas técnicas pueden proveer información de impacto cuando son aplicadas para el estudio de materiales de interés en biología. En particular, el plan se centra en la utilización de técnicas basadas en la detección de radiaciones gama emitidas en procesos nucleares específicos: Correlaciones Angulares Perturbadas (PAC), Espectroscopia de Aniquilación de Positrones en el modo de medición de vidas medias (PALS) y Espectroscopia Mössbauer (EM).

Si bien se trata de métodos ampliamente utilizados en la investigación en materia condensada, su aplicación en la determinación de propiedades físicas de materia blanda y sistemas biológicos es, en comparación, escasa. En el área de la biología existen varios trabajos que se destacan por su calidad experimental y por el aporte que hacen a la ciencia mientras que otras investigaciones son de escasa calidad o no es claro el aporte que hacen al conocimiento.

La intención del trabajo de tesis es analizar cuál es el alcance de estos métodos nucleares en la investigación de materiales de interés biológico y estudiar mediante dichos métodos selectos sistemas de distinta complejidad, desde moléculas orgánicas sencillas hasta tejidos.

Estas técnicas nucleares permiten obtener información muy precisa y acotada sobre los materiales en estudio. Así, es de especial importancia tener en claro lo que se puede concluir o no a partir de este tipo de medidas. En el caso de las técnicas espectroscópicas PAC y EM, éstas son particularmente importantes para elucidar la naturaleza del arreglo atómico alrededor de átomos especiales. PALS, por su parte, permite obtener información sobre las dimensiones de los espacios vacíos presentes en la muestra bajo estudio. De esta manera, aparece necesaria la aplicación de otras técnicas para poder arribar a un entendimiento medianamente global de los sistemas

investigados. Con ese objetivo, los sistemas serán caracterizados en forma complementaria por difracción de rayos X, termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido, entre otras.

Específicamente, se realizarán experimentos PAC en complejos metálicos poliaminocarboxilados en los cuales el átomo metálico se encuentra coordinado por grupos funcionales de distinta naturaleza, como sucede en los sitios metálicos de las metaloproteínas. La Espectroscopía Mössbauer se utilizará para caracterizar los sitios de hierro en pequeños complejos orgánicos que incluyen centros de hierro y azufre. Paralelamente se abordarán investigaciones PALS de tejidos normales y tumorales.

Capítulo 2

Las técnicas nucleares utilizadas

2.1 Introducción

Muchos de los formidables avances en la medicina que se observan en las nuevas formas de diagnóstico y tratamiento (Resonancia Magnética Nuclear, Medicina Nuclear, Radioterapia) provienen de conocimientos y técnicas aportadas por la Física Nuclear. [Nup 01].

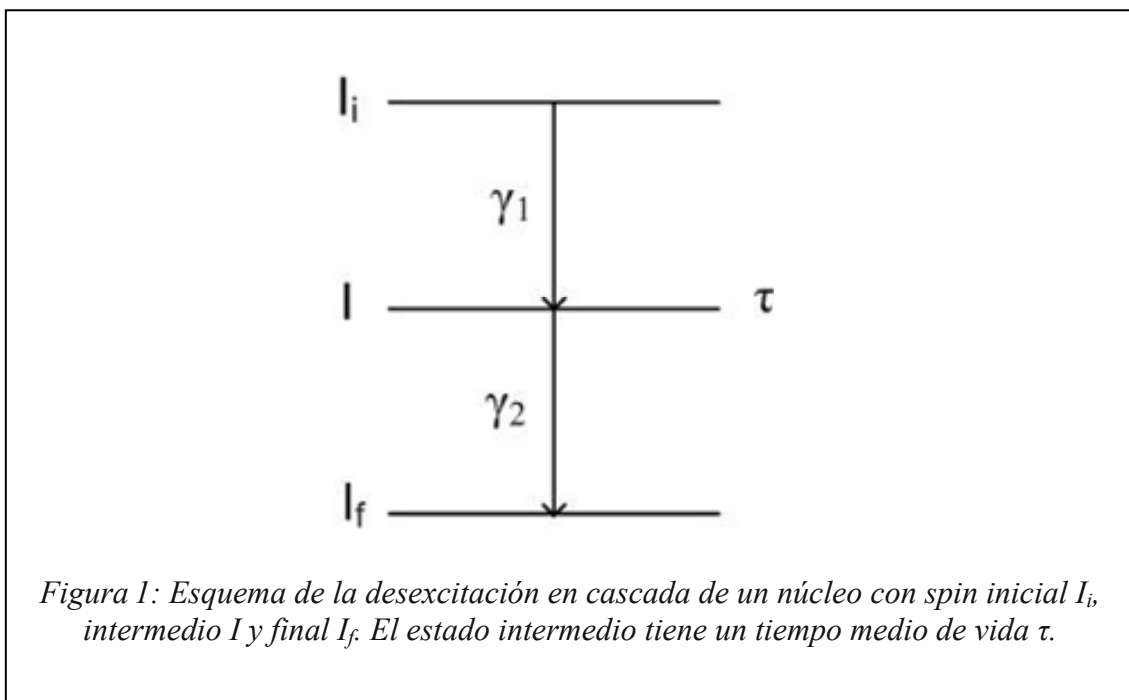
Las tres técnicas elegidas permiten determinar propiedades nanoscópicas de los materiales y están basadas en la detección de radiaciones gama emitidas en procesos nucleares específicos. La Espectroscopía Mössbauer y la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas son “técnicas hiperfinas”, esto es, están basadas en la interacción del espín nuclear de átomos especiales (átomos sonda) con los campos extranucleares. Ambas técnicas permiten conocer el entorno atómico de las sondas. La Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de medición de vidas medias determina la vida media del positrón en el material de estudio y da información sobre los espacios libres (huecos) en dicho material.

A partir de aquí, las técnicas serán tratadas en forma separada.

2.2 Técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas (PAC)

Las bases de la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas (PAC, de *Perturbed Angular Correlations*) pueden encontrarse ampliamente desarrolladas en la literatura [Fra 65, Ste 75, Sch 96]. Aquí sólo se desarrollarán los puntos importantes para la comprensión de los resultados experimentales.

El método PAC se basa, como se ha mencionado, en la determinación de la interacción de los momentos nucleares con los campos extranucleares, esto es, las interacciones hiperfinas.



La técnica PAC requiere de átomos radiactivos (núcleos sonda) que se desexciten mediante la emisión de dos radiaciones gamma en cascada (Figura 1).

La probabilidad de emisión de radiación en una determinada dirección depende del ángulo entre esa dirección y el espín nuclear. Entonces, debido a la conservación del momento angular se puede esperar que en el caso de una cascada gamma la dirección de

emisión de la segunda radiación esté angularmente correlacionada con la primera. Esta correlación angular existe en la medida en que la dirección del espín nuclear al final de la primera transición coincida con la dirección del espín al momento de iniciarse la segunda transición. Este punto se desarrollará, para el caso de espín $I = 5/2$ (que es el que interesa en esta tesis) en la sección 2.2.1.2.

La correlación angular de la cascada se altera si la dirección del espín en el estado intermedio cambia durante el tiempo que el núcleo está en este estado y esto puede ocurrir si existe una interacción entre los momentos nucleares (que dependen del espín) y los campos extranucleares. En ese caso se dice que la correlación angular está perturbada. Efectivamente, en el caso de núcleos que tienen un momento magnético dipolar la aparición de una *perturbación* de la correlación se puede esperar cuando existan un campo magnético extranuclear y análogamente cuando el núcleo tenga un momento cuadrupolar eléctrico y esté en una posición donde existe un gradiente de campo eléctrico producido por cargas externas habrá también una *perturbación*. De hecho, también existe la posibilidad de interacciones combinadas.

Como en el trabajo de tesis sólo vamos a tener contacto con las interacciones cuadrupolares eléctricas en lo que sigue se presenta sólo ese tipo de interacción. Así, la medida de la distribución angular de la segunda radiación respecto de la primera en función del tiempo transcurrido entre ambas dará idea de las características de la distribución electrónica y atómica en torno de dichos núcleos.

2.2.1 Conceptos teóricos

2.2.1.1 La correlación angular entre rayos gama

En esta tesis se realizarán medidas de Correlaciones Angulares Perturbadas de los núcleos radiactivos ^{181}Ta y ^{111}Cd , ambos con espín del estado intermedio $I=5/2$. La correlación angular $W(\theta)$ entre los rayos gama de la cascada, para $I=5/2$, está dada por:

$$W(\theta) = [1 + A_{22}(\frac{3}{2}\cos^2\theta - \frac{1}{2})]$$

donde $W(\theta)$ es la probabilidad de que la segunda radiación esté a un ángulo θ con la dirección de emisión de la primera radiación. El término A_{22} o amplitud de la anisotropía depende del espín de los estados nucleares y de la multipolaridad de los rayos gama.

2.2.1.2 Perturbación de la correlación angular en el caso de interacciones estáticas

Como ya fue adelantado la correlación angular existente entre dos rayos gama en cascada puede modificarse si existe una interacción de los momentos nucleares en el nivel intermedio con los campos extranucleares diciéndose que la correlación angular está perturbada. En particular si el núcleo posee un momento cuadrupolar eléctrico Q y está en un sitio donde existe un gradiente de campo eléctrico (caracterizado por un tensor V_{ij}) producido por una distribución de cargas alrededor del mismo, se dice que la perturbación de la correlación angular es del tipo cuadrupolar eléctrica y una medida de esta perturbación permitirá obtener información sobre la estructura electrónica y molecular local alrededor de la sonda PAC.

Puede demostrarse [Fra 65] que en el caso de muestras policristalinas (microcristales orientados al azar) la correlación angular perturbada está dada por:

$$W(\theta, t) = 1 + A_{22} G_{22}(t) \left(\frac{3}{2} \cos^2 \theta - \frac{1}{2} \right)$$

Así, el cambio en la correlación angular aparece simplemente como un factor multiplicativo que es función del tiempo que el núcleo está en el estado intermedio $G_{22}(t)$. Esta función, llamada factor de perturbación, es la que contiene la información sobre las interacciones nucleares mencionadas. Como la función $G_{22}(t)$ representa la pérdida de correlación angular debida al movimiento de precesión del espín nuclear en el estado intermedio por la presencia del campo extranuclear, se sigue que $G_{22}(0)$ debe ser igual a 1 ya que en $t=0$ la correlación debe ser no perturbada. También si el espín en su movimiento de precesión debido a la interacción cuadrupolar hace una revolución en un tiempo τ_Q , $G_{22}(t)$ debe ser una función periódica del tiempo de período τ_Q .

Para el caso particular de núcleos con un nivel intermedio de espín 5/2 sometidos a gradientes de campo eléctrico estáticos y orientados al azar la función de perturbación $G_{22}(t)$ tiene la siguiente forma:

$$G_{22}(t) = S_{20} + \sum_{n=1}^3 S_{2n} \cos(\omega_n t)$$

donde ω_n son las frecuencias de transición entre los subniveles magnéticos del nivel intermedio de energía de la cascada gama debido a la presencia del gradiente de campo eléctrico. Estas frecuencias, mostradas esquemáticamente en la figura 2, se

relacionan con la frecuencia cuadrupolar $\omega_Q = \frac{\pi \cdot e \cdot Q \cdot V_{zz}}{20 \cdot h}$ por $\omega_n = g_n(\eta) \omega_Q$ (ver

apéndice para más detalles). Los coeficientes $g_n(\eta)$ son funciones conocidas del

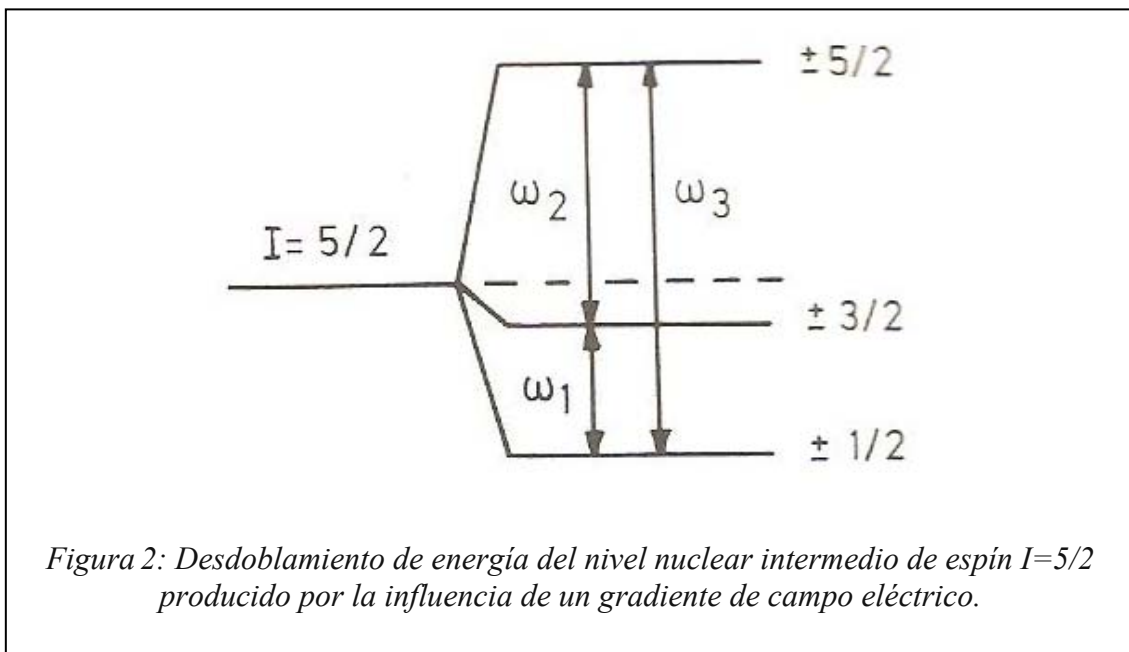
parámetro de asimetría $\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}$ donde V_{kk} ($k= x, y, z$) denota las componentes

principales del tensor gradiente de campo eléctrico. En muestras policristalinas sin textura los coeficientes S_{2n} ($\sum_0^3 S_{in} = 1$) son funciones conocidas del parámetro de asimetría η .

En el caso de que exista una distribución de frecuencias, la función de perturbación toma la forma:

$$G_{22}(t) = S_{20} + \sum_{n=1}^3 S_{2n} \cos(\omega_n t) e^{-\delta \omega_n t}$$

donde la función exponencial da cuenta de una distribución de frecuencias lorentziana de ancho δ alrededor de ω_0 .



Para el caso en que se distingan fracciones de átomos sonda sometidas a distintos gradientes de campo eléctrico, lo que acontece por ejemplo cuando hay más de una fase presente en la muestra, el factor de perturbación se escribe como la combinación lineal:

$$G_{22} = \sum f_i G_{22}^i(t)$$

donde f_i es la fracción relativa de núcleos que experimentan una dada perturbación $G_{22}^i(t)$.

2.2.1.3 Perturbación de la correlación angular en el caso de interacciones dinámicas

Si el gradiente de campo eléctrico en el sitio de la sonda cambia en el tiempo que transcurre entre la emisión de los dos rayos gama de la cascada se habla de perturbación de la correlación angular dependiente del tiempo y las ecuaciones deben ser modificadas.

Éste es el caso de moléculas que experimentan procesos dinámicos entre la emisión de los dos rayos gama, por ejemplo en el caso de moléculas en solución que experimentan una rotación difusional debida al movimiento browniano de la muestra. En este caso la medida PAC puede proveer información sobre los tiempos característicos del proceso dinámico.

Consideremos una molécula donde el núcleo sonda está sometido a un gradiente de campo eléctrico estático que resulta en una frecuencia de interacción cuadrupolar ω_Q . Si la molécula se encuentra en solución, debido al movimiento browniano, ésta se reorienta con un tiempo de correlación τ_c , siendo τ_c el tiempo entre colisiones o, lo que es lo mismo, el tiempo que la molécula permanece en una determinada orientación. El tiempo de correlación es proporcional al volumen de la molécula y a la viscosidad de la solución e inversamente proporcional a la temperatura. El efecto de este movimiento sobre la correlación angular va a depender de la relación entre el tiempo de precesión del espín en el estado intermedio ($\tau_Q = \frac{\pi}{3\omega_Q}$) y el tiempo entre las colisiones (τ_c).

El tratamiento de las correlaciones angulares con perturbaciones debidas a campos extranucleares dinámicos es complejo y puede requerir de un tratamiento numérico para resolver el problema. En casos extremos existen expresiones analíticas.

Para difusión rotacional rápida ($\omega_Q \cdot \tau_c \ll 1$), la fluctuación de la interacción cuadrupolar es rápida y el núcleo pierde coherencia de fase. La función de perturbación se convierte en un simple decaimiento exponencial [Kar 64] que no da información sobre el entorno de la sonda:

$$G_{22}(t) = e^{-\lambda t}$$

donde λ es el factor de relajación que, para interacciones dinámicas rápidas cumple la relación $\lambda \approx \omega_Q^2 \cdot \tau_c$.

Si hubiera sondas ligadas a moléculas de distinto tipo, el factor de perturbación se puede escribir como:

$$G_{22}(t) = \sum_i f_i \cdot e^{-\lambda_i t}$$

donde f_i es la fracción de sondas ligadas a moléculas de un tipo a la cual le corresponde un factor de relajación λ_i .

En el límite de reorientaciones muy rápidas ($\tau_c \rightarrow 0$) $G_{22}(t)$ tiende a 1, obteniéndose una situación equivalente a una correlación angular no perturbada.

En el caso de difusión rotacional lenta ($\omega_Q \cdot \tau_c \gg 1$) la función de perturbación de la interacción estática $G_{22}(t)$ resulta amortiguada exponencialmente por el factor $e^{-\lambda t}$:

$$G_{22}(t) = e^{-\lambda t} \left[S_{20} + \sum_{n=1}^3 S_{2n} \cos(\omega_n t) e^{-\delta \omega_n t} \right]$$

donde λ es el factor de relajación que en estos casos es aproximadamente la inversa del tiempo de correlación $1/\tau_c$. En este caso muchos núcleos sonda pueden ejecutar algunos períodos de precesión antes de que cambie la orientación de la

molécula. No obstante, existirá una lenta pérdida de coherencia de fase de la precesión nuclear debida a la reorientación lenta de la molécula, siendo los núcleos que viven más tiempo en el nivel intermedio aquellos que se ven más afectados por el campo externo fluctuante. En el límite de tiempos largos la pérdida de correlación angular es total y $G_{22}(t)$ tiende a cero.

Finalmente, en el caso en que las fluctuaciones sucedan en tiempos comparables con la escala temporal dada por τ_Q la correlación angular se pierde en tiempos cortos. En este caso, si bien no existe una expresión analítica, se espera que el factor de perturbación vaya a cero en tiempos cortos.

2.2.2 Método experimental

2.2.2.1 El núcleo sonda

Como ya se ha señalado, para que las interacciones hiperfinas de un átomo sean factibles de estudiarse por la técnica PAC, es necesario que éste se desintegre emitiendo dos radiaciones gama en cascada. Las mejores “sondas PAC” son los isótopos radiactivos ^{111}Cd y ^{181}Ta . Desafortunadamente estos isótopos no son comunes en sistemas biológicos, ni tampoco lo son sus isótopos padres ^{111}Ag , $^{111\text{m}}\text{Cd}$, ^{111}In y ^{181}Hf .

El isótopo $^{111\text{m}}\text{Cd}$ puede sustituir elementos como Cu o Zn que son más comunes en la naturaleza, pero tiene un período de semidesintegración muy corto ($T_{1/2} = 48,6$ minutos). Dicha vida media resulta sumamente inconveniente ya que luego de producir la sonda se necesita realizar una separación isotópica que acorta todavía más el tiempo disponible para preparar la muestra sin que la actividad disminuya a niveles

inadecuados para las mediciones PAC. En el caso de ^{111}Ag , el $T_{1/2}$ es favorable (7,45 días) pero la cascada PAC está poco poblada (5%).

En los experimentos aquí descritos se utilizaron dos sondas PAC: ^{181}Ta (que se produce por desintegración del ^{181}Hf) y ^{111}Cd (obtenido, en este caso, por desintegración del ^{111}In). De aquí en adelante, y por un abuso de lenguaje, se llamará “sonda PAC” a los radioisótopos padre ^{181}Hf y ^{111}In , ya que se trata de las formas atómicas en que se colocan las sondas PAC en las muestras.

a) $^{181}\text{Hf} (\beta^-) ^{181}\text{Ta}$

La cascada γ - γ (133 - 482) keV, poblada por la desintegración β^- del ^{181}Hf (con un período de semidesintegración de 42,4 días), se utilizó para medir la interacción cuadrupolar del estado +5/2 de 482 keV del ^{181}Ta (ver Figura 3). Dicho estado tiene una vida media $\tau = 10,67$ (5) ns y un momento cuadrupolar $Q = 2,53$ (10) barn ($1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$).

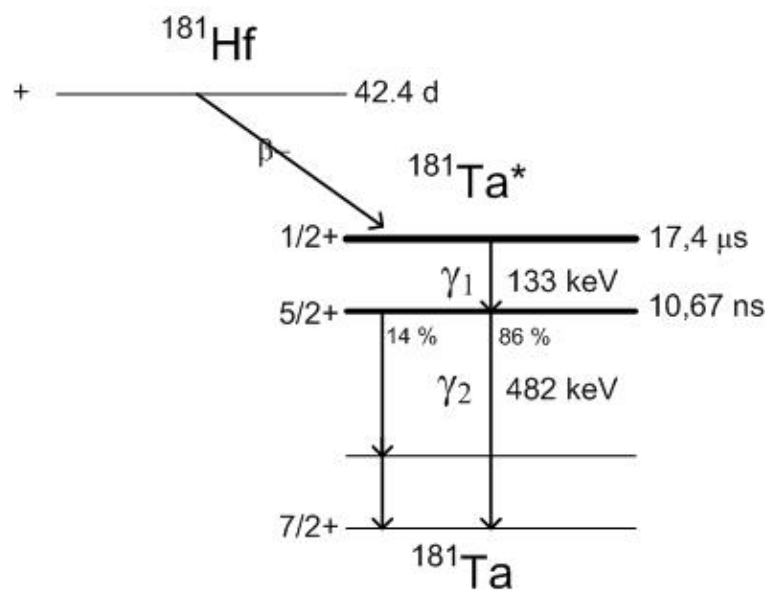


Figura 3: Esquema de desintegración radiactiva del núcleo ^{181}Hf .

El ^{181}Hf es la sonda de mayor accesibilidad en nuestro laboratorio. Se obtiene por irradiación con neutrones térmicos en el reactor RA3 de la Comisión Nacional de Energía Atómica mediante la reacción nuclear $^{180}\text{Hf} (n, \gamma) ^{181}\text{Hf}$. El ^{180}Hf , con una abundancia natural del 35,1 %, se envía a irradiar como parte de hafnio metálico o de cloruro de hafnilo octahidratado ($\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) según las necesidades experimentales.

En el caso del $^{181}\text{Hf-Hf}^0$ el dopaje se realiza por disolución del metal en ácido fluorhídrico y posterior agregado de la solución de fluoruro de hafnio radiactivo al material a investigar. El $^{181}\text{Hf-HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ por su parte, puede ser incluido en las preparaciones radiactivas luego de una simple disolución en agua destilada

El isótopo ^{181}Hf presenta las ventajas de su semiperíodo adecuado combinado con un tiempo de vida media largo del estado inicial de la cascada. Sin embargo, este isótopo no cuenta con aplicaciones importantes en el campo de la biología

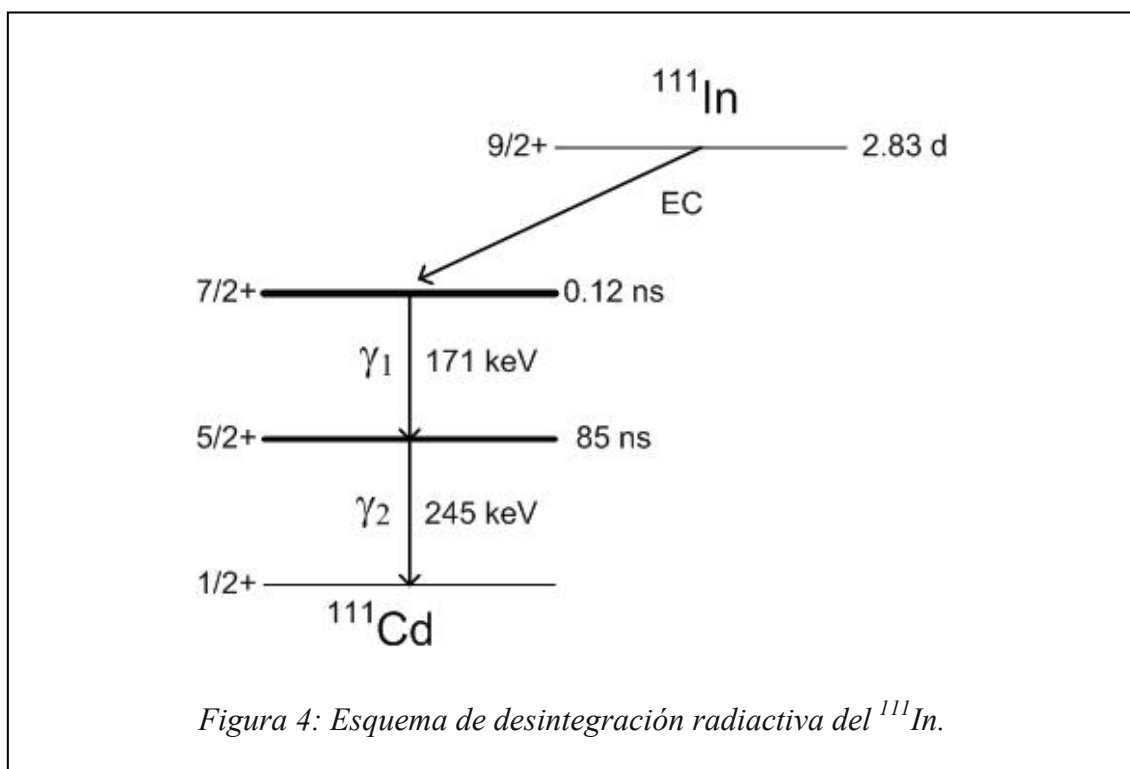
b) $^{111}\text{In} (\text{EC}) ^{111}\text{Cd}$

La cascada γ - γ (171- 245) keV, poblada por la desintegración por captura electrónica (EC) del ^{111}In (con un semiperíodo de 2,83 días), se utilizó para medir la interacción cuadrupolar del estado +5/2 de 245 keV del ^{111}Cd (ver Figura 4). Dicho estado tiene una vida media $\tau = 85$ ns y un momento cuadrupolar $Q = 0,83$ (13) barn).

Las medidas utilizando ^{111}In se realizaron en el Instituto Helmholtz de radiaciones y Física Nuclear (Helmholtz Institut für Strahlen und Kernphysik) sito en Bonn (Alemania) donde el ^{111}In se obtuvo comercialmente como $^{111}\text{InDTPA}$ (dietiléntriaminopentaacetato de indio) en buffer fosfato a pH 7,0-7,6.

Esta sonda PAC presenta, en ciertos entornos atómicos, el problema de la aparición de los *after effects* del proceso de captura electrónica. Esto es, cuando se produce la captura electrónica, un electrón de la capa K es absorbido por el núcleo. El hueco electrónico resultante se propaga a la superficie del átomo, produciendo varios electrones Auger a su paso. Como consecuencia, el átomo sonda queda en un estado altamente ionizado (el estado de carga del ^{111}Cd puede ser tan alto como +9 [Sch 71]). Si debido a esta razón se producen variaciones en la distribución de carga en torno de la sonda durante su permanencia en el estado intermedio de la cascada gama, aparece una perturbación de la medida PAC que no permite ver el entorno del átomo. No es fácil anticipar cuándo este efecto estará presente.

El semiperíodo del ^{111}In permite realizar experimentos que requieren un tiempo moderado de preparación de muestras. Una ventaja del indio es que tiene varias aplicaciones reconocidas en el campo de la química y de la biología, más allá de la utilización de su isótopo ^{111}In como sonda PAC [Cha 10].

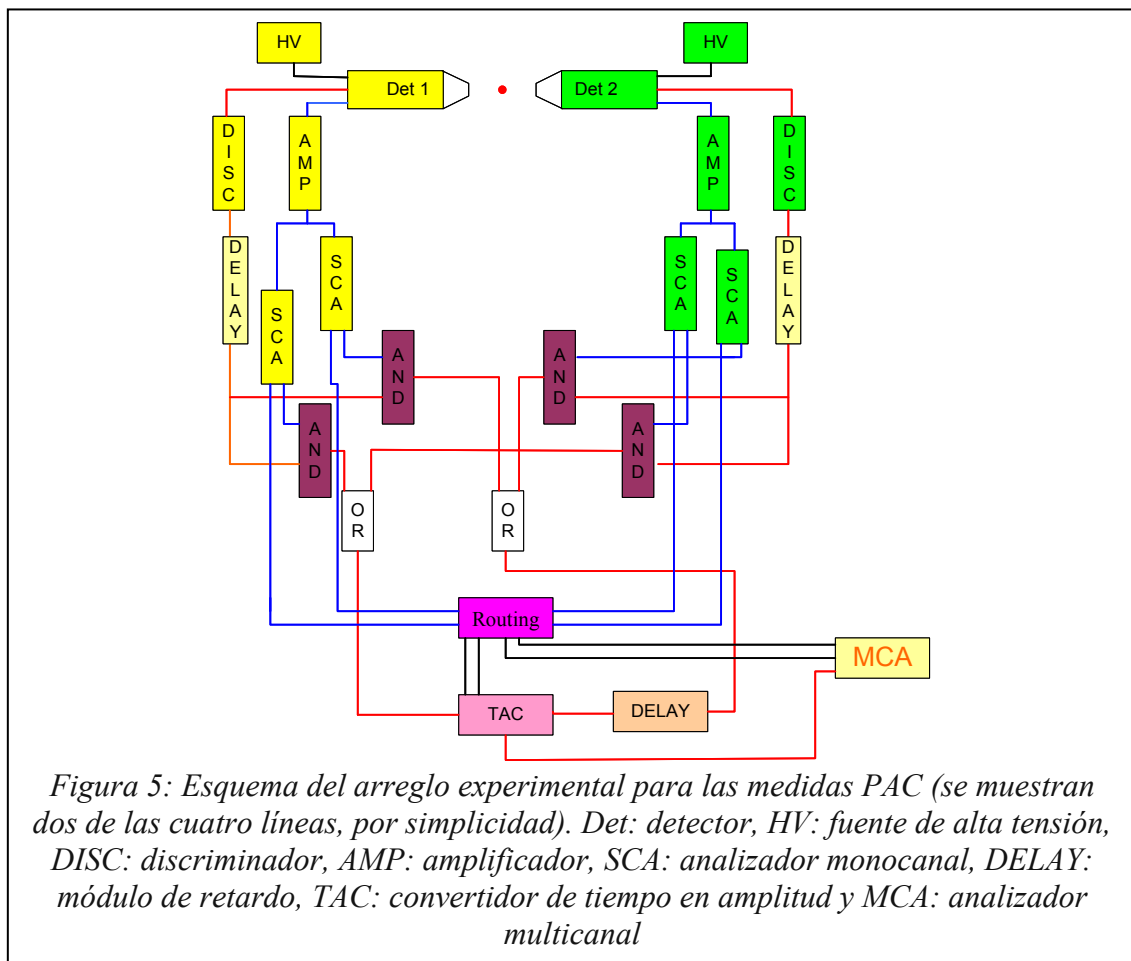


2.2.2.2 El equipo y el análisis de datos

Las medidas de Correlaciones Angulares Perturbadas consisten en la detección de dos rayos γ provenientes del mismo núcleo radiactivo; uno de ellos se utiliza como *start* (γ_1) y el segundo como *stop* (γ_2). En esta sección se describe el equipo utilizado para dichos experimentos.

El equipo consta de cuatro detectores que se arreglan coplanarmente formando ángulos de 90° y 180° entre ellos, en cuyo centro se coloca la muestra radiactiva. En la Figura 5 se muestra el arreglo experimental que se utiliza (se esquematizaron sólo dos detectores por simplicidad).

Los detectores (Det) consisten en cristales centelleadores cónicos de BaF_2 acoplados a tubos fotomultiplicadores. Los rayos γ que penetran en los cristales



producen una respuesta luminosa ultravioleta que el fotomultiplicador convierte en un haz de electrones, dando origen a un pulso de tensión proporcional a la energía del rayo γ .

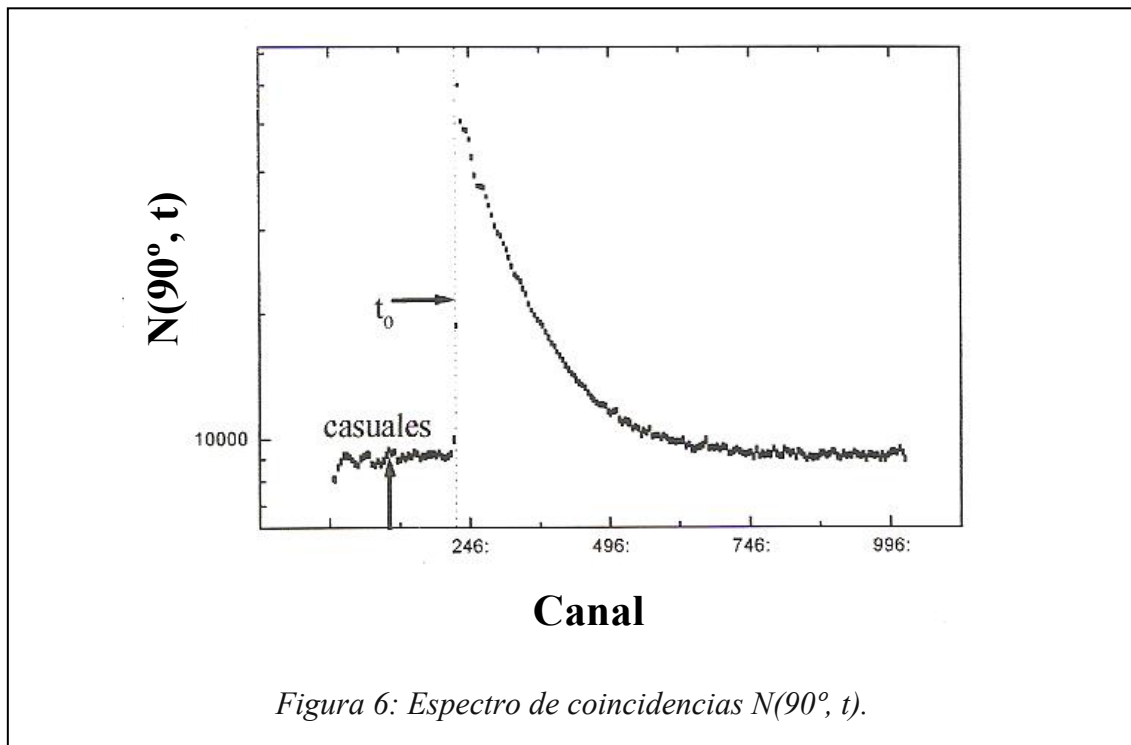
Las señales rápidas desde los ánodos de los fotomultiplicadores alimentan los discriminadores (DISC) que permiten discriminar los pulsos correspondientes a radiaciones cuya altura sobrepasa la del ruido electrónico. Así los discriminadores producen una señal lógica que indica que se ha detectado un fotón e información sobre el instante en que se produjo la detección. Este pulso lógico, negativo, se compara en una unidad lógica *AND* con los pulsos provenientes de la rama lenta para determinar si el fotón detectado se corresponde con uno de la cascada.

Las señales lentas desde los dinodos de los fotomultiplicadores son amplificadas por el módulo amplificador (*AMP*) y luego se envía esta señal a un par de módulos analizador monocanal (*SCA* del inglés *Single Channel Analyzer*) cuyas ventanas de energía se ajustan de tal manera que uno de los *SCA* analiza si la energía corresponde a γ_1 y el otro si corresponde a γ_2 . En el módulo *SCA* que se dé una condición positiva se produce un pulso lógico negativo que se envía a la unidad *AND* correspondiente la cual da salida negativa si coinciden en ella la señal del *SCA* y la que proviene del discriminador.

El módulo *AND* donde se dé la coincidencia entre la salida rápida y lenta va a enviar la señal rápida al convertidor de tiempo en amplitud (*TAC*). El *TAC* va a producir un pulso analógico cuya altura es proporcional al lapso de tiempo entre las señales *start* y *stop* (entre la detección del γ_1 y γ_2). Esta información va a ser almacenada en el analizador multicanal (*MCA*) en una memoria que corresponde a la combinación de detectores involucrados. Todas las señales *start* rápidas convergen en la entrada del *TAC*. Las señales *stop* rápidas también convergen al *TAC*, aunque después de haber sido

retardadas por un *delay* para compensar así diferencias temporales entre la rama *start* y *stop* y asegurar que el *stop* llegue después que el *start*.

Para determinar a qué par de detectores corresponde el evento γ_1 - γ_2 se utiliza una unidad de *Routing* donde se toma esta decisión haciendo coincidir las señales *start* y *stop* provenientes de los *SCA* con las señales *true start* y *true stop* provenientes del *TAC*.



El equipo utilizado para las medidas presentadas en este trabajo tiene una resolución temporal (ancho a mitad de altura, FWHM) de 0.6 ns. La determinación de la resolución temporal se explicará en más detalle al discutir la técnica PALS.

Los cuatro detectores dan lugar a 12 espectros de coincidencias en función del tiempo $N(\theta, t)$ donde θ es el ángulo entre los detectores y t es el intervalo de tiempo entre la detección de γ_1 y γ_2 :

$$N(\theta, t) = \varepsilon e^{-t/\tau} W(\theta, t) + Acc$$

donde:

A_{cc} da cuenta de las coincidencias accidentales correspondientes a la detección de rayos gamma provenientes de diferentes núcleos

$W(\theta, t)$ es la probabilidad por unidad de tiempo de detectar γ_1 y γ_2 provenientes del mismo núcleo separados por un ángulo θ y un tiempo t

$e^{-t/\tau}$ da cuenta de la probabilidad de que γ_2 ocurra a un tiempo t de γ_1 siendo τ el tiempo medio de vida del nivel nuclear intermedio.

ε es un factor que depende del tiempo de medida, de la geometría fuente-detector y de la eficiencia de los detectores. Las medidas se realizan tomando precaución de que el factor ε sea el mismo para los 12 espectros.

Un espectro típico $N(90^\circ, t)$ se muestra en la figura 6 donde aparece el número de cuentas correspondientes a las coincidencias γ_1 - γ_2 en función del número de canal. Cada canal está asociado a un intervalo de tiempo transcurrido entre γ_1 y γ_2 . Se observa que el máximo del espectro, que corresponde a la detección simultánea de γ_1 y γ_2 , esto es, $t=0$, aparece a la derecha del canal 0 debido a las diferencias de retardo entre la línea *start* y *stop*. La elección de este retardo es la que permite tener a la izquierda del tiempo cero varios canales correspondientes a “tiempos negativos” donde se registran sólo coincidencias accidentales. Esto hace posible luego hacer la corrección correspondiente. A la derecha del tiempo cero se observan las coincidencias reales mostrando la dependencia exponencial que se espera de la probabilidad de desexcitación del nivel intermedio. Superpuesta a la curva exponencial se observan oscilaciones de pequeña amplitud que corresponden al factor de perturbación $G_{22}(t)$ (incluido en $W(\theta, t)$).

Una vez hecho el descuento de casuales, los espectros $N(\theta, t)$ se combinan para determinar la anisotropía $R(t)$ entre las emisiones a 90° y 180° , en función del tiempo t :

$$R(t) = 2 \frac{N(180^\circ, t) - N(90^\circ, t)}{N(180^\circ, t) + 2N(90^\circ, t)}$$

Reemplazando por la expresión de $N(\theta, t)$ se puede reescribir como:

$$R(t) = 2 \frac{W(180^\circ, t) - W(90^\circ, t)}{W(180^\circ, t) + 2W(90^\circ, t)}$$

Y teniendo en cuenta que

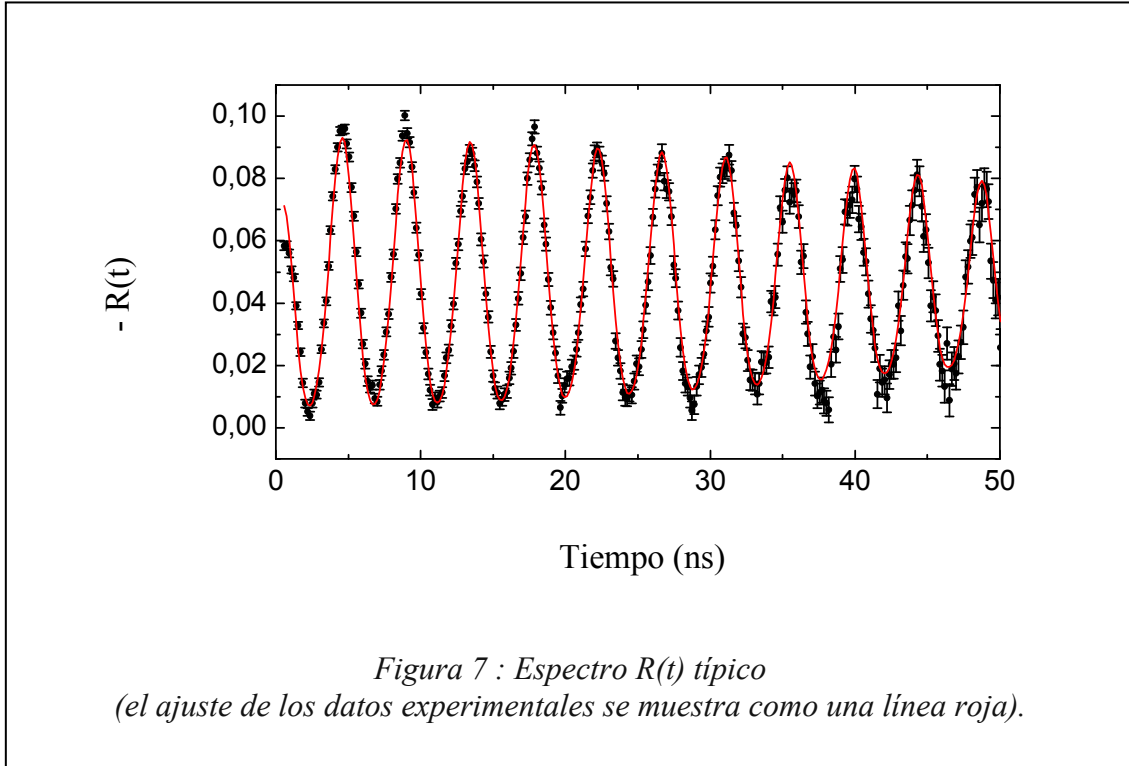
$$W(\theta, t) = 1 + A_{22}G_{22}(t)\left(\frac{3}{2}\cos^2\theta - \frac{1}{2}\right)$$

Se puede establecer que:

$$R(t) = A_{22}G_{22}(t)$$

De esta forma, determinando la relación $R(t)$ se obtiene experimentalmente el factor de perturbación $G_{22}(t)$. Un espectro típico $R(t)$ se muestra en la figura 7.

El paso siguiente para extraer las características de los campos extranucleares



que dan lugar a la perturbación es aproximar la relación experimental $R(t)$ por una combinación de factores de perturbación:

$$R(t) = A_{22} \sum_i f_i G_{22}^i(t)$$

donde cada $G_{22}^i(t)$ está dado por:

$$G_{22}(t) = S_{20} + \sum_{n=1}^3 S_{2n} \cos(\omega_n t) e^{-\delta \omega_n t}$$

como se detalló en la sección 2.2.1.3.

De esta forma, mediante un ajuste por cuadrados mínimos de los parámetros f_i , ω_{Qi} , η_i y δ_i de la expresión teórica a los datos experimentales (mostrado como una línea sólida en la figura 7) se pueden caracterizar los gradientes de campo eléctrico existentes en los sitios de los átomos sonda.

2.3 Espectroscopía Mössbauer

2.3.1 Conceptos teóricos

2.3.1.1 El Efecto Mössbauer

En 1957, Rudolf L. Mössbauer descubrió que la radiación gama emitida y resonantemente absorbida por núcleos puede ocurrir sin retroceso cuando dichos núcleos pertenecen a átomos en un sólido. Este fenómeno se conoce como “efecto Mössbauer” y le valió al descubridor el Premio Nobel de Física en el año 1961. Dicho efecto fue aplicado posteriormente al estudio de las pequeñas variaciones de energía del núcleo debidas a las interacciones hiperfinas y a la determinación de las diferencias energéticas entre el núcleo emisor y el del absorbente debidas a los distintos entornos químicos.

Consideremos la posibilidad de que ocurra absorción resonante entre dos

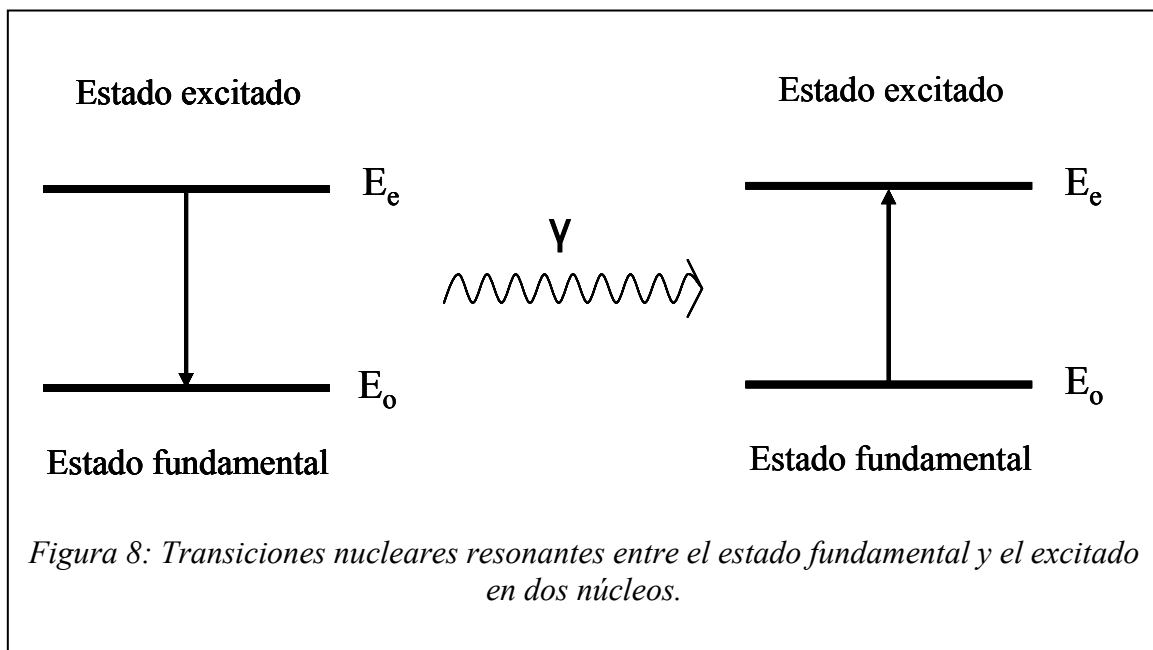


Figura 8: Transiciones nucleares resonantes entre el estado fundamental y el excitado en dos núcleos.

núcleos como los mostrados esquemáticamente en sus estados fundamental y excitado en la Figura 8. El primer núcleo emite una radiación electromagnética, un cuanto γ , durante la transición desde el estado excitado (de energía E_e) hacia el estado fundamental (de energía E_0). *¿Es posible que el segundo núcleo absorba este cuanto γ para pasar del estado fundamental al estado excitado de energía?*

En general la E_γ del fotón será menor que la energía de la transición ($E_e - E_0$) ya que el fotón tiene un impulso $p_\gamma = \frac{E_\gamma}{c}$ y en consecuencia el núcleo, que supondremos en reposo, retrocede debido a la conservación del impulso, con un impulso $p_N = p_\gamma$, llevándose una energía de retroceso E_R :

$$E_R = \frac{p_N^2}{2m} = \frac{E_\gamma^2}{2mc^2}$$

Por este motivo el fotón tendrá una energía $E_\gamma = (E_e - E_0) - E_R$, que no es suficiente para dar lugar a la absorción resonante.

En el caso de que el átomo emisor esté fuertemente unido a un sólido puede acontecer que la energía de retroceso calculada según la expresión anterior no sea suficiente para excitar al primer estado vibracional del sólido. Consecuentemente, y a los efectos de la conservación del impulso, es el sólido (o el microcristal) el que retrocede como un todo y la energía de retroceso estará dada por la expresión:

$$E_R = \frac{E_\gamma^2}{2Mc^2}$$

donde M es la masa del microcristal. Dado que M es al menos 10^{15} veces mayor que la masa de un átomo, E_R se hace despreciable lográndose de esta manera la emisión de fotones con una energía que, dentro del ancho natural de la línea γ , es igual a la energía de la transición. Con las mismas consideraciones se puede ver que existe la

posibilidad de que un núcleo rígidamente unido a un microcristal pueda absorber radiación γ sin retroceso.

El efecto Mössbauer ha sido observado en más de 100 transiciones gama en más de 70 isótopos de al menos 42 elementos diferentes. Sin embargo en el 90 % de los experimentos Mössbauer se utiliza sólo uno de los isótopos, el ^{57}Fe , hecho que explica que para mucha gente ^{57}Fe y Espectroscopía Mössbauer sean sinónimos. Dicho isótopo presenta propiedades físicas casi ideales para Espectroscopía Mössbauer [Gre] y forma parte de variados materiales de interés tecnológico.

Los átomos emisores y los átomos absorbentes forman parte de compuestos o materiales que serán llamados, de aquí en adelante, “fuente” y “absorbente” respectivamente.

La “Espectroscopía Mössbauer” (EM) puede ser empleada para el estudio de una gran variedad de fenómenos que involucren el corrimiento o división de los niveles de energía nuclear que resultan de la interacción entre el núcleo y los electrones y campos extranucleares respectivamente. Efectivamente, el hecho de que los electrones s de los átomos tengan una función de onda no nula en el sitio del núcleo hace que la energía de los niveles nucleares cambie. La dependencia de la función de onda con el entorno químico hace entonces que el corrimiento de los niveles nucleares dependa del entorno químico. Por otra parte, en el caso de núcleos que tengan un momento magnético dipolar la aparición de un desdoblamiento de los niveles de energía nuclear se puede esperar cuando exista un campo magnético extranuclear y análogamente cuando el núcleo tenga un momento cuadrupolar eléctrico y esté en una posición donde existe un gradiente de campo eléctrico producido por cargas externas habrá también un desdoblamiento. De hecho, también existe la posibilidad de interacciones combinadas.

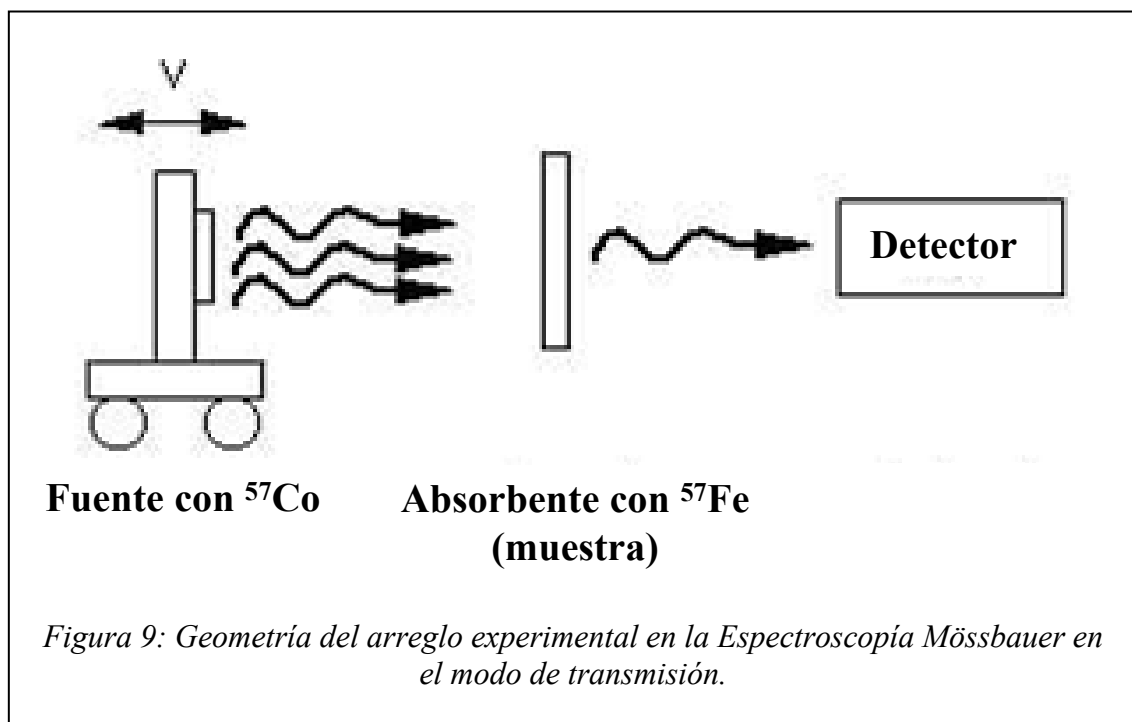
Como en el trabajo de tesis sólo vamos a tener contacto con las interacciones cuadrupolares eléctricas en lo que sigue se presenta sólo ese tipo de interacción.

Los conceptos físicos básicos del método están descriptos extensamente en la literatura [Gre], aquí se señalarán puntos de interés para la comprensión de los resultados de esta tesis.

2.3.1.2 Espectroscopía Mössbauer de transmisión

Como ya se mencionó, la Espectroscopía Mössbauer se trata de una técnica de absorción nuclear resonante basada en la posibilidad de que procesos de absorción y emisión de energía nuclear puedan ocurrir sin que los núcleos de los isótopos involucrados retrocedan. Dependiendo de la rigidez del material en el cual están los isótopos, hay una probabilidad de que este efecto ocurra.

Debido a que los átomos de la fuente y del absorbente pueden tener distinto entorno químico y entonces distintas energías de transición, la absorción se asegura



modificando la energía de la radiación por efecto Doppler, al mover uno de los sistemas respecto del otro. El modo de trabajo más común es la EM de transmisión, donde se utiliza una fuente estándar de ^{57}Co móvil que se desintegra a un estado excitado de ^{57}Fe , el cual se desexcita por emisión de una radiación gama de 14,4 keV al estado fundamental. Dicha radiación es capaz de excitar resonantemente al ^{57}Fe presente en la muestra (absorbente) que se mantiene estática. En la Figura 9 se muestra un arreglo típico de EM de transmisión.

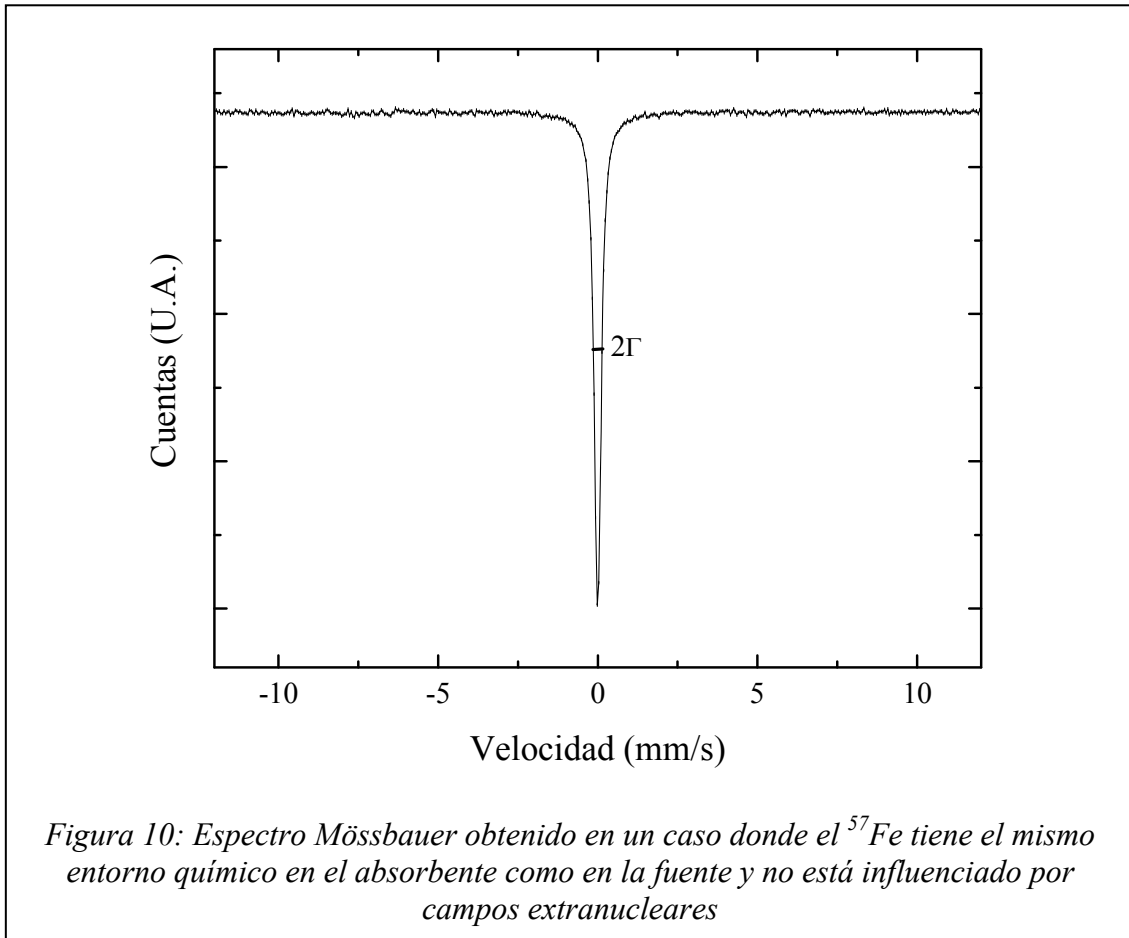
2.3.1.3 La forma de la línea

Si el isótopo Mössbauer en la fuente está en un entorno químico o atómico exactamente igual que los isótopos Mössbauer del absorbente y si este entorno es tal que no actúan campos extranucleares sobre los isótopos entonces la absorción resonante ocurrirá mayoritariamente en el caso en el cual la fuente y el absorbente estén en reposo relativo. El espectro Mössbauer correspondiente a este caso, es decir, el número de fotones transmitidos como función de la velocidad relativa entre la fuente y el absorbente será como el mostrado en la figura 10. Puede observarse que la absorción resonante (menor transmisión) aparece para velocidad cero. Aún así la línea de absorción tiene un ancho que está dado por 2Γ donde Γ es el ancho de la línea natural del rayo gama. Γ_{nat} , que es extremadamente fino y está gobernado por la relación:

$$\Gamma_{\text{nat}} \cdot \tau = \hbar$$

donde τ es la vida media del estado excitado.

La distribución de la intensidad de la línea γ en función de la energía (o de la velocidad) se puede aproximar como una distribución lorentziana de ancho 2Γ a mitad de altura. La intensidad relativa f de la línea de resonancia está determinada por la probabilidad de eventos, en la fuente y el absorbente, sin retroceso. Estos conceptos se muestran esquemáticamente en la figura 11.



2.3.1.4 El corrimiento isomérico

En la EM se observa una resonancia cuando los rayos γ emitidos por la fuente tienen exactamente la energía correcta para la excitación sin retroceso de núcleos estables en el absorbente. La diferencia de energía ΔE causada por la diferencia en la

densidad de carga de electrones s entre los átomos fuente y los del absorbente es

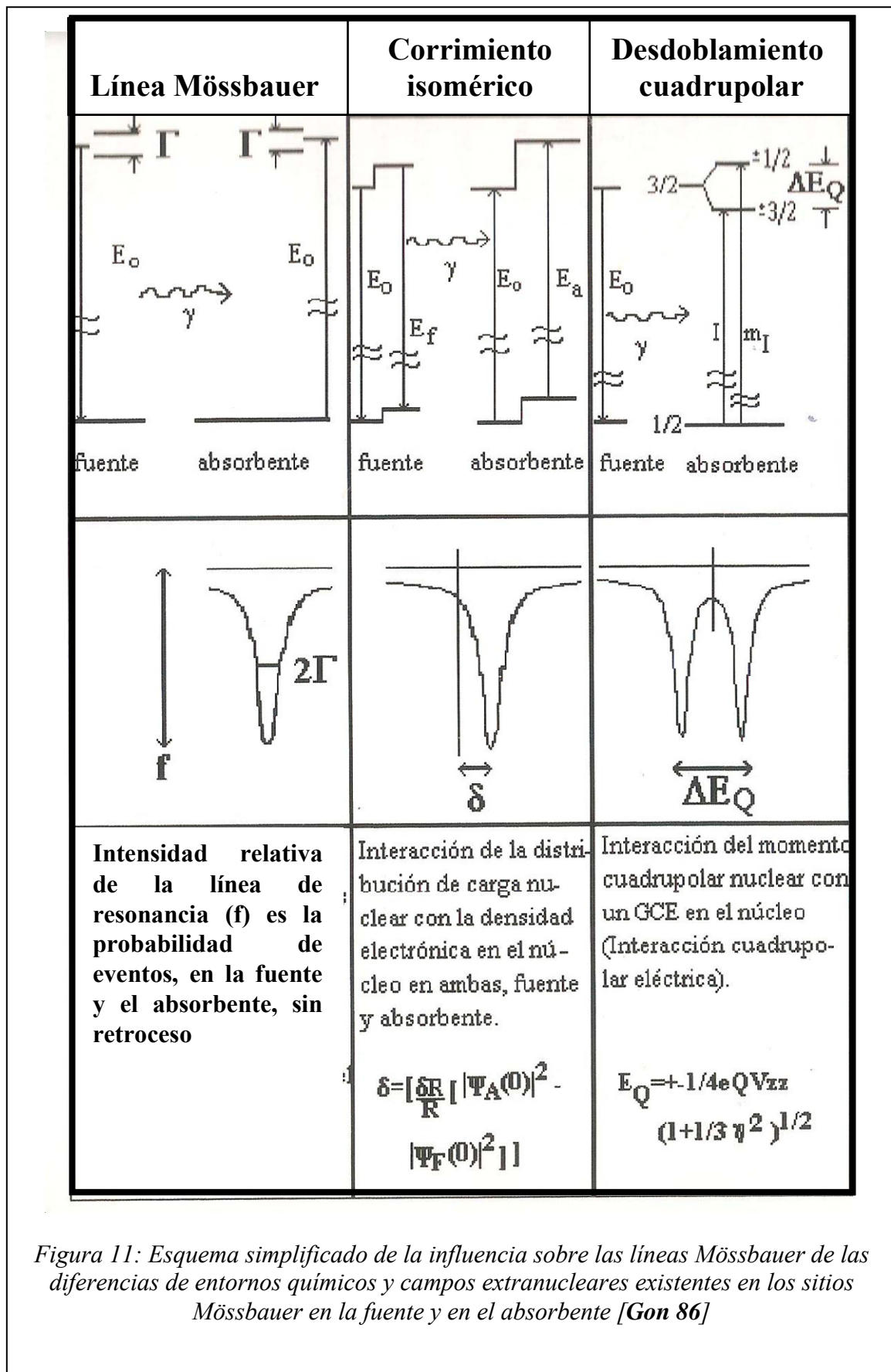


Figura 11: Esquema simplificado de la influencia sobre las líneas Mössbauer de las diferencias de entornos químicos y campos extranucleares existentes en los sitios Mössbauer en la fuente y en el absorbente [Gon 86]

conocida como el corrimiento isomérico δ y se describe en el apéndice. Debido a que las distribuciones radiales de los electrones s y d se solapan, el corrimiento isomérico δ provee también una medida de la población de electrones d y es un buen indicador del estado de oxidación en los sitios del isótopo Mössbauer [**Güt 78**].

Usualmente la diferencia de energía ΔE se da en términos de la velocidad v necesaria para compensar esa diferencia de energía por efecto Doppler:

$$v = \frac{\Delta E}{E_\gamma} c$$

Dado que los corrimientos isoméricos experimentales son relativos es deseable establecer una única referencia para los isótopos Mössbauer en distintos entornos de manera de poder comparar las mediciones. Para el caso de muestras con ^{57}Fe se usa como referencia el corrimiento isomérico de este isótopo en $\alpha\text{-Fe}$ a temperatura ambiente. En la figura 11 se resumen las características del corrimiento isomérico y su efecto en la posición de la línea Mössbauer.

2.3.1.5 El desdoblamiento cuadrupolar

Como ya fue adelantado la energía de transición entre los estados fundamental y excitado del ^{57}Fe puede modificarse si existe una interacción de los momentos nucleares con los campos extranucleares. En particular si el núcleo posee un momento cuadrupolar eléctrico Q y está en un sitio donde existe un gradiente de campo eléctrico (caracterizado por un tensor V_{ij}) producido por una distribución de cargas alrededor del núcleo, se dice que se establece una interacción cuadrupolar eléctrica que desdobra los niveles nucleares del ^{57}Fe , y una medida de las energías de absorción permitirá obtener información sobre la estructura electrónica y molecular local alrededor de la sonda Mössbauer.

Puede demostrarse (ver apéndice) que la interacción del momento cuadrupolar nuclear eléctrico eQ con el gradiente de campo eléctrico en el sitio del núcleo desdobra el nivel nuclear del estado excitado del ^{57}Fe (espín $I=3/2$) en dos subniveles ($\pm 3/2$ y $\pm 1/2$) mientras que el nivel basal $I=1/2$ se mantiene degenerado. Esto da origen a dos líneas de absorción en el espectro Mössbauer separadas por una energía Δ :

$$\Delta = \frac{1}{2} eQV_{zz} \left(1 + \frac{\eta^2}{3} \right)^{1/2}$$

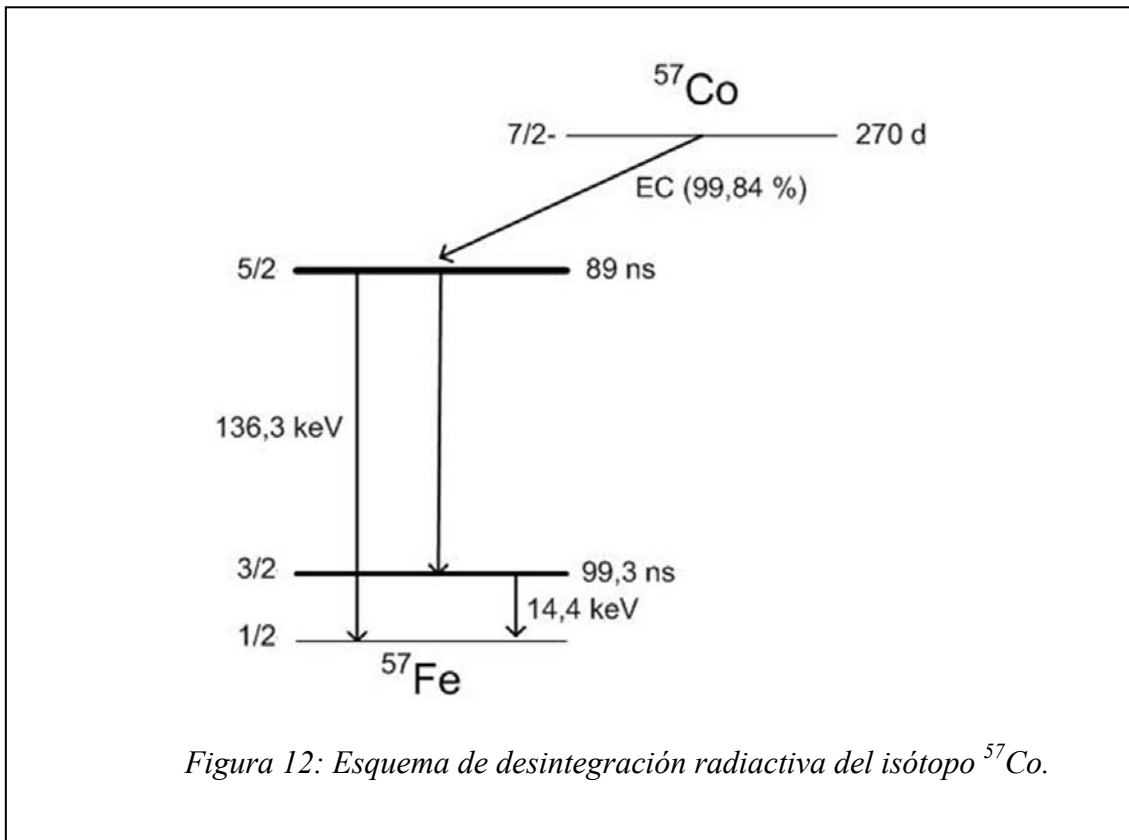
que es el llamado desdoblamiento nuclear cuadrupolar y origina en el espectro Mössbauer dos líneas de resonancia. En el caso de muestras policristalinas (microcristales orientados al azar) las líneas son de la misma intensidad (caso de la figura 11). Es de notar que la información que brinda la medida de Δ contiene las cantidades V_{zz} y η , siendo imposible conocer ambas por separado. Experimentalmente Δ se obtiene de la separación entre las dos líneas Mössbauer y δ del centroide del espectro. En la figura 11 se resumen las características del desdoblamiento cuadrupolar y su efecto en el espectro Mössbauer.

2.3.2 Método experimental

2.3.2.1. El núcleo sonda

En las medidas Mössbauer presentadas en esta tesis se utilizó como núcleo sonda el ^{57}Fe . El fotón necesario para la transición nuclear del ^{57}Fe es provisto por la “fuente Mössbauer” que consiste en ^{57}Co radiactivo diluido en una matriz cúbica y no magnética de rodio (en estas condiciones la línea de emisión es única) de actividad nominal 50 mCi. El ^{57}Co decae a ^{57}Fe con un semiperíodo de 270 días por captura

electrónica seguida de la emisión de un fotón de 122 keV, produciendo con alta probabilidad el estado excitado del núcleo de ^{57}Fe de espín nuclear $I=3/2$. En algunos de esos núcleos la transición al estado fundamental ($I=1/2$) puede ocurrir sin retroceso, liberando un rayo gama de energía 14,4 keV extremadamente bien definida (ancho de línea $\Gamma= 4,9 \cdot 10^{-9}$ eV). Un esquema de la desexcitación del ^{57}Co se muestra en la Fig. 12.



La abundancia relativa del ^{57}Fe en el hierro natural es bastante baja (2,19 %) pero el isótopo tiene una alta sección efectiva de captura del rayo gama de 14,4 keV lo cual permite obtener, en la mayoría de los compuestos inorgánicos de hierro, buenos espectros Mössbauer en tiempos prudenciales. Sin embargo, cuando el contenido de hierro de la muestra es bajo (como sucede en proteínas o en aleaciones de hierro muy diluidas) es necesario un enriquecimiento isotópico de la muestra.

2.3.2.2 El equipo y el análisis de datos

Los experimentos Mössbauer presentados en esta tesis fueron realizados en la geometría de transmisión convencional. El espectrómetro Mössbauer clásico consiste en dos ramas, una de adquisición y otra de control de velocidad. Ambas convergen a un multiescalímetro. Un esquema en bloques del equipo Mössbauer se muestra en la figura 13.

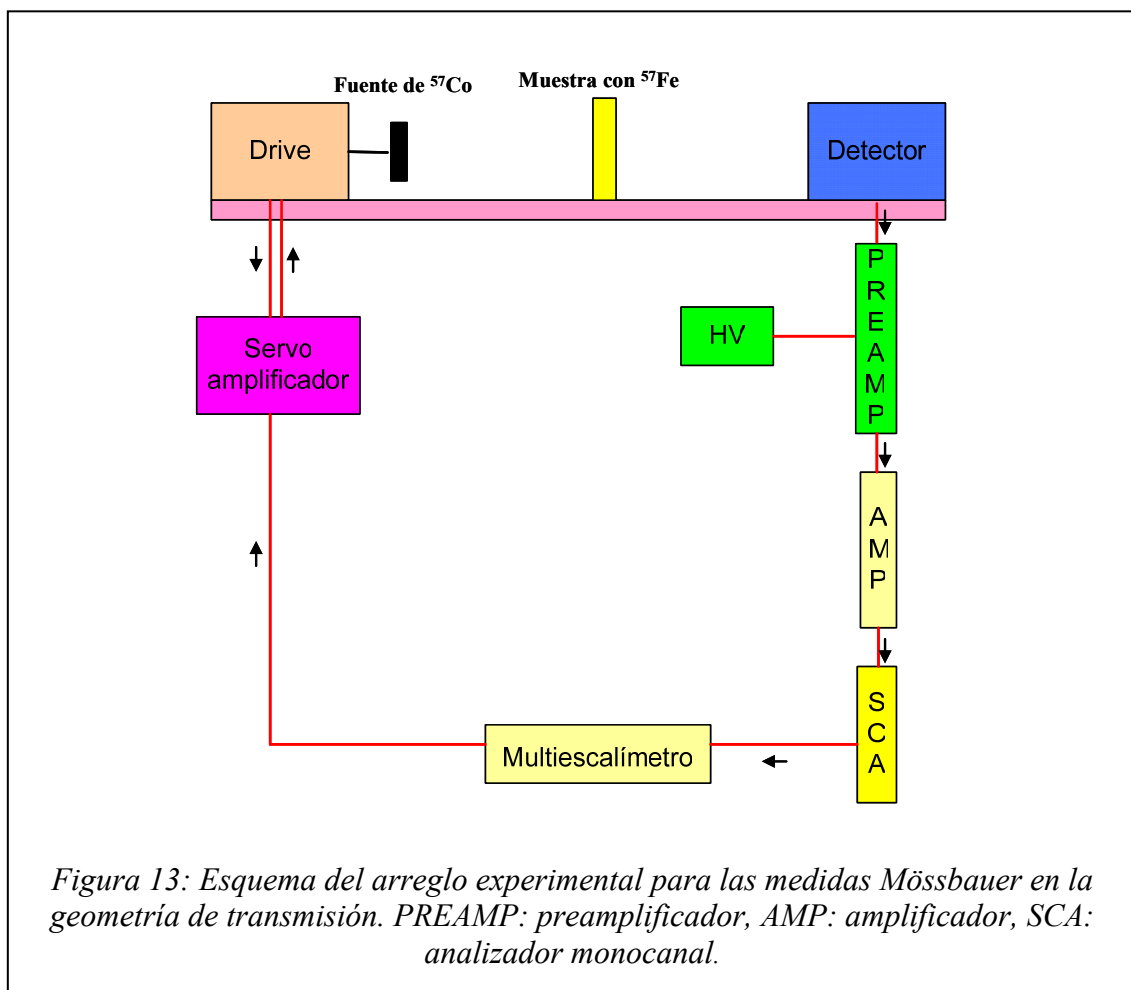


Figura 13: Esquema del arreglo experimental para las medidas Mössbauer en la geometría de transmisión. PREAMP: preamplificador, AMP: amplificador, SCA: analizador monocanal.

La rama de adquisición consta de un detector gaseoso del tipo contador proporcional cuya señal es amplificada para ser analizada por un analizador monocanal (SCA). En caso de que el rayo detectado fuera de la energía de la desexcitación de interés, se acumula una cuenta en el canal habilitado del multiescalímetro.

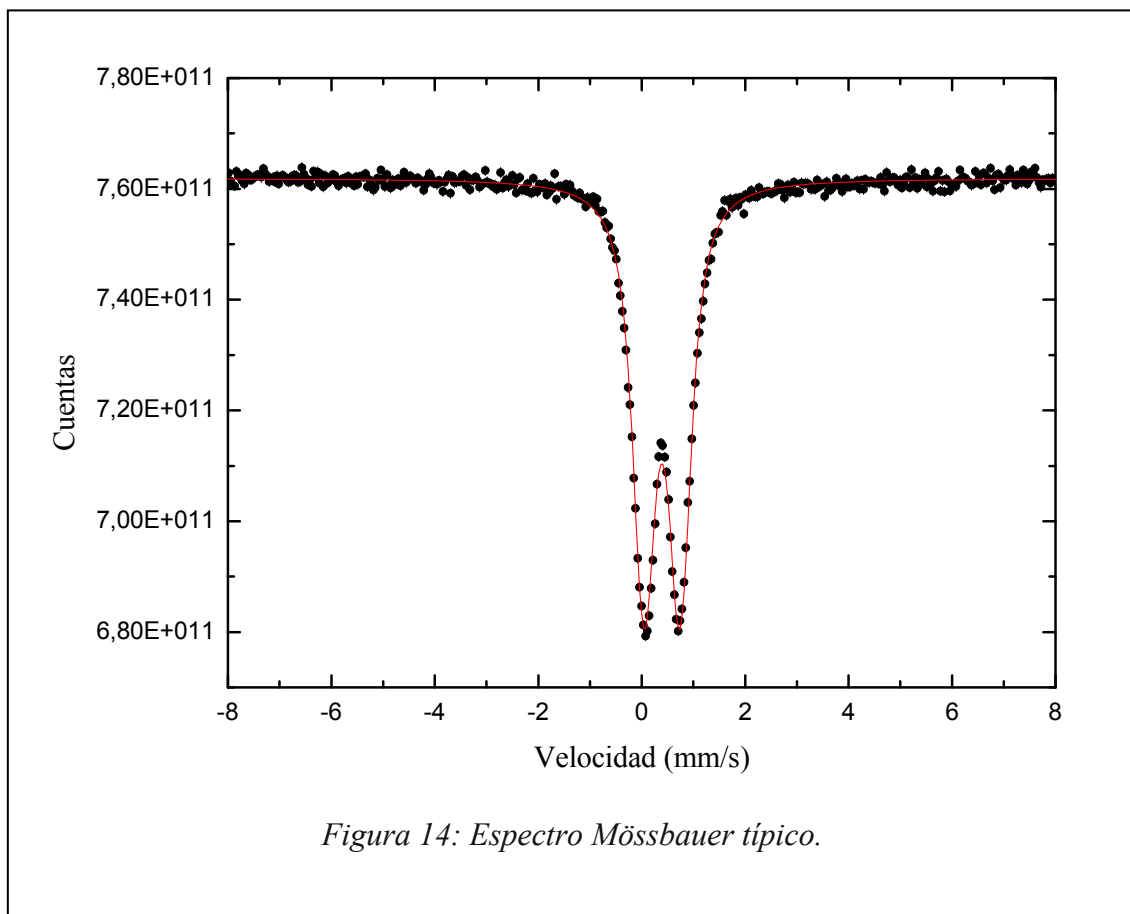
La rama de control de velocidad incluye un módulo *drive* que mueve la fuente relativamente a la muestra (absorbente) y un servoamplificador. El multiescalímetro genera internamente una onda de velocidad como referencia para el servoamplificador, que compara dicha onda con el movimiento real del *drive* y corrige las diferencias. De esta manera la apertura y cerrado de canales en el multiescalímetro queda sincronizado con el movimiento de la fuente. Con esta sincronización se consigue que a cada velocidad del *drive* le corresponda siempre el mismo canal del multiescalímetro. Así, el multiescalímetro cuenta los eventos detectados y seleccionados en función de la velocidad del *drive* en ese instante. La instrumentación consistió en módulos procesadores de pulsos ORTEC CMTE MA-250 con un *drive* MR-350. Para la adquisición de los espectros y la generación de la onda de velocidad de referencia se utilizó equipamiento recientemente desarrollado en nuestro laboratorio [Vei 11].

De esta manera se obtienen espectros Mössbauer que muestran las cuentas detectadas en función de la velocidad (en mm/s). Un espectro Mössbauer típico, con los que se tratará en esta tesis, se muestra en la figura 14.

En los casos más simples, esto es, cuando se trata de absorbentes extremadamente delgados es posible aproximar estos espectros con curvas Lorentzianas. La información a extraer es el desdoblamiento cuadrupolar Δ dado por la separación de las componentes del doblete, el corrimiento isomérico δ dado por la posición del centroide del doblete, el ancho a mitad de altura de la línea Mössbauer y la fracción relativa f de isótopos Mössbauer que experimentan una dada interacción (en el caso de que haya más de una). Para extraer información de las interacciones cuadrupolares de los isótopos Mössbauer en la muestra, así como acerca del corrimiento isomérico se ajustan por cuadrados mínimos una suma de distribuciones lorentzianas de ancho

$$\Gamma_{fuente} + \Gamma_{absorbente} \cdot$$

En el caso de absorbentes no suficientemente delgados se requiere un modelo de ajuste más complejo ya que la probabilidad de absorción resonante pasa a depender de la profundidad en el absorbente donde se produce la absorción. Esto conduce a una pérdida de proporcionalidad entre la amplitud de la línea y la fracción relativa de cada interacción. Si bien es posible tener en cuenta este *efecto de espesor* ajustando los datos con la integral de transmisión Mössbauer [Vér 79], el análisis de los datos se hace muy dependiente del *espesor efectivo* del absorbente. Este espesor depende del espesor real del absorbente y de la probabilidad de absorción resonante libre de retroceso (factor de Mössbauer- Lamb) la cual no siempre es conocida para la muestra bajo estudio. Todo esto quita confiabilidad a las fracciones obtenidas a partir de este modelo de ajuste.



2.3.2.3 Adaptación del equipo para las medidas a baja temperatura

Como ya fue mencionado, para que existan probabilidad de emisión/absorción sin retroceso se requiere que el isótopo Mössbauer esté unido rígidamente al sistema que lo hospeda. Si bien esta condición se satisface normalmente a temperatura ambiente en el caso de la fuente Mössbauer, puede no ser el caso en el absorbente. En particular en el caso de los materiales de interés en esta tesis, que pueden ser rotulados como *materia blanda*, la probabilidad de que ocurra absorción resonante libre de retroceso, a temperatura ambiente, es muy baja. Aparece entonces la necesidad de congelar las muestras o de enfriarlas a temperaturas muy bajas a fin de aumentar adecuadamente la probabilidad de absorción.

De esta forma, para las medidas con el absorbente a bajas temperaturas fue necesario diseñar un dispositivo especial capaz de enfriar el absorbente permitiendo que la radiación de la fuente incidiera sobre él y que la radiación transmitida llegara al detector.

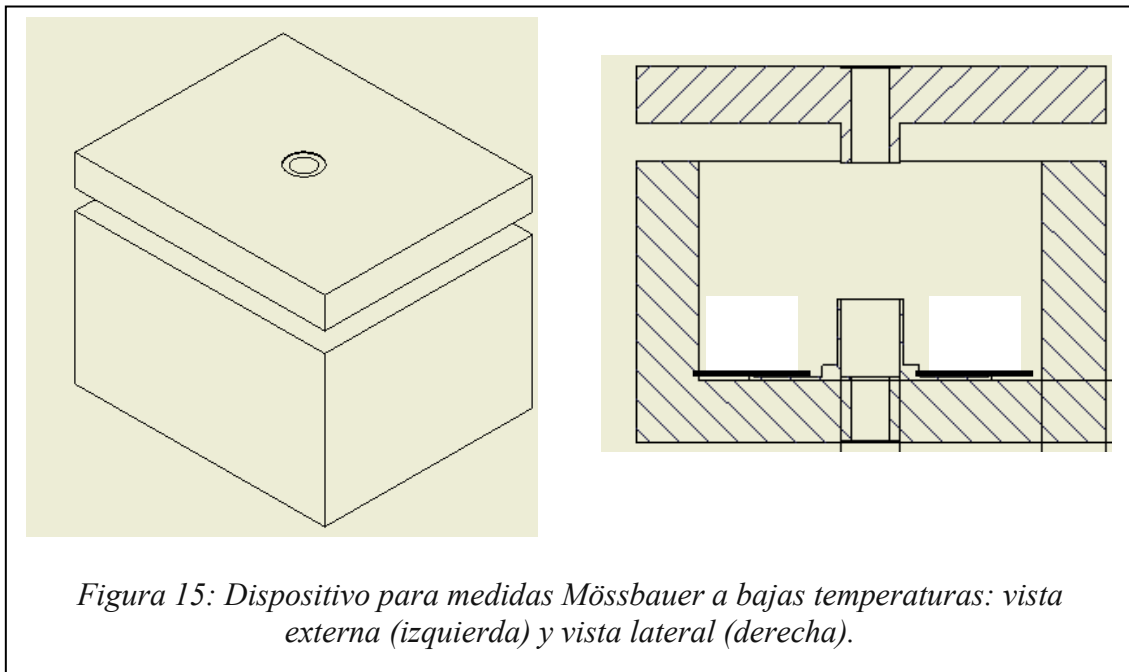


Figura 15: Dispositivo para medidas Mössbauer a bajas temperaturas: vista externa (izquierda) y vista lateral (derecha).

El dispositivo diseñado consistió en una caja de telgopor de alta densidad (con dimensiones ancho, largo y alto de 13 cm, 17 cm y 12 cm respectivamente) con una lámina de cobre en su base interna y con un cilindro hueco de cobre (diámetro de 3 cm y altura de 9 cm) soldado en el centro de la lámina. Para asegurar que la radiación de la fuente pudiera atravesar el arreglo, se realizaron sendos orificios en la base y en la tapa del dispositivo, continuos a la luz del cilindro. Un esquema de este dispositivo se muestra en la figura 15.

Una vez colocados, dentro del cilindro, el portamuestra cilíndrico y una termocupla (a fin de monitorear la temperatura de la muestra durante la medida), la caja se llenó con hielo seco y se tapó. El dispositivo fue colocado luego en el espectrómetro Mössbauer alineando sus orificios con el haz de radiación gama de la fuente.

Con este sistema se realizaron medidas en temperaturas alrededor de -75°C .

2.4 Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de Medición de Vidas Medias (PALS)

2.4.1 Conceptos teóricos

2.4.1.1 Aniquilación de positrones en un material

Cuando los positrones energéticos de una fuente radiactiva son inyectados en un medio condensado, comienzan a interactuar con los electrones y los núcleos de los átomos que constituyen el material. Este proceso donde el positrón es frenado hasta poseer la energía térmica del medio se llama termalización. El rango de penetración durante la termalización depende de la energía cinética del positrón y de la densidad electrónica del material y se realiza en lapsos de tiempo del orden de los picosegundos. La probabilidad de aniquilación del positrón se hace importante al momento de la termalización.

Luego de la termalización, el positrón todavía puede difundir en el material y finalmente, después de vivir en equilibrio térmico, puede aniquilarse con un electrón del medio principalmente produciendo dos rayos γ de 511 keV. El tiempo de vida media de los positrones es característico de cada material y varía de 100 a 500 ps. La vida media puede extenderse hasta algunos nanosegundos en el caso de la formación de positronio (como se discutirá en la siguiente sección).

2.4.1.2 Formación de positronio

En medios no conductores existe la probabilidad de que la interacción entre un positrón y un electrón devenga en un estado ligado llamado positronio, muy similar a un átomo de hidrógeno. Ya que el e^- y el e^+ tienen la misma masa, ambos “giran” a la misma velocidad alrededor de su centro de masa fijo manteniendo una distancia de 1,06 Å.

Si el espín del electrón y el del positrón son paralelos, se forma un estado triplete (espín=1) llamado orto-positronio (*o-Ps*) mientras que de espines opuestos resulta la especie para-positronio (*p-Ps*) de espín cero. El *o-Ps* y el *p-Ps* se forman en relación 3:1.

Las vidas medias de autoaniquilación del positronio presentan valores característicos, que pueden ser calculados teóricamente, que son para el para-positronio $\tau_{p-Ps} = 125$ ps y para el orto-positronio $\tau_{o-Ps} = 142$ ns. Esta última vida media no puede ser observada en el caso del positronio en la materia ya que por un proceso denominado *pick off* el positrón del *o-Ps* se aniquila con un electrón de espín opuesto del medio, y no con el electrón al que está ligado. Este proceso acorta la vida media del *o-Ps* a tiempos del orden de algunos nanosegundos o menos. Si el *o-Ps* es atrapado en una región del material con más espacio, es decir menor densidad electrónica, el *pick off* se reduce y la vida media aumenta. Otro proceso que puede reducir la vida media del *o-Ps* es la conversión de espín de alguna de las partículas del positronio, causada por especies paramagnéticas, que resulta en el cambio de *o-Ps* a *p-Ps* seguido por una rápida autoaniquilación. Como otros átomos, el positronio puede participar en procesos químicos, como la oxidación del positronio a positrón libre o la formación de

compuestos con otros átomos. En estos casos la vida media del *o-Ps* se ve reducida y se dice que el *o-Ps* está *quencheado*.

En la Tabla 1 se resumen los tiempos de vida media del positrón (libre y atrapado en un defecto) y del positronio.

	Tipo de proceso	Vida media
e^+ "libre"	2γ	0,1-0,4 ns
e^+ "atrapado"	2γ	0,2-0,5 ns
<i>p-Ps</i>	2γ (autoaniquilación)	0,125 ns
<i>o-Ps</i>	3γ (autoaniquilación)	142 ns
	2γ (pick-off)	<3 ns

Tabla 1: Escalas de tiempo características de varios procesos de aniquilación de positrones en la materia.

2.4.1.3 Información obtenida a partir de una medida PALS

Las medidas de Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de medición de vidas medias permiten obtener información sobre la densidad electrónica y la existencia de defectos del medio donde se produce la aniquilación del positrón. En el caso de materiales donde existe probabilidad de formación de positronio también es posible obtener información sobre el tamaño de las cavidades del material así como de sus características físicas y químicas.

A continuación se detalla cómo se obtiene la información mencionada a partir de las medidas PALS.

1) Densidad electrónica del medio

La vida media del positrón τ es una función de la densidad electrónica en el sitio de la aniquilación. La probabilidad de aniquilación por unidad de tiempo λ , que es la recíproca de τ , está dada por la superposición de la densidad de positrones $n^+(\mathbf{r}) = |\Psi^+(\mathbf{r})|^2$ y la densidad de electrones $n_-(\mathbf{r})$ [Nie 79]:

$$\lambda = \frac{1}{\tau} = \pi r_0^2 c \int |\Psi^+(r)|^2 n_-(r) \gamma dr$$

donde r_0 es el radio clásico del electrón, c es la velocidad de la luz en el vacío, r es el vector posición y γ describe el incremento en la densidad electrónica debido a la atracción coulombiana entre un positrón y un electrón.

De aquí que la medida del tiempo de vida media del positrón permite obtener información sobre la densidad electrónica $n_-(\mathbf{r})$ encontrada por él.

En el caso de positrones atrapados en defectos del tipo vacancia y sus aglomerados, la vida media del positrón aumenta respecto a la de la muestra libre de defectos debido a la menor densidad electrónica de la vacancia.

2) Tamaño de cavidades

La vida media de autoaniquilación del *o*-Ps en el vacío aparece como un sensor adecuado para medir el tamaño de una cavidad (vacía) en un medio material. La probabilidad por unidad de tiempo de un proceso *pick off* va a depender de las dimensiones de la cavidad. Se han propuesto modelos que relacionan la vida media del *o*-Ps en una cavidad con el radio de la misma. En este sentido el modelo de Tao- Eldrup [Tao 72] resulta útil para poros menores a 1 nm y el modelo Tokio [Ito 99] o RTE [Dul 01] para tamaños de poro mayores (hasta decenas de nanómetros).

En el modelo de Tao- Eldrup se asume que el *o*-Ps está confinado dentro de una esfera rígida de radio R_0 . En la pared de la esfera hay una nube electrónica de espesor $R_0 - R_1$. Según este modelo, la expresión general que correlaciona la vida media del *o*-Ps (τ /ns) y la dimensión promedio de la cavidad ($R/\text{Å}$) donde éste se aniquila es:

$$\tau = \frac{1}{2} \left[1 - \frac{R}{R+1.66} + \frac{1}{2\pi} \sin\left(\frac{2\pi R}{R+1.66}\right) \right]^{-1}$$

En la Figura 16 se grafica la relación entre la vida media del *o*-Ps en ps y el radio promedio de la cavidad (Å) según el modelo de Tao- Eldrup.

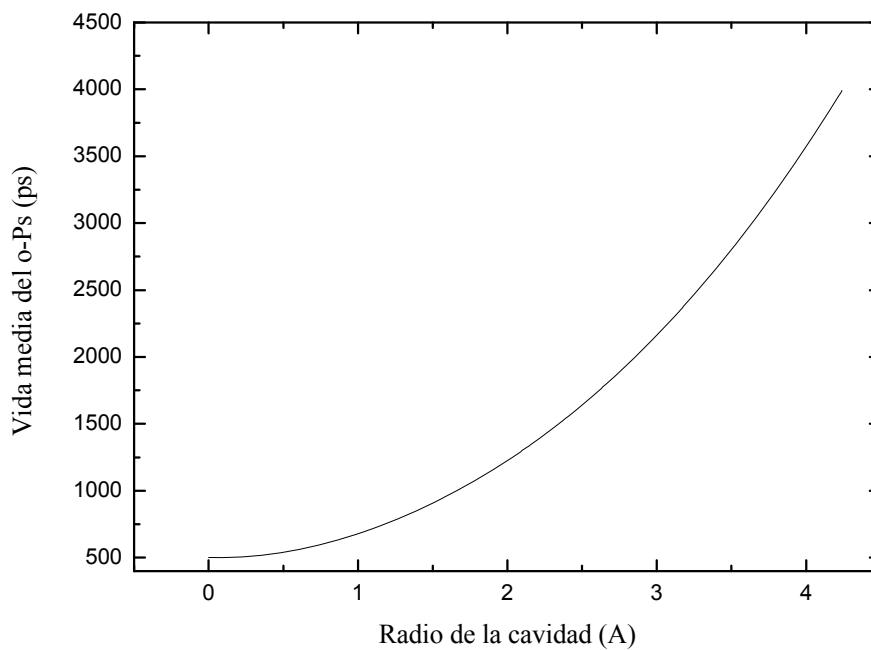


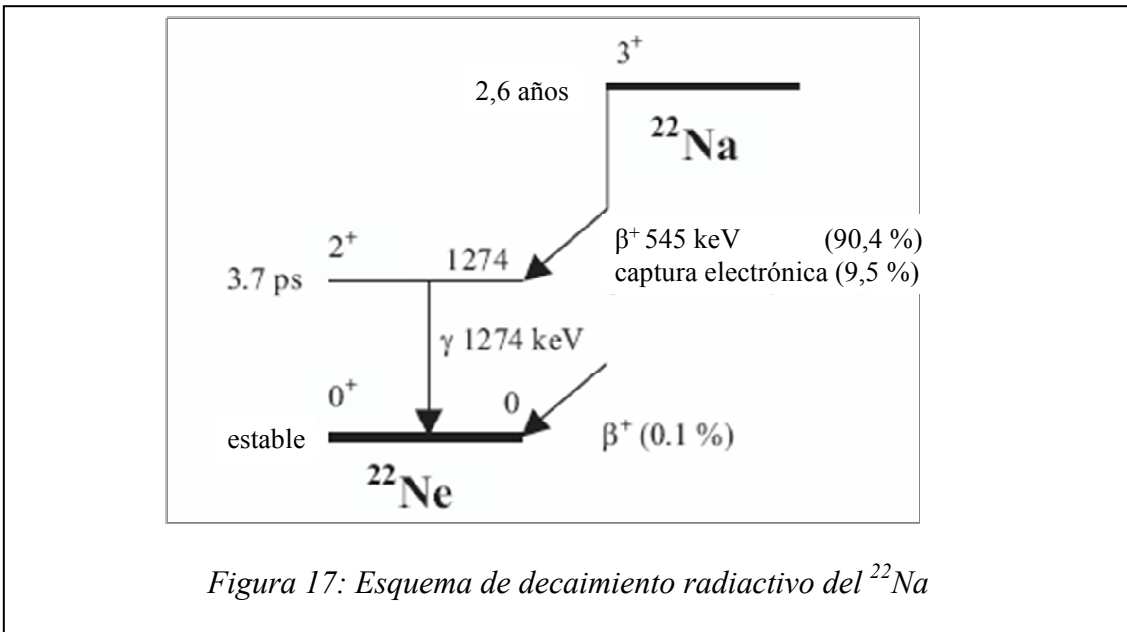
Figura 16: Relación entre la vida media del o-Ps (ps) y el radio promedio de la cavidad donde se aniquila (Å) según el modelo de Tao- Eldrup.

3) Características físicas y químicas del medio

El proceso de formación de positronio, en particular la probabilidad de que dicha formación ocurra, provee información acerca de la estructura física y química del sistema bajo estudio.

Existen dos modelos que describen el proceso de formación del positronio: el de Ore y el de espuela (traducido del inglés, “spur model”). En el modelo de Ore se supone que los positrones pueden interactuar con un electrón del medio y formar positronio sólo si su energía cinética está dentro de un cierto intervalo energético. Los positrones que posean energías fuera de ese intervalo son incapaces de formar positronio, inhibiendo este proceso en el cual influyen varios factores. En el modelo de espuela se considera que el positrón, a medida que se va frenando por las colisiones con los componentes de medio, va causando ionizaciones y excitaciones electrónicas. El positrón pierde sus últimos 100-200 eV en crear una “espuela” o conglomerado de electrones, iones, radicales libres y moléculas excitadas, los cuales se encuentran muy cerca unos de otros con una gran probabilidad de reaccionar entre sí. En este modelo la formación de positronio se efectuaría por la interacción coulombiana entre el positrón y el electrón dentro de la espuela. La formación de positronio compite en este caso con otros procesos: recombinación de electrones con iones positivos, difusión de los electrones fuera de las espuelas y el secuestro que las moléculas del medio ejercen sobre el electrón y el positrón.

En materiales que revistan una alta complejidad química (tal es el caso de los sistemas biológicos) se puede anticipar que no será posible extraer mayor información a partir de la probabilidad de formación de positronio.



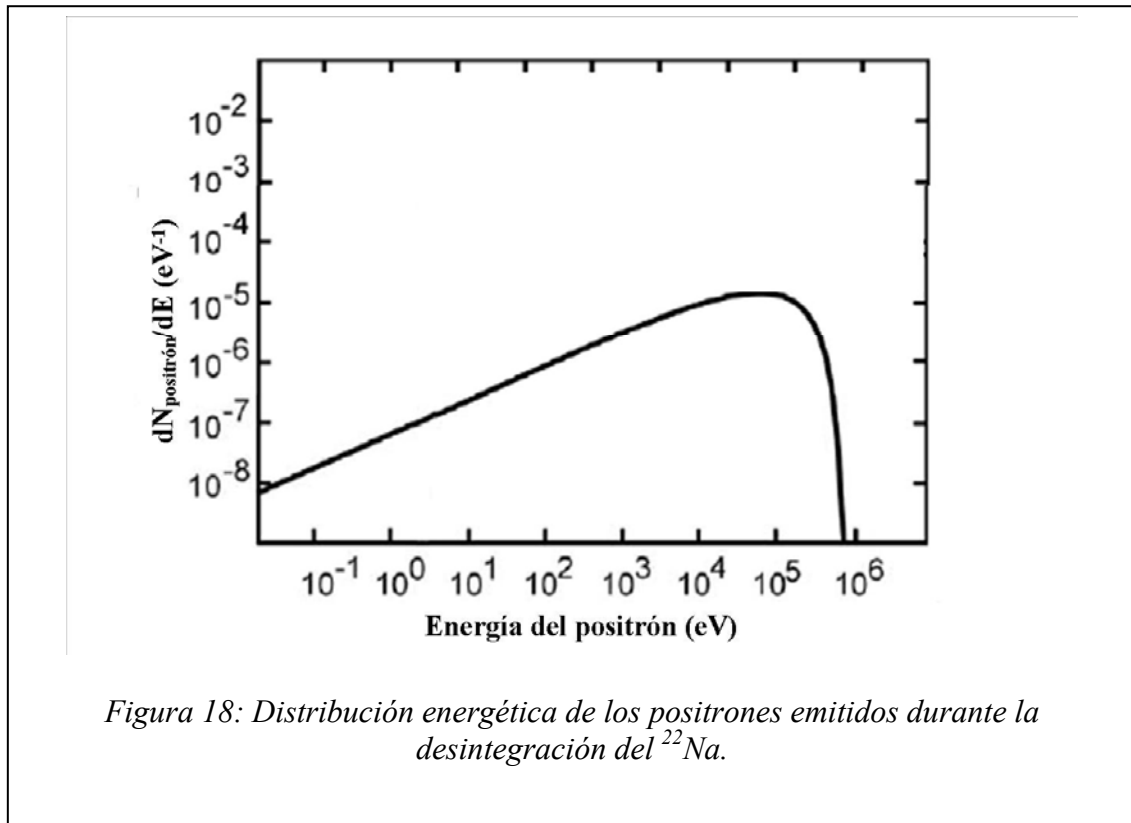
2.4.2 Método experimental

2.4.2.1 La fuente de positrones

La fuente convencional de positrones utilizada para medidas PALS es el ^{22}Na cuyo esquema de desintegración radiactiva se muestra en la figura 17.

El ^{22}Na se desintegra por emisión β^+ ($p^+ \rightarrow n + \beta^+ + \nu$) con un semiperíodo $t_{1/2}$ de 2,6 años. La energía del positrón emitido, que es como máximo de 545 keV y cuya distribución se muestra en la figura 18, decrece dentro de la muestra en unos pocos picosegundos por interacciones con los electrones y las moléculas del medio. Si bien las características del proceso dependen, como se ha mencionado, de la naturaleza del material, los órdenes de magnitud típicos de este proceso de termalización son de 100 μm para la profundidad media de penetración y ocurre en unos pocos picosegundos. Luego de la termalización, el positrón todavía puede difundir unos 100 nm. En el caso

particular del agua se ha calculado que para positrones con energía media de 215 keV el



rango de termalización es de 280 μm [Nuc 12].

Una característica importante de esta desintegración es que, pocos picosegundos después de la emisión del positrón, el núcleo emite un fotón de 1274 keV. Esta emisión gama “en coincidencia” con la aparición del positrón, se toma como señal de *start* del experimento y permite realizar medidas de vida media de este último. En la Figura 19 se muestra esquemáticamente la secuencia de procesos que sufre el positrón desde que se emite por desintegración del ^{22}Na hasta que se aniquila en el medio. El tiempo de vida media se mide como el tiempo transcurrido entre la señal de 1274 keV y los rayos γ que se producen cuando el positrón se aniquila (511 keV).

La fuente de positrones se prepara evaporando pocos μCi de una solución de $^{22}\text{NaCl}$ sobre una lámina soporte metálica o plástica delgada (típicamente de 1 mg/cm^2)

que luego es cubierta con una lámina del mismo material y de igual tamaño. Finalmente los bordes de las láminas superpuestas son sellados con pegamento.

El método de trabajo más común se denomina “arreglo sándwich” y consiste en colocar la fuente de positrones entre dos piezas idénticas de la muestra problema de espesor suficientemente grande para absorber todos los positrones. En la figura 20 se esquematiza una vista lateral de dicho arreglo.

Cuando se utiliza este modo de trabajo existe la posibilidad de que los positrones que se producen por desintegración del ^{22}Na se aniquilen, además de en el espesor de la muestra, en los materiales de la fuente (lámina, pegamento), haciéndose necesaria una “corrección por aniquilación en la fuente” de los resultados. Los parámetros de aniquilación característicos en la fuente pueden obtenerse si se mide, en arreglo sándwich, una muestra de referencia (en la cual el positrón se aniquila con un τ conocido). Este punto será desarrollado en “Experimental”).

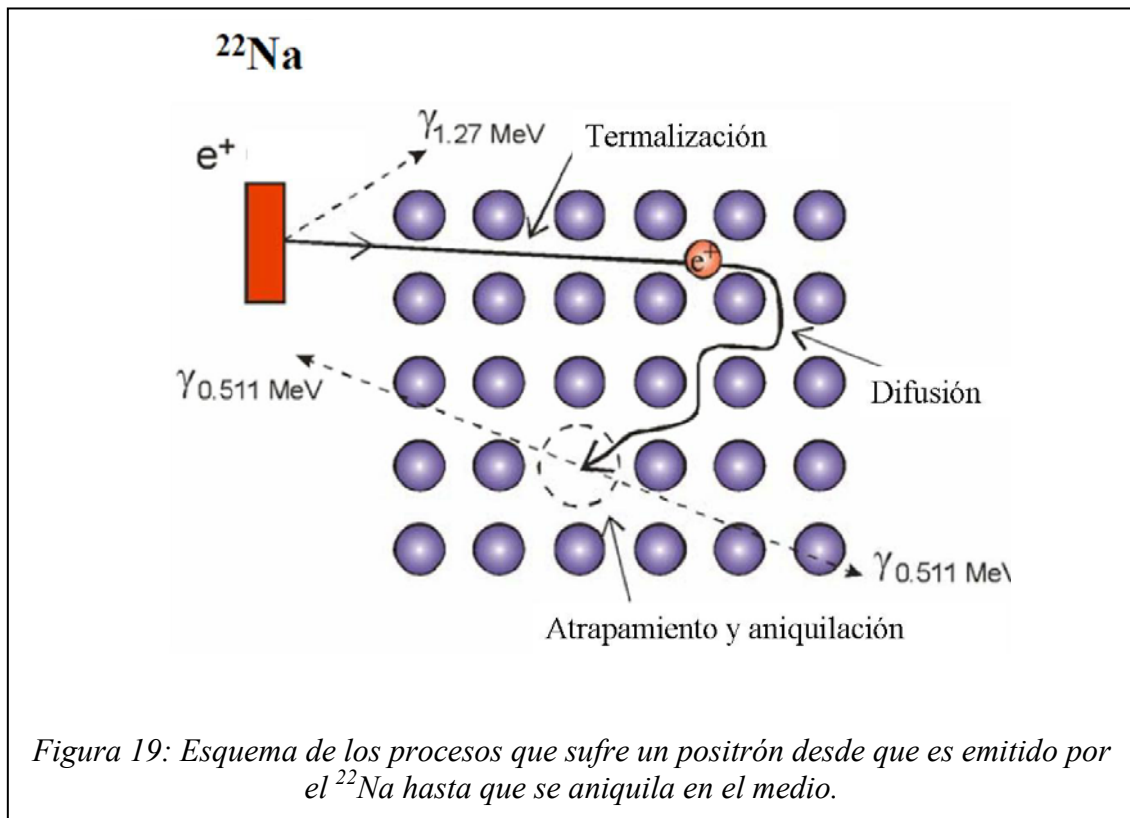
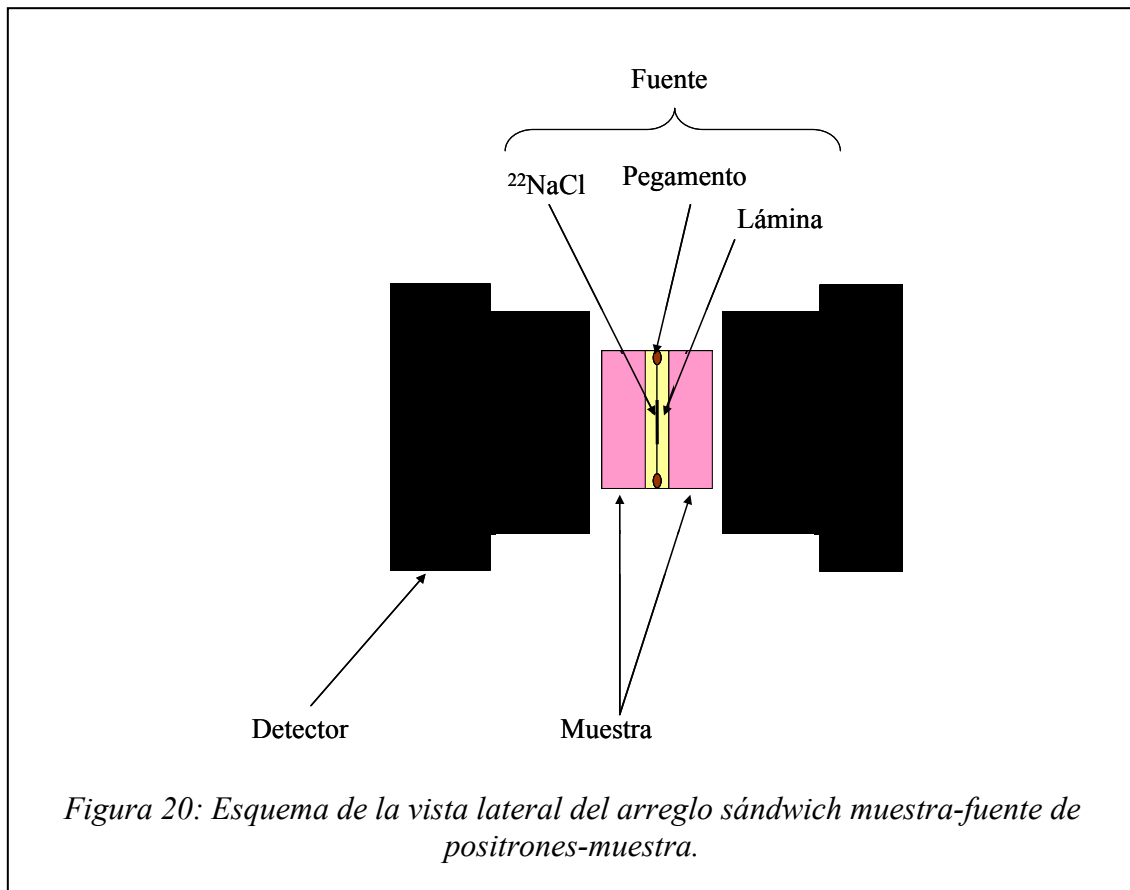


Figura 19: Esquema de los procesos que sufre un positrón desde que es emitido por el ^{22}Na hasta que se aniquila en el medio.

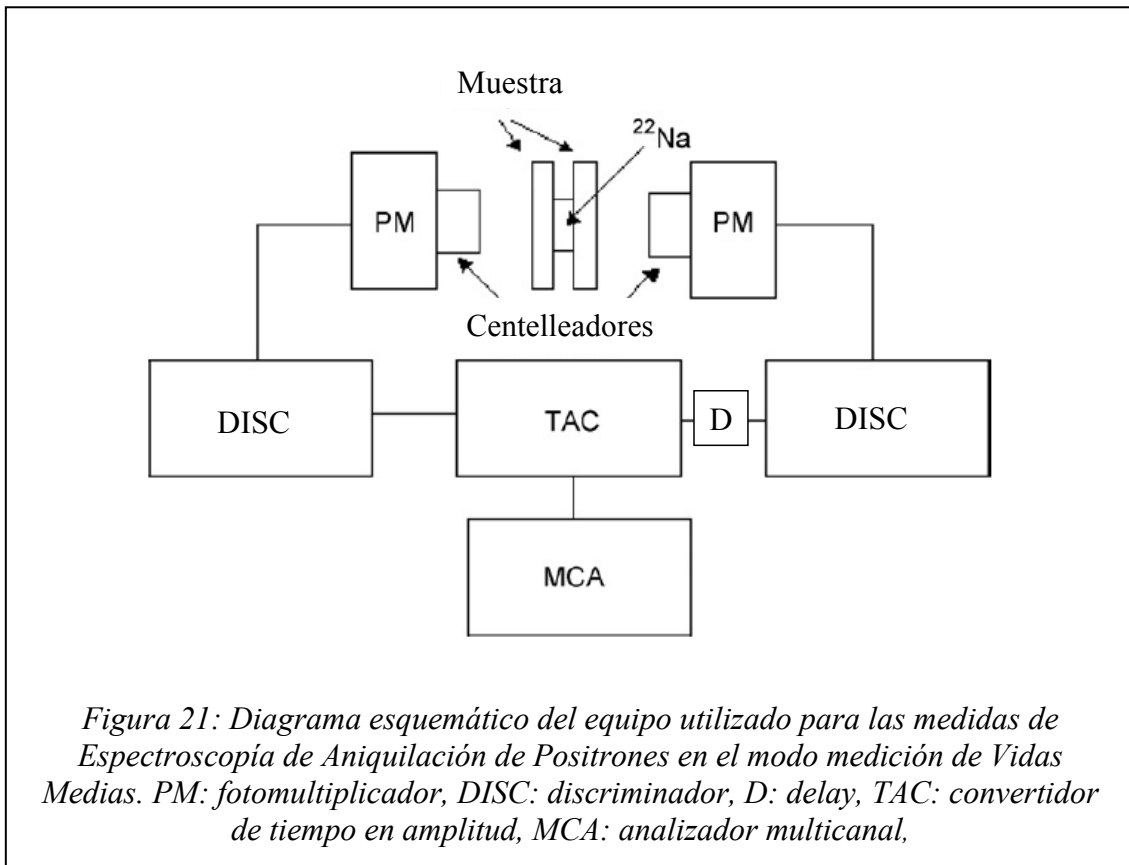


2.4.2.2 El equipo y el análisis de datos

Los tiempos de vida media se midieron utilizando un sistema rápido-rápido de coincidencias convencionalmente utilizado en espectroscopía nuclear cuyo esquema se muestra en la figura 21.

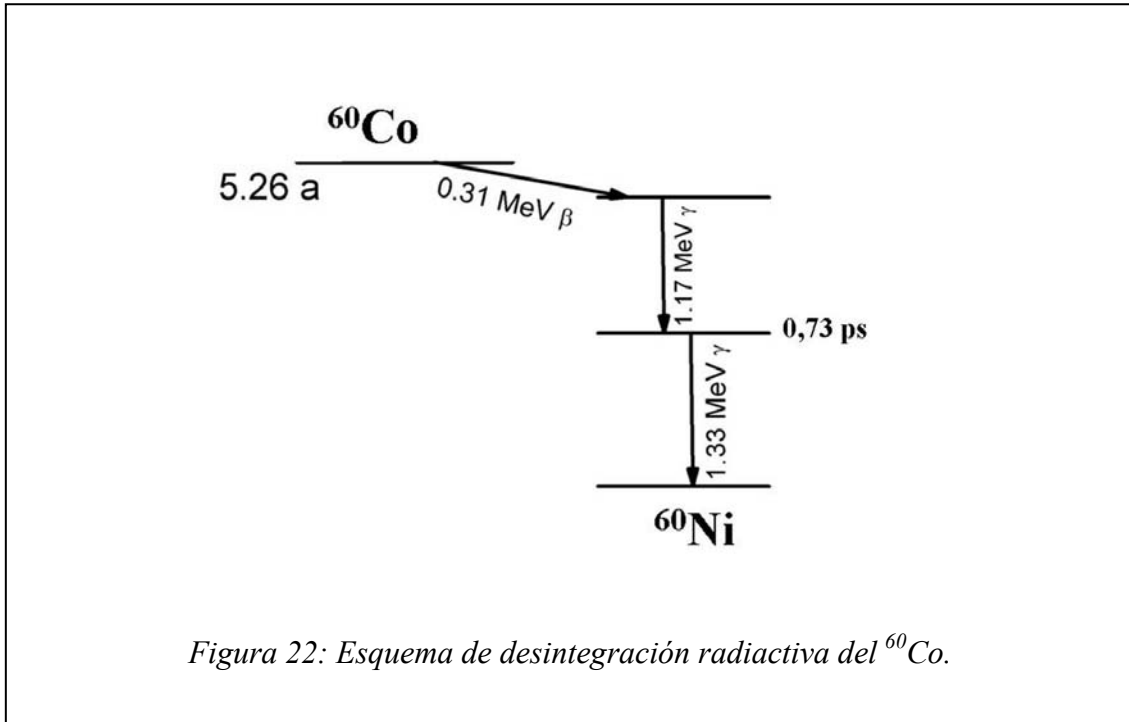
Los detectores consisten en centelleadores acoplados a tubos fotomultiplicadores (*PM*). En los experimentos aquí presentados se utilizó un detector sellado con centelleador plástico/*PM* junto con un detector constituido por un cristal de BaF_2 acoplado a un fotomultiplicador XP2020Q (Photonis). Las señales desde los ánodos de estos detectores son analizadas con discriminadores (*DISC*) cuyas ventanas de energía se ajustan de tal manera que uno de los detectores registre el γ correspondiente a la

aparición del positrón (1274 keV, señal *start*) y el otro el que corresponde a la aniquilación (511 keV, señal *stop*). Las señales lógicas producidas por los discriminadores se dirigen al convertidor de tiempo en amplitud (*TAC*) (la señal *stop* es retardada antes por un *delay* para asegurar que el *stop* siempre llegue después que el



start.). El *TAC* va a producir un pulso analógico cuya altura es proporcional al lapso de tiempo entre las señales *start* y *stop*, dando información sobre la vida media de aniquilación. En este sentido, el retardo también asegura que a la mayoría de los eventos de coincidencias (que ocurren en tiempos cortos) les correspondan, a la salida del *TAC*, pulsos de amplitud adecuada. Estos pulsos son analizados por un analizador multicanal (*MCA*) que cuenta los pulsos que recibe discriminándolos según su altura. La forma típica del espectro obtenido con el analizador multicanal será discutida, en lo que sigue,

en relación con los experimentos llevados a cabo para establecer la resolución temporal del equipo.



La resolución temporal se obtiene observando el espectro de coincidencias de dos radiaciones gama emitidas en cascada *prompt*, esto es, la segunda radiación emitida inmediatamente después de la primera. A tal fin, el conjunto muestra- fuente se reemplaza por una fuente de ^{60}Co que se desintegra por emisión β^- al estado excitado de $2,5\text{ MeV}$ del ^{60}Ni el cual se desexcita al estado fundamental mediante la emisión de dos radiaciones gama en cascada ($1,17\text{ MeV}$ - $1,33\text{ MeV}$) siendo el tiempo de vida del nivel intermedio de $\tau = 0,73\text{ ps}$. El esquema de desintegración del ^{60}Co se muestra en la figura 22. El espectro de coincidencias se obtiene sin cambiar los parámetros del equipo: la segunda radiación es analizada con la ventana energética *start* mientras que la señal *stop* es generada por el fondo Compton de la radiación de 1170 keV .

En la figura 23 se muestra el espectro de coincidencias obtenido con una fuente de ^{60}Co . Esta curva, comúnmente llamada *prompt*, muestra cómo las coincidencias reales se distribuyen en torno del tiempo cero que se corresponde con el máximo de la curva. Dicho máximo aparece en un canal a la derecha del canal cero, corrimiento asociado con el retardo de la línea *stop* respecto de la *start*. Se observan también

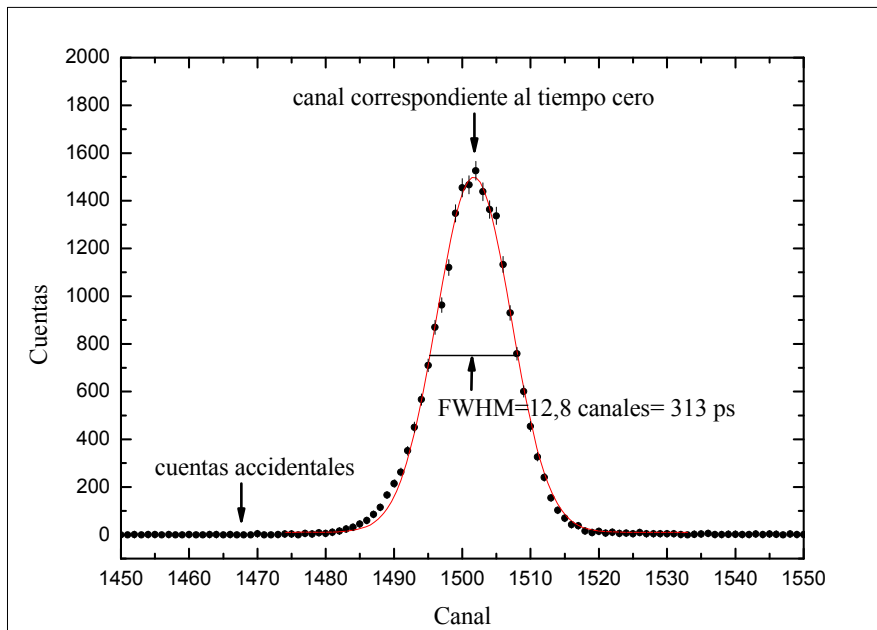


Figura 23: Espectro de coincidencias obtenido con una fuente de ^{60}Co . Se muestran las cuentas accidentales, el canal correspondiente al tiempo cero y la resolución temporal obtenida a partir del ancho a mitad de altura del pico (FWHM) para una calibración de 24,4 ps/canal.

coincidencias *accidentales* entre radiaciones que provienen de distintos núcleos. Éstas aparecen a la derecha y a la izquierda del tiempo cero. La resolución temporal se determina a partir del ancho a mitad de altura (FWHM) del espectro del ^{60}Co expresado en unidades de tiempo (de acuerdo a la calibración del arreglo experimental, que en este caso fue de 24,4 ps/canal). La resolución temporal está afectada por la dispersión temporal en la desexcitación del centelleador (mediante emisión de fotones visibles o

ultravioletas), en la incidencia de dichos fotones sobre el fotocátodo, en el tránsito de la descarga en el tubo fotomultiplicador y en la respuesta del discriminador.

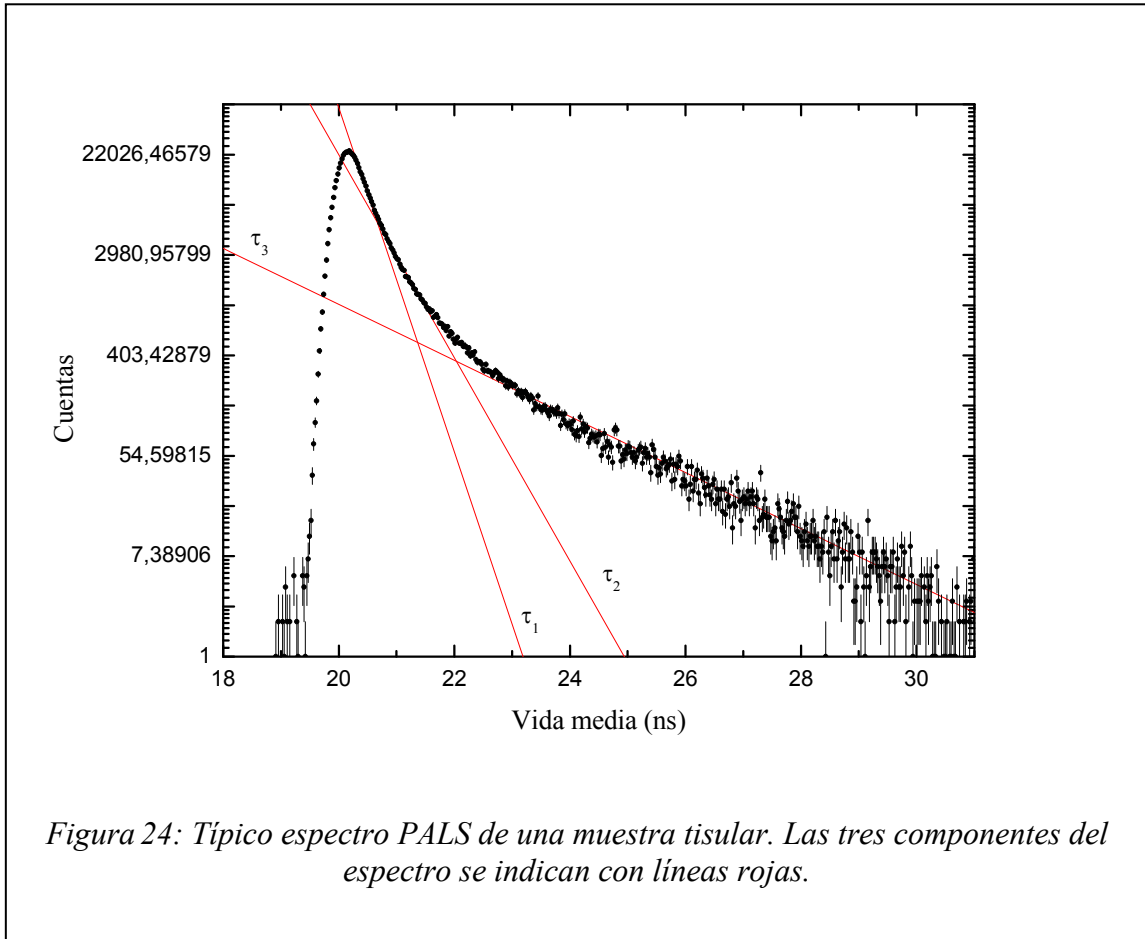
La resolución temporal de las medidas presentadas en esta tesis fue de alrededor de 320 ps. Dicha resolución se encuentra por encima del valor deseable para estudiar materiales condensados donde sólo existen especies positrónicas de cortas vidas medias (100 a 500 ps). Si bien se hicieron intentos por mejorar la resolución temporal, que incluyeron el desarmado y nuevo acoplamiento del sistema BaF₂/ XP2020Q, la apertura del detector plástico y el ajuste cuidadoso de las ventanas de energía de los discriminadores, no se obtuvo ninguna mejora sustancial.

Teniendo en cuenta que en los sistemas de interés en este trabajo de tesis existe la posibilidad de que el positrón forme orto-positronio cuyos tiempos de vida media se encuentran, de manera característica, por encima de los 1000 ps se consideró que con la resolución alcanzada era posible realizar una evaluación preliminar de las posibilidades de éxito de la técnica PALS en este tipo de sistemas. En la actualidad se está trabajando en la puesta a punto de otro espectrómetro PALS en vistas de lograr una mejor resolución temporal.

Los datos crudos de una medida PALS son, como se ha mostrado para el ⁶⁰Co, el número de cuentas en función del número de canal (o de tiempo, considerando la calibración). Previo al ajuste de los datos, se restan al espectro crudo las coincidencias accidentales (provenientes de radiaciones asociadas a distintos positrones) y se obtiene un número de cuentas $n(t)$ que es proporcional al número de positrones que se aniquilan al tiempo t .

Es de esperar que el espectro de aniquilación de positrones en sistemas biológicos consista en una distribución continua de vidas medias debido a la alta inhomogeneidad de los mismos, tal como fue observado en el caso de polímeros [Liu

95]. Así, se podría tratar de extraer de los datos experimentales la distribución de intensidades de las distintas vidas medias mediante un análisis basado en la transformación de Laplace del espectro medido. Sin embargo, como se verá más adelante, en los estudios PALS de sistemas biológicos frecuentemente se utiliza un conjunto reducido de contribuciones discretas, esto es, el análisis de los datos se realiza



descomponiendo $n(t)$ en una suma de funciones exponenciales $n(t) = \sum_i n_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$,

donde n_i es proporcional al número de positrones que se aniquilan con una probabilidad

por unidad de tiempo $\lambda_i = \frac{1}{\tau_i}$.

A fines de poder comparar nuestros resultados con los estudios PALS previamente reportados, en este trabajo de tesis nos restringiremos a este último tipo de

análisis. En la Figura 24 se muestra un típico espectro de coincidencias de un tejido biológico que presenta tres contribuciones exponenciales caracterizadas por τ_i que se numeran según el tiempo de vida media (líneas rojas).

Capítulo 3

Aplicaciones previas de las técnicas nucleares a sistemas de interés biológico

3.1 Introducción

Las técnicas nucleares con las que se trata en este trabajo de tesis permiten, como se ha mencionado, obtener información a nivel nanométrico de los sistemas bajo estudio. Sin embargo, el impacto de las aplicaciones de dichas técnicas a la investigación de sistemas de interés en biología ha sido distinto según el caso.

La historia de la aplicación de la técnica PAC en sistemas biológicos empezó con estudios de dinámica y estructura en macromoléculas [Lei 68]. Aunque el atractivo de la técnica en el área de la biología ha sido bien reconocido [Bod 83], son escasos los trabajos PAC en la mencionada área, hecho que se debe en gran parte a la naturaleza extraña de los átomos PAC respecto a los sistemas biológicos. Revisiones de estas aplicaciones puede encontrarse en la bibliografía [Hem 04, Bau 85].

La Espectroscopía Mössbauer permite obtener información detallada sobre el entorno próximo de la sonda Mössbauer, siendo una técnica completamente específica para el tipo de núcleo bajo estudio. Estos atributos hacen a la EM particularmente apropiada para el estudio de grandes y complejas moléculas biológicas que incluyen átomos Mössbauer en sus centros activos. Debido a que entre dichos átomos se encuentra el ^{57}Fe y que el hierro tiene un rol crucial en muchísimas biomoléculas, la

Espectroscopía Mössbauer ha resultado sumamente útil para el estudio de sistemas biológicos [Dic 86, Zha 94, Kam 05] y es, entre las técnicas nucleares que interesan en este trabajo de tesis, la que lleva la delantera en el campo de la biomedicina.

Por último, el advenimiento de la técnica PALS como una herramienta para el estudio de sistemas biológicos es todavía más reciente. Entre los trabajos que se han reportado se incluyen investigaciones en transiciones de fase de proteínas y lípidos [Mac 79, Bel 79], estudios de tejidos tumorales [Jea 06, Eli 05], de degradación y radiólisis de proteínas [Osh 99] y, más recientemente, del posible uso de la técnica para evaluar el rol de las cavidades en la compresibilidad y expansión térmica de proteínas [Her 05].

En este capítulo se hará una revisión de las aplicaciones de estas técnicas a sistemas de interés en biología y se finalizará con un análisis del impacto, relevancia y calidad experimental de las mismas. Partiendo de esta base se definirán sistemas particulares de estudio para esta tesis.

3.2 Revisión de los trabajos reportados en la literatura

3.2.1 Correlaciones Angulares Perturbadas

Como ya se destacó, la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas permite estudiar las interacciones hiperfinas de átomos radiactivos embebidos en diversos materiales condensados y de allí caracterizar su entorno atómico.

Los átomos factibles de estudiarse mediante PAC son en su mayoría metálicos y es principalmente la naturaleza de dichas sondas la que determina el tipo de compuestos que pueden ser estudiados con esta técnica. Entre las sondas PAC se incluyen ^{111m}Cd ,

^{111}In , $^{199\text{m}}\text{Hg}$, ^{181}Hf , ^{111}Ag , ^{99}Mo , ^{160}Dy , ^{152}Eu , ^{147}Nd , ^{117}Cd , ^{133}Cs , ^{62}Zn , ^{160}Tb y ^{133}Ba , la mayoría de los cuales raramente son encontrados en sistemas biológicos.

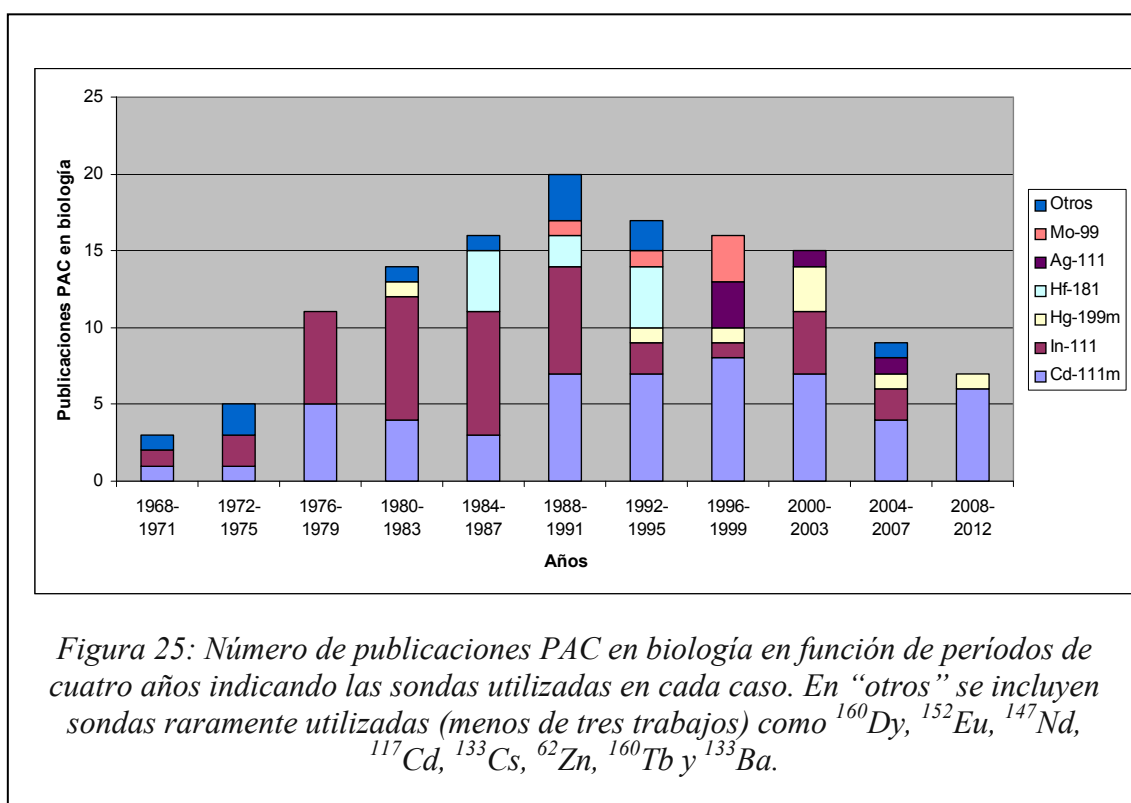
En las conclusiones de la Conferencia de Interacciones Hiperfinas de Gröningen en 1983, E. Bodenstedt, un reconocido especialista en PAC, destacó que las aplicaciones a moléculas biológicas hacían a la técnica muy atractiva para los biofísicos [Bod 83]. Sin embargo, PAC ha sido escasamente utilizada en el área de las ciencias biológicas, como se discutirá en lo que sigue.

El primer reporte de estudios PAC en sistemas biológicos [Lei 68] concierne a su aplicación para el estudio de macromoléculas biológicas en solución. En dicho trabajo se postula: “...El uso de un núcleo radiactivo (sonda PAC) como un trazador rotacional para marcar biomoléculas ofrece las virtudes de la sensibilidad, simplicidad instrumental y la aplicabilidad *in vivo*...” (y a la técnica PAC como) “...una técnica de marcado rotacional radiactivo...”. Finalmente, se destaca que “...Las marcas pueden ser incorporadas en regiones interesantes de las macromoléculas utilizando métodos químicos selectivos...”.

A partir de allí, las aplicaciones PAC en biología han incluido el estudio de la estabilidad *in vivo* de liposomas [Mau 79, Sch 93], de la estructura y dinámica de sitios metálicos en proteínas [Sas 06, Hei 09] y de la incorporación y metabolismo celular de metales [Gle 84, Sas 006], entre otros tópicos. Completas revisiones de las aplicaciones PAC en biología pueden encontrarse en la literatura [Hem 04, Bau 85, Rin 79].

Los trabajos mencionados abordan variedad de temáticas y sistemas, que se estudiaron utilizando distintas sondas PAC según el caso. Dado que el número total de trabajos resulta una cifra manejable, se realizó un análisis exhaustivo de la literatura [Cha 08] cuyos principales resultados, actualizados al año 2012, se presentan a continuación en forma de gráficos de barras.

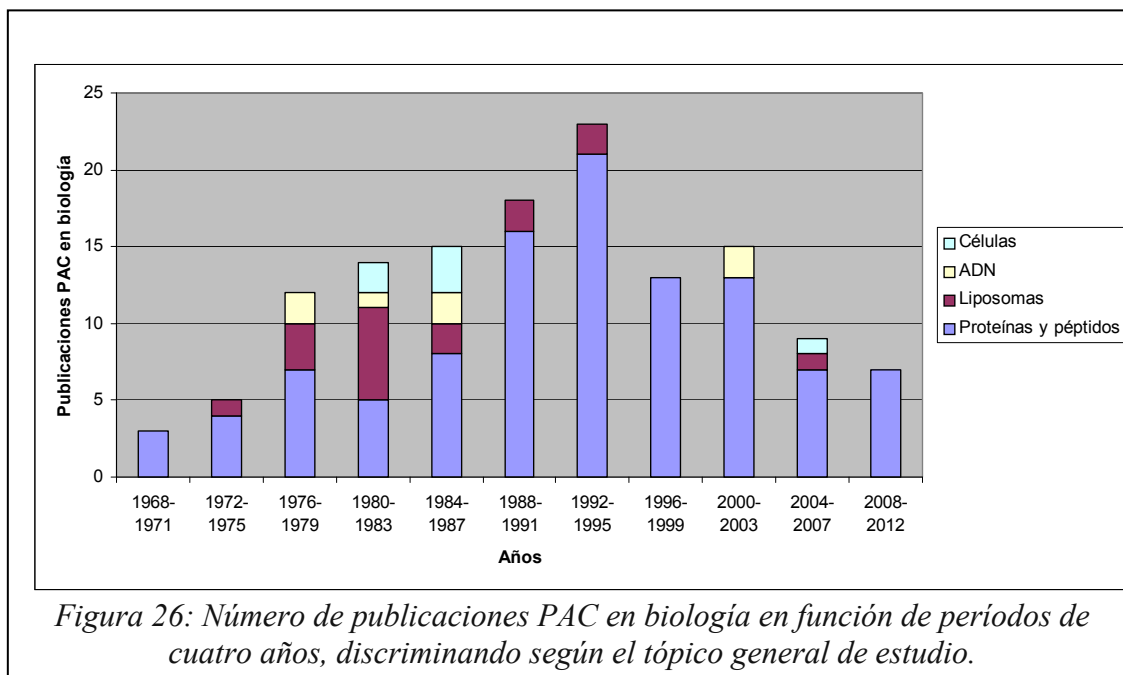
En la actualidad se cuentan alrededor de 150 reportes de aplicaciones PAC en sistemas biológicos. En la Figura 25 se muestra el número de publicaciones PAC en biología desde sus comienzos hasta nuestros días, en períodos de cuatro años, indicando las sondas utilizadas en cada caso. Las investigaciones PAC en este campo, cuyo número aumentó hasta los años noventa y actualmente está disminuyendo, fueron realizadas empleando principalmente las sondas ^{111m}Cd y ^{111}In (40 % y 31% del total de publicaciones, respectivamente). El ^{111m}Cd fue la sonda de elección en las primeras



investigaciones PAC en el campo de la biología y dicha tendencia continúa en la actualidad. Este isótopo ha sido la base de múltiples estudios de metaloproteínas ya que es capaz de sustituir fácilmente a los iones nativos. En segundo lugar aparece el ^{111}In , en estudios de vesículas lipídicas o “liposomas”, proteínas, y ADN. Una pequeña fracción de los reportes (8 %) corresponde a trabajos con ^{181}Hf publicados entre mediados de los años ochenta y mediados de los años noventa, que conciernen a su biodistribución en

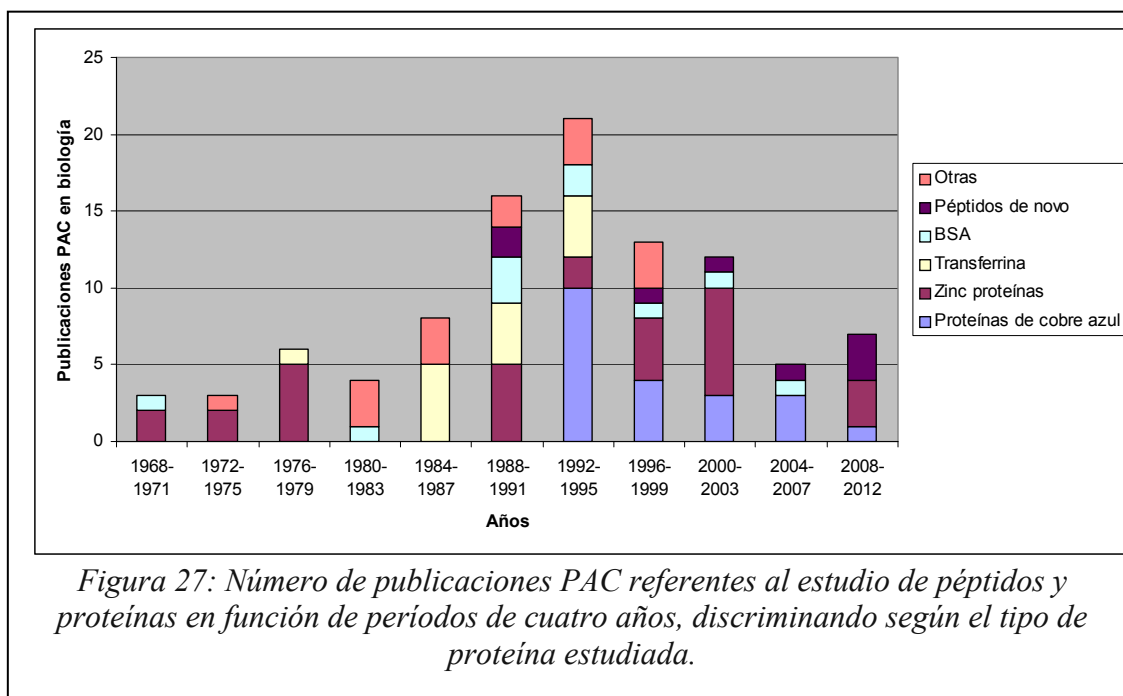
mamíferos (este metal puede ser considerado como un análogo del plutonio). Las sondas ^{199m}Hg , ^{111}Ag y ^{99}Mo aparecen en un pequeño número de publicaciones, todas ellas concernientes a la investigación de proteínas.

La mayoría de los estudios PAC en sistemas de interés en biología fueron realizados *in vitro*. En este grupo se incluyen las investigaciones en dinámica de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, en los cambios conformacionales de proteínas y estructura de sitios metálicos, entre otros. Sin embargo, una pequeña fracción de los reportes (15 %) que trata con la incorporación de metales y la integridad de vesículas lipídicas, fueron realizados *in vivo*.



Aunque los alcances de los estudios PAC cubren varios aspectos de la biología, se han agrupado los trabajos en cuatro tópicos generales: estudios en células, estudios en proteínas y péptidos, estudios en liposomas y estudios en ADN. La discriminación de las publicaciones PAC en biología de acuerdo al criterio mencionado se muestra, para períodos de cuatro años, en la Figura 26. La mayoría de los trabajos corresponden al estudio de proteínas y péptidos, independientemente del período temporal considerado,

seguido por los estudios en liposomas que casi han sido dejados de lado en los últimos veinte años. Adicionalmente se han reportado escasos estudios PAC en ácidos nucleicos y en células (eucariotas y bacterianas).



En la Figura 27 se muestran los estudios PAC en péptidos y proteínas realizando una discriminación según el tipo particular de proteína estudiada. Como puede observarse en la figura, los primeros esfuerzos para aplicar la técnica PAC en este tipo de sistemas se orientaron al estudio de la zincproteína anhidrasa carbónica [Mea 69, Ric 74, Bau 74]. Numerosas investigaciones que se centraron en la proteína transferrina se llevaron a cabo entre los años 1984 y 1995, todas ellas utilizando como átomo sonda el ^{181}Hf . En los últimos años los esfuerzos para aplicar la técnica a materiales de interés biológico se han enfocado en el estudio de la estructura y dinámica de sitios metálicos en ciertas zincproteínas (especialmente betalactamasas) y en péptidos de síntesis, investigaciones que en su mayoría provienen del grupo del Dr. Lars Hemmingsen de la Universidad de Copenhagen.

3.2.2 Espectroscopía Mössbauer

La Espectroscopía Mössbauer es una técnica ampliamente utilizada en distintas ramas de la ciencia como física de estado sólido, química, bioquímica, metalurgia, geología y arqueología, entre otras. Respecto a sus aplicaciones en el campo de la biología esta técnica es, entre las tres espectroscopias que estamos analizando, la que lleva la delantera debido a la compatibilidad biológica del más popular de sus isótopos: el ^{57}Fe .

Muchas funciones biológicas esenciales son controladas por moléculas grandes que contienen al menos un átomo de hierro: tal es el caso de la hemoglobina donde el hierro liga directamente la molécula a ser transportada y de muchas enzimas que utilizan las propiedades de oxidación-reducción del metal para catalizar reacciones químicas. De esta manera el átomo de Fe en estas proteínas resulta de vital importancia y el estudio de su entorno atómico inmediato contribuye con considerable información sobre los tipos de reacciones químicas involucradas en los procesos biológicos.

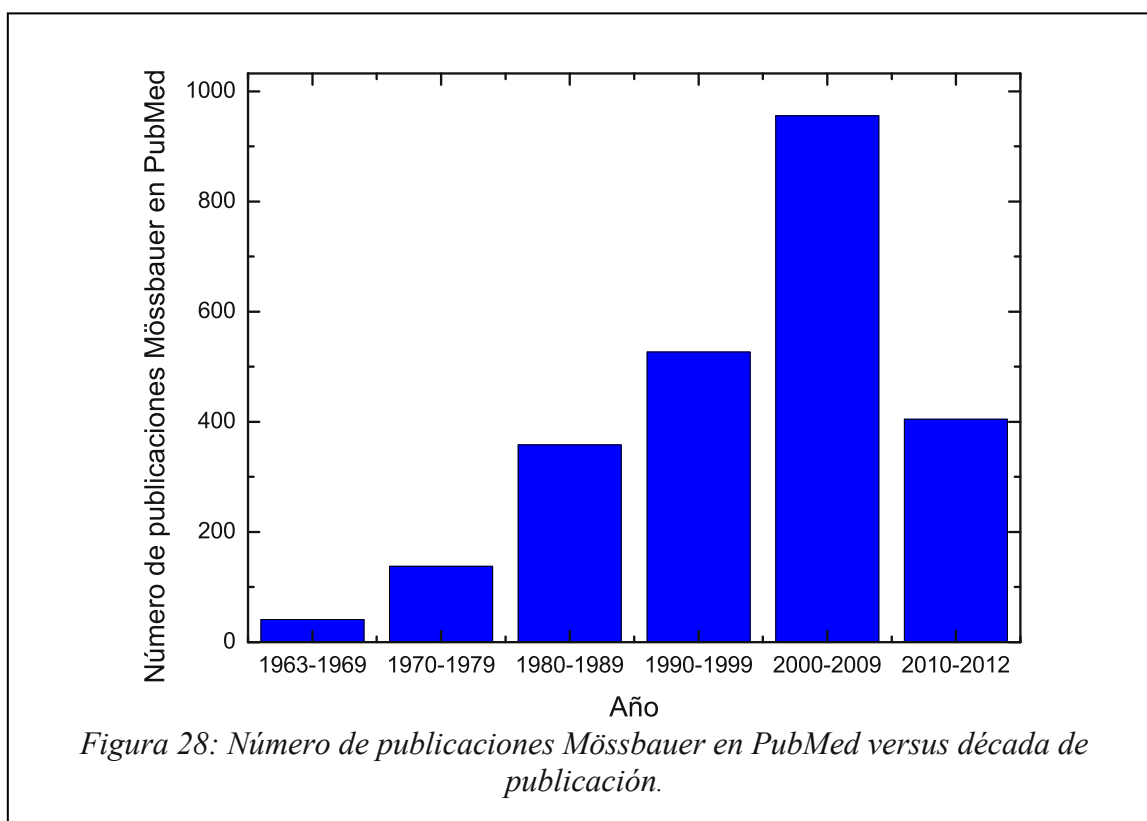
Sobre esa base se han examinado por Espectroscopía Mössbauer muchas proteínas que contienen hierro y se ha obtenido entonces información apropiada para examinar el entorno inmediato del sitio activo. Así, son numerosos los estudios Mössbauer sobre proteínas con grupos hemo o con centros de hierro azufre [See 09] y metabolismo de bacterias [Kam 06], entre otros. La EM ha permitido también detectar con éxito sutiles cambios conformacionales en la hemoglobina de pacientes pediátricos talasémicos [Ham 79] y ha sido considerada como un posible método de diagnóstico molecular temprano de dicha enfermedad.

El gran número de trabajos Mössbauer en el área de la biología hace imposible presentar una revisión detallada como se hizo para la técnica de Correlaciones

Angulares Perturbadas. Sin embargo, con el objetivo de dar idea del número de publicaciones y de la tendencia que han seguido este tipo de investigaciones, se realizó una búsqueda en el sitio Pub Med, que compila más de 22 millones de citas de literatura biomédica.

En este buscador especializado en las ciencias de la vida se encuentran aproximadamente 2500 trabajos que incluyen Espectroscopía Mössbauer desde 1963 hasta la actualidad (una búsqueda equivalente para PAC arroja la cifra de 21 trabajos).

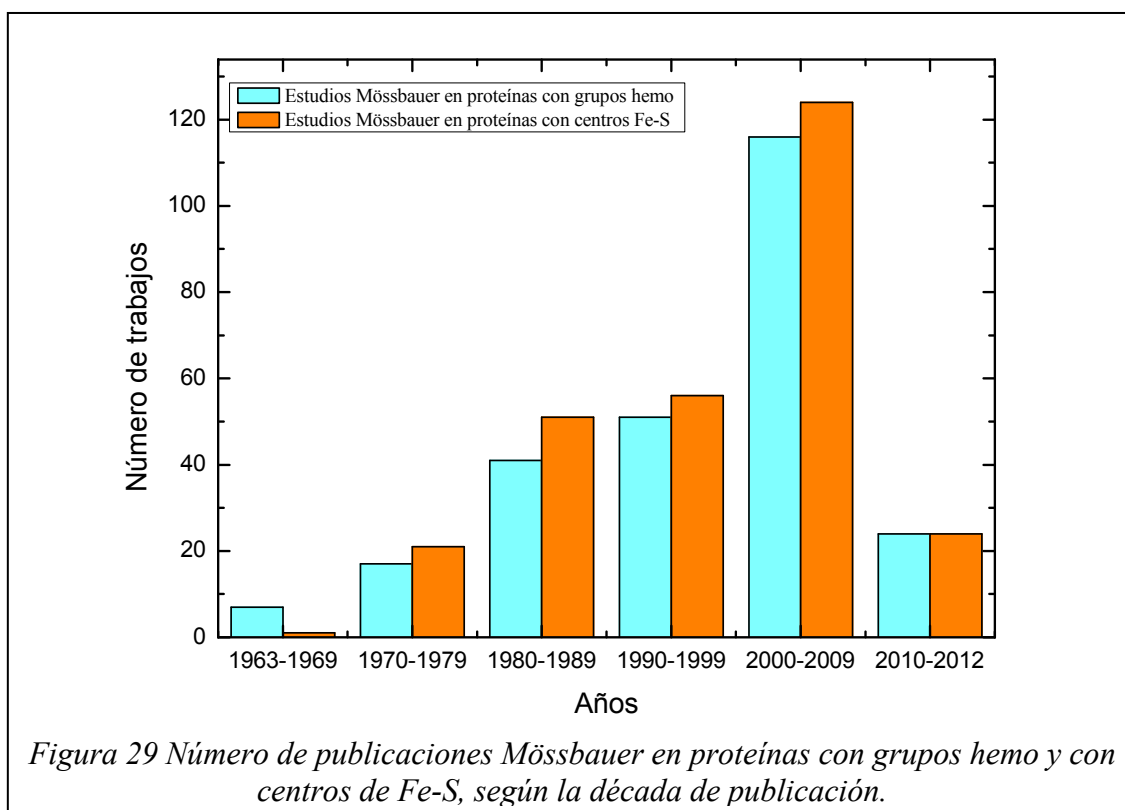
El resultado de esta búsqueda, discriminando número de publicaciones que incluyen EM según la década de publicación, se presenta en la figura 28 en forma de gráfico de barras.



Según lo expuesto, el número de publicaciones Mössbauer en sistemas biológicos supera en dos órdenes de magnitud a las publicaciones PAC en los mismos

sistemas. Es más, las aplicaciones de Espectroscopía Mössbauer en el área de la biología se encuentra en franco aumento desde sus inicios en la década del 60.

En lo que concierne a las sondas Mössbauer utilizadas en la investigación de sistemas biológicos, virtualmente todos los trabajos incluyen ^{57}Fe . Sin embargo pueden encontrarse en la literatura estudios Mössbauer de sistemas biológicos utilizando otros isótopos distintos al ^{57}Fe , que constituyen una fracción muy pequeña de los esfuerzos en esta área.



Como se anticipara, la mayoría de los estudios Mössbauer en moléculas biológicas se centran en las proteínas que contienen hierro, siendo las proteínas con grupos hemo y centros de hierro y azufre las más estudiadas. En la Figura 29 se muestra la tendencia de los estudios Mössbauer en estas dos grandes temáticas de acuerdo con el período temporal del que se trata.

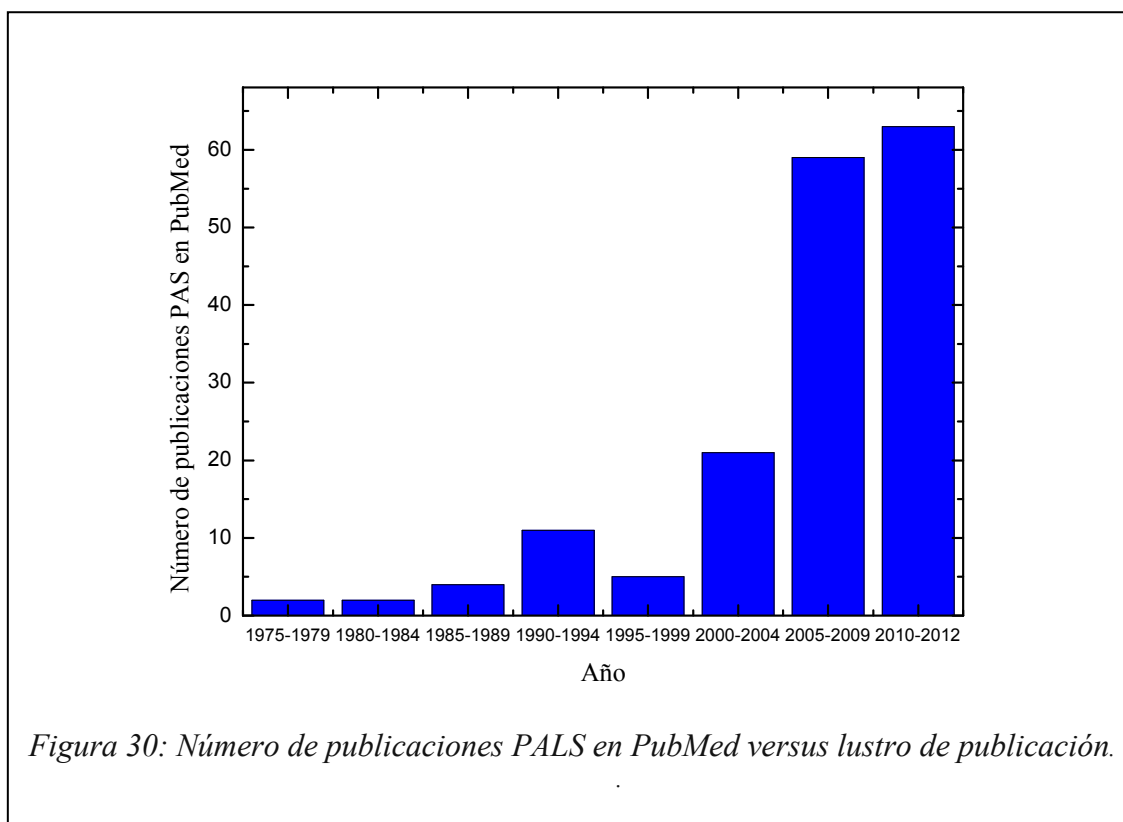
Como ya se ha mencionado, la necesidad de estudiar materiales donde pueda ocurrir absorción libre de retroceso es una limitación importante para la aplicación de EM en materia blanda como son los materiales biológicos. En pos de hacer posible la absorción libre de retroceso, la mayoría de las medidas en moléculas biológicas se realiza en soluciones congeladas o concentradas por ultracentrifugación [Dun 90]. Sistemas más complejos como membranas, tejidos u organismos completos pueden ser congelados directamente o liofilizados [Dub 99]. Existen materiales cuasi-sólidos (moléculas grandes dentro de un líquido viscoso o moléculas moviéndose lentamente a través de una membrana) en los cuales cualquier movimiento es muy pequeño en la escala temporal del proceso Mössbauer y que también son factibles de estudiarse con esta técnica, incluso a temperatura ambiente [Coh 76].

3.2.3 Espectroscopía de Aniquilación de Positrones

Como se ha mencionado, la técnica PALS ha sido ampliamente utilizada para obtener información sobre las densidades electrónicas y el tipo y número de defectos atómicos y moleculares en sólidos. Sin embargo su aplicación en el campo de las ciencias de la vida es escasa, como se discutirá en lo que sigue.

Una búsqueda en Pub Med de la literatura relacionada con “Espectroscopía de Aniquilación de Positrones” arroja 168 trabajos. El número de estas publicaciones según lustro de publicación se presenta en la figura 30 en forma de gráfico de barras. Como puede observarse, el número de publicaciones ha aumentado de manera notable en la última década, siendo la mayoría de estos trabajos concernientes al estudio de materiales poliméricos de distinta naturaleza. En este sentido, la técnica ha sido aplicada exitosamente para estudiar la estructura de los polímeros debido a su capacidad para

monitorear cambios del volumen libre inducidos por variaciones de temperatura, presión, tensión, dosis de radiación, etc [Hau 95, Mog 95, Jea 88].



Las primeras aplicaciones PALS a sistemas de interés biológico, cuatro décadas atrás, conciernen a la investigación de la conformación de proteínas y la dinámica de macromoléculas [Jac 76], transiciones de fase en modelos de membrana [Mac 79], el comportamiento de sistemas micelares [Bel 79] y la formación de complejos moleculares [Jea 77]. En las últimas dos décadas se han sumado esfuerzos para estudiar mediante esta técnica las propiedades de volúmenes libres y estatus de radicales libres en una variedad de sistemas químicos y biológicos que incluyen polímeros [Mon 09, San 11] y biomembranas [San 09]. Otras investigaciones en el campo de la biología incluyen el estudio de degradación y radiólisis de proteínas [Osh 99] y de tejidos humanos y animales [Eli 06, Jea 06, Liu 07, Yan 09]. Finalmente, en los últimos años se comenzó a investigar si la técnica PALS puede ser una nueva fuente de información

experimental sobre el rol de las cavidades en la compresibilidad y expansión térmica de proteínas [Mee 06].

La alta inhomogeneidad física y química de los sistemas biológicos permite anticipar la existencia de una amplia distribución de vidas medias de los positrones. A pesar de ello, los sistemas biológicos presentan espectros PALS que, de manera general, pueden ser descritos en términos de tres contribuciones: dos vidas medias cortas τ_1 y τ_2 (entre 100- 500 ps), que se atribuyen a la aniquilación del *p-Ps* y del positrón libre o atrapado en defectos y por otro lado una vida media larga τ_3 (mayor a 1000 ps) que se asocia con procesos de *pick off* del *o-Ps* confinado en cavidades vacías. Es muy difícil atribuir las vidas medias cortas a alguna característica estructural de los sistemas biológicos dado el carácter altamente heterogéneo de los mismos. Por esta razón en los estudios PALS de este tipo de sistemas se omite la descripción de estas componentes y se enfatiza en la componente de vida media larga dado que es esta componente la que es sensible a los cambios submicroestructurales en este tipo de muestras. En otras palabras, es en la componente de vida media larga donde reside todo el interés de la aplicación de la técnica en el área de la biología. Los parámetros de aniquilación del *o-Ps* en cavidades, τ_3 e I_3 , reportados para distintos sistemas biológicos son presentados en la tabla 2.

La vida media larga τ_3 incluye, en la mayoría de los materiales biológicos, la aniquilación del *o-Ps* en el agua “libre” (o “no ligada” a macromoléculas) presente en dichos sistemas. Una breve discusión sobre las características de la aniquilación en agua se discute en lo que sigue.

En el trabajo de Eldrup [Eld 71] “*Vidas medias de positrones en agua, hielo y en soluciones congeladas*” se reportan τ_3 de 1800 (20) ps y 2010 (30) ps para H₂O y D₂O respectivamente. Los resultados son satisfactoriamente interpretados al considerar como

sitios para la aniquilación del positronio a las cavidades o “jaulas” de diámetros de aproximadamente 3 Å que determinan las moléculas de H₂O en el agua líquida. La estabilidad de la jaula que rodea al positronio, y de allí la vida media de este último,

Sistema	τ_3 (ps)	I ₃ (%)	Referencia
Agua líquida	1860 ± 20	27 ± 1	Eld 71
Aminoácidos (estado sólido)	680- 1300	3- 57	Chu 74
Anhidrasa carbónica (en solución)	1480- 1800	25	Han 76 Han 80
Fosfolípidos (solución)	2000	22	Dje 79
Fosfolípidos 1- anhidro 2- en micelas	2190 (20) 2000- 2520 (20)	14,1 (6) 18,6- 19,5 (6)	Jea 82
Lisozima 1- hidratada 2- deshidratada	1800- 1900 1600-1700	17-18 14	Gre 93
Hemoglobina (solución)	1980 (5)	13,1 (2)	Osh 96
Oxihemoglobina (solución) 1- sin irradiar 2- irradiada	1980 (5) 1660- 1710 (5)	13,1 (2) 16,1- 17,4 (5)	Osh 99
Útero de ratón 1- normal 2- tumoral	2927 (30) 2695- 1841 (20)	6,5 (3) 7,7- 10,1 (1)	Eli 06
Piel humana 1- normal 2- tumoral	2400 (1) 2200- 2300 (1)	22 (1) 13- 10 (1)	Jea 06
Piel humana 1- normal 2- tumoral	2043- 2081 (8) 1951- 2026 (5)	14,16- 14,65 (10) 13,59- 13,70 (14)	Liu 07
Gelatina 1- con 5% de agua 2- con 80 % de agua	1437 1771	14,5 16,3	Aki 07
Estrato córneo (de piel de cerdo)	2100	no reporta	Ito 08
Cerebro (rata) 1- normal 2- tumoral	2070 (17) 2040 (14)	no reporta	Yan 09
Fosfolípidos en micelas	2070- 2180 (20)	no reporta	San 09
Pelo 1- virgen 2- tratado químicamente	1810 (20) 1600 (20)	11,0 (1) 8,0 (1)	Ran 09
Cristalino (cerdo)	1900 (20)	< 25	San 10
Pelo 1- virgen 2- fotodegradado	1825 (10) 1550 (10)	10,0 (1) 10,2 (1)	Ran 10

Tabla 2: Parámetros de aniquilación del o-Ps en cavidades reportados para diversos sistemas biológicos.

depende de la frecuencia de las colisiones entre las moléculas de agua que circunscriben la cavidad, hecho que explica la vida media más larga del *o*-Ps en D₂O, de movimiento más lento que las moléculas de H₂O

Debido a que la vida media de aniquilación del *o*-Ps en las cavidades del biomaterial es típicamente bastante cercana a la del agua (como puede observarse en la tabla 2), la vida media τ_3 medida en este tipo de sistemas es frecuentemente una suma de las vidas medias de aniquilación en el agua y en el biomaterial pesada por sus intensidades. Esta vida media “suma” se corresponde fuertemente con el porcentaje de agua de la muestra y en consecuencia la τ_3 medida en soluciones diluidas es cercana a la vida media en agua pura ($\tau_{\text{agua}} \sim 1800$ ps) [Gre 93, Aki 07]. En este sentido, el hecho de que los parámetros de aniquilación en agua al igual que su dependencia con la temperatura sean bien conocidos [Eld 71] permite establecer el peso de cada una de las contribuciones de la vida media “suma” por inspección de la dependencia de dicha vida media con la temperatura [San 10].

3.3 Discusión de la información obtenida

La relevancia de la información obtenida mediante las técnicas nucleares cuando son aplicadas para investigar sistemas de interés en biología depende tanto de la técnica utilizada como del tipo de muestra que se analiza.

Desde las primeras aplicaciones de la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas a sistemas biológicos, hace más de 6 décadas, la técnica ha progresado sustancialmente tanto desde el punto de vista experimental como de las interpretaciones teóricas de los resultados. Si bien desde los primeros intentos de utilizar PAC en el campo de la biología se ha considerado una ventaja el hecho que las medidas se pueden

realizar en solución [Lei 68], la única información que se extrae de este tipo de iniciativas concierne al estado de movimiento de las moléculas. Estudios PAC en soluciones de ADN [Tso 01, Tso 03] dan idea de la rigidez de la macromolécula y en liposomas, de la integridad de los sistemas [Mau 79, Der 88, Ma 93]. Sin embargo, en ninguno de los casos se obtiene información sobre el arreglo atómico alrededor de la sonda, no haciéndose uso de todo el potencial de la técnica. Iniciativas que incluyen el agregado de sacarosa a la solución y la realización de medidas a bajas temperaturas tendientes a disminuir la rotación difusional arrojan resultados más interesantes. Siguiendo esas estrategias y a partir del dopaje de apoproteínas especiales con sondas PAC, se estudió la dinámica de la unión de metales a sitios especiales de proteínas [Hem 01, Trö 02], las interacciones entre proteínas [Dan 99] y la geometría de coordinación de sitios catalíticos [Hem 95], entre otros. Es este tipo de estudios, en el área de la química bioinorgánica, el que constituye el campo más exitoso de aplicaciones PAC a sistemas de interés en biología.

Las aplicaciones Mössbauer en el área biológica son bien reconocidas, hecho que se refleja no sólo en el número de publicaciones en dicho campo sino también en la relevancia de los resultados obtenidos para caracterizar los arreglos atómicos alrededor del hierro y sus estados de oxidación, entre otros parámetros. Podría decirse que virtualmente todas las ferroproteínas más conocidas han sido estudiadas por Espectroscopía Mössbauer. Los estudios se centran en la actualidad en la caracterización de proteínas del metabolismo intermedio de una variedad de especies. Una limitación importante es que los experimentos Mössbauer en este tipo de sistemas deben realizarse a bajas temperaturas, debiendo prestarse especial cuidado a la hora de correlacionar los resultados así obtenidos con las características del sistema a temperatura ambiente.

La mayoría de las investigaciones PALS fuera del campo de la materia condensada están orientadas a los materiales poliméricos. En el campo de la biología, los estudios PALS de las transiciones de fase de proteínas y lípidos arrojan resultados confiables que son confirmados por otras técnicas, haciendo de este tipo de iniciativas las más relevantes en el área. Estos estudios, que se incluyen entre las primeras aplicaciones PALS a sistemas biológicos [Han 76, Dje 79], han recobrado protagonismo en la actualidad debido a la posibilidad de mejorar la interpretación de los resultados con el auxilio de estudios de dinámica molecular y simulaciones, entre otros [San 09]. Es en estos sistemas relativamente homogéneos desde un punto de vista físico y químico donde la interpretación de las características de aniquilación de positrones en materiales biológicos resulta más sencilla y constituye una herramienta útil a la hora de abordar estudios PALS en sistemas biológicos más complejos. En ese sentido, la alta complejidad de algunos sistemas biológicos hace difícil la posibilidad de su caracterización absoluta mediante PALS. Sin embargo, la dependencia que presentan las características de aniquilación de positrones con la presión y la temperatura hacen de este tipo de estudios un campo fértil de aplicación de la técnica en materia blanda.

Capítulo 4

Experimental

4.1 Introducción

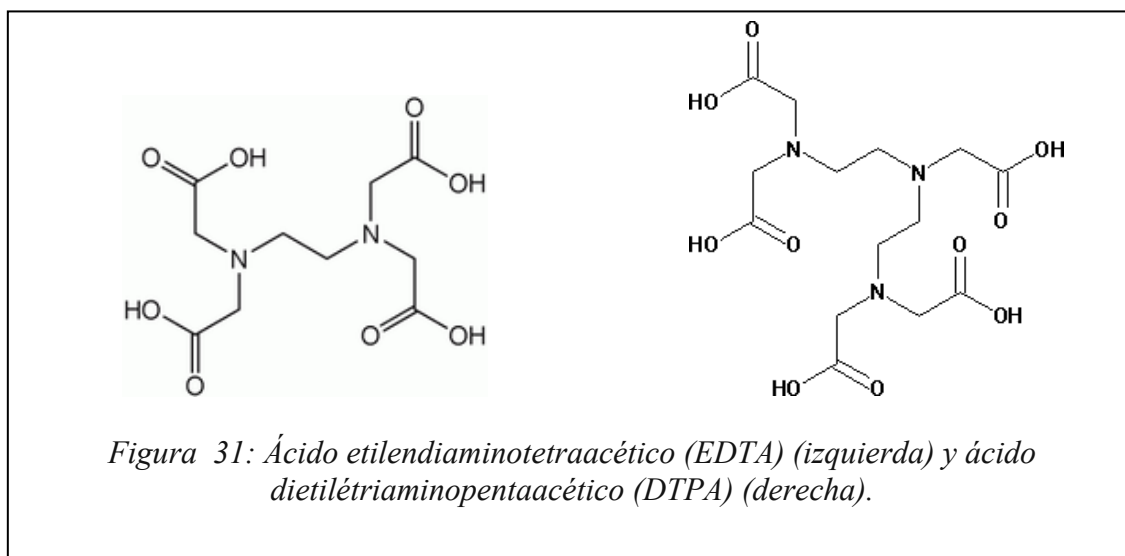
En base al análisis de la literatura existente sobre las aplicaciones de las técnicas de Correlaciones Angulares Perturbadas, Espectroscopía Mössbauer y Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de medición de vidas medias a la biología, se seleccionaron sistemas de estudio cuya investigación se abordó, mediante las técnicas correspondientes, en este trabajo de tesis.

En este capítulo se presentan estudios de complejos metálicos poliaminocarboxilados mediante PAC, de un complejo orgánico con un centro de hierro azufre mediante Espectroscopía Mössbauer y de muestras tisulares mediante PALS. En cada caso se discute, en primer lugar, el estado del arte y las razones de la elección realizada. Finalmente son presentados los experimentos llevados a cabo, cuyos resultados son discutidos en relación a la problemática particular abordada y, cuando corresponde, a la temática general de aplicación de estas técnicas nucleares en la investigación de materia blanda.

4.2 Experimentos PAC en complejos metálicos

4.2.1 Estado del arte

Durante los últimos 50 años, los complejos metálicos han sido utilizados como agentes de diagnóstico para centellografía gama, tomografía de emisión de positrones y más recientemente para realzar el contraste en imágenes de resonancia magnética nuclear [Kon 90]. En la actualidad, las investigaciones en medicina están enfocadas en el desarrollo de mejores radiofármacos de diagnóstico y agentes de contraste [Rei 99], junto con estudios en el campo de los radiofármacos terapéuticos [IAE 99].



Entre muchas moléculas orgánicas usadas para la complejación de metales, la utilización de los ligandos poliaminocarboxilados clásicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido dietilentetraaminopentaacético (DTPA) (cuyas estructuras químicas se muestran en las figura 31) constituye todavía una de las estrategias de elección. Muchos quelatos del tipo poliaminocarboxilato metálico fueron

obtenidos y caracterizados en estado cristalino [Sie 62] mientras que no pudo lograrse una adecuada cristalización en otros casos

El diseño de los agentes de diagnóstico basados en complejos metálicos requiere de la correlación de aspectos de la química de coordinación y del comportamiento *in vivo*. Para los complejos que serán utilizados con fines médicos, es de gran interés que se logre una complejación fuerte del metal con el objetivo de evitar la toxicidad de este último. Entre los demás factores a considerar se incluyen las propiedades redox, la estabilidad, la estequiometría, la carga y la lipofilidad del complejo metálico. De este modo, es de sumo interés arribar a un buen entendimiento de la conformación y comportamiento dinámico de estos quelatos.

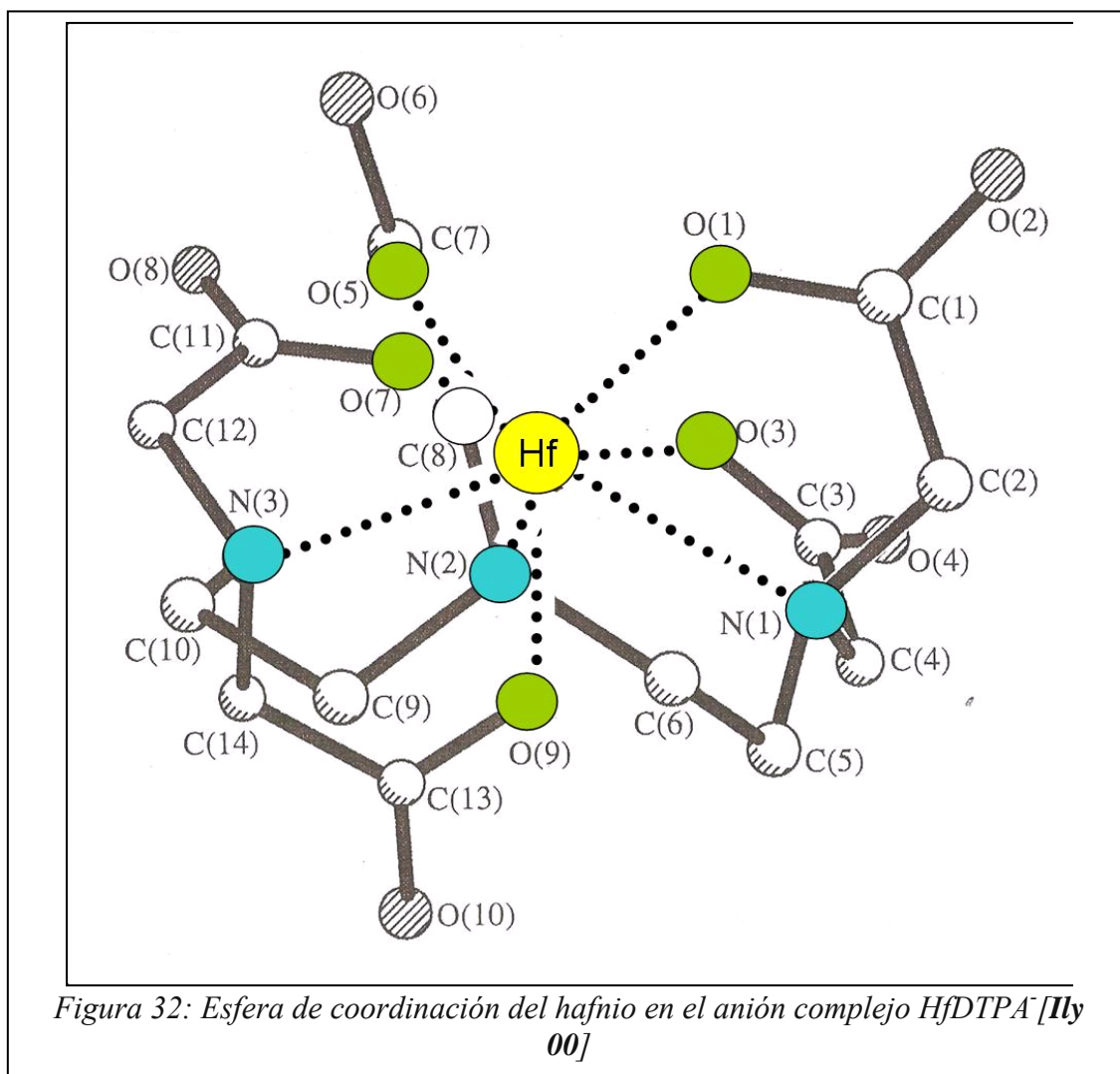
El DTPA forma complejos estables con muchos metales pesados, en particular con indio y hafnio que presentan isótopos adecuados para ser estudiados con la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas.

Uno de los radioisótopos del indio, el ^{111}In , se ha utilizado clásicamente en la preparación de radiofármacos de diagnóstico y más recientemente en algunas estrategias terapéuticas. Es en el marco de dichas investigaciones donde pueden encontrarse la mayoría de los reportes que versan sobre la complejación del indio con DTPA en solución. Sin embargo, es escasa la información sobre los dietiléntriaminopentaacetatos de indio en estado cristalino [Mae 89]

La complejación de hafnio con DTPA ha sido menos estudiada probablemente debido a que dicho átomo no presenta ningún isótopo radiactivo con características adecuadas para la fabricación de radiofármacos. Sin embargo ha logrado sintetizarse y caracterizarse con éxito el dietiléntriaminopentaacetato de hafnio y potasio trihidratado ($\text{KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) [Ily 00, Dav 92]. En la figura 32 se muestra un esquema de la esfera de coordinación del hafnio en el anión complejo $[\text{HfDTPA}]^-$.

Existen varios reportes sobre estudios PAC en complejos poliaminocarboxílicos de metales. Todos ellos involucran la quelación en el laboratorio de la sonda PAC con el ácido poliaminocarboxílico de interés. Las investigaciones que utilizan la sonda ^{111}In [Sun 74, Aks 95, Shp 98] versan sobre la complejación del metal en solución. Los sistemas de estudio se obtienen mezclando, en solución, cantidades adecuadas de $^{111}\text{InCl}_3$ y el ácido poliaminocarboxílico. En todos los casos se observan comportamientos PAC dinámicos típicos que varían con el pH de la muestra sin obtenerse información sobre las interacciones hiperfinas estáticas. En ninguno de los casos se realiza una verificación de la quelación del ^{111}In , asumiendo, sin prueba experimental, que la sonda PAC se encuentra en el sitio de interés.

Las investigaciones PAC que involucran al ^{181}Hf [Das 90, Das 03, Ama 09] se



centran en el estudio de los sólidos que resultan de la complejación de la sonda con EDTA o DTPA en solución. En el primero de los trabajos [Das90] se reportan resultados PAC del sólido que se obtiene, por síntesis radioquímica, a partir de EDTA y HfOCl_2 . Si bien el procedimiento químico utilizado para la preparación del complejo parece adecuado, la calidad de los resultados experimentales es mala debido principalmente a la baja resolución temporal de los detectores de NaI(Tl) y la mala estadística de las mediciones. El mismo sistema es objeto de estudio en el trabajo de Amaral *et al* [Ama 09], donde el sólido se obtiene a partir de EDTA y HfF_4 . En este caso la buena resolución temporal de los detectores de BaF_2 utilizados y la estadística de las medidas proveen resultados PAC confiables. Finalmente, en el trabajo de Das *et al* [Das 03] se estudia el sólido que resulta de mezclar cantidades adecuadas de HfOCl_2 y DTPA, en solución. En este caso la calidad de los resultados PAC es adecuada. Cabe remarcar que en ninguno de los tres trabajos se realiza una verificación de la identidad del sólido obtenido. De esta manera la interpretación de los resultados obtenidos en base a la creencia de que el ^{181}Hf se encuentra complejado por el ácido poliaminocarboxílico podría resultar, en muchos casos, incorrecta.

4.2.2 Experimental

En este trabajo de tesis se estudian los sistemas $^{111}\text{In/DTPA}$ y $^{181}\text{Hf/DTPA}$ mediante la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas y técnicas complementarias como difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría.

Como se puede inferir de lo expuesto en “estado del arte”, al encarar una investigación PAC de esta naturaleza es necesario contar con sistemas de estudio donde la unión molécula-sonda PAC esté garantizada a fin de arribar a interpretaciones

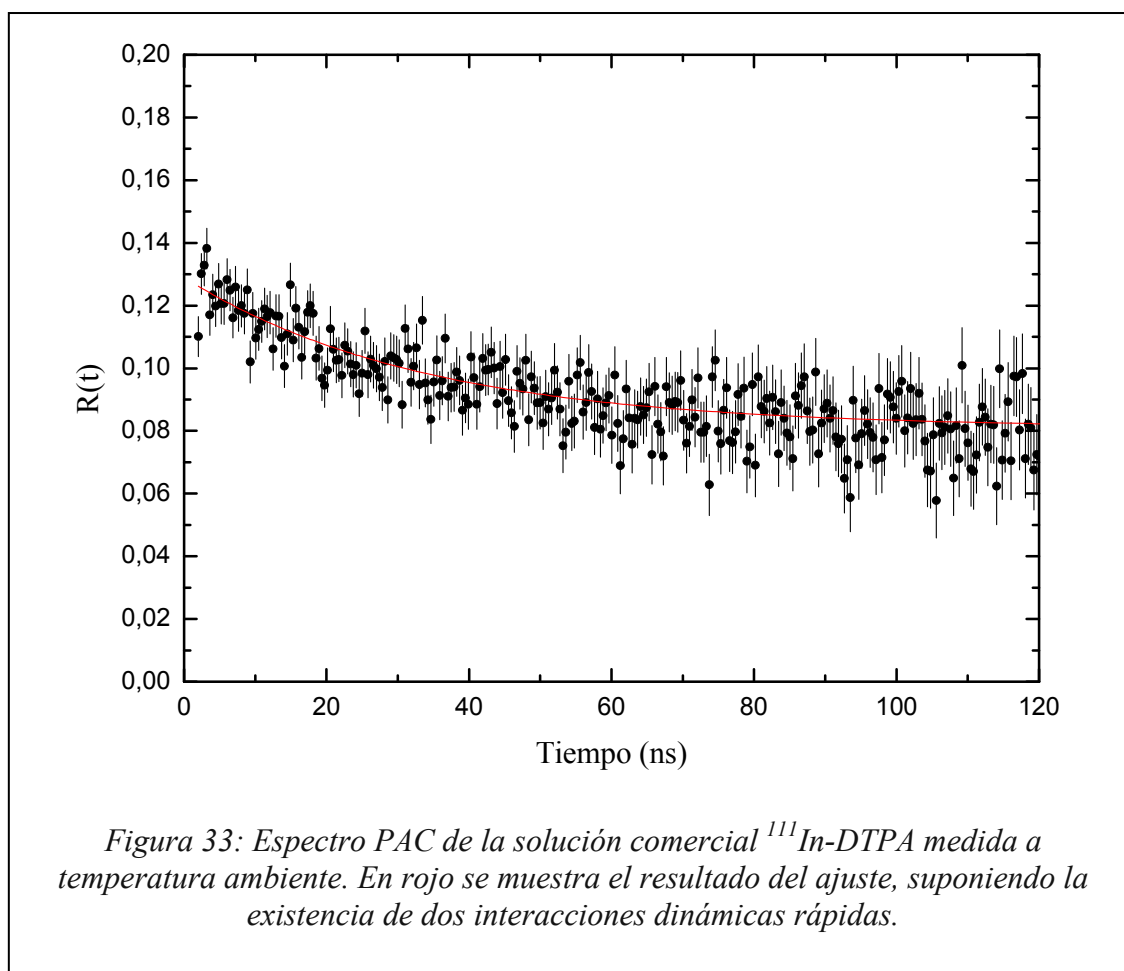
confiables de los resultados obtenidos. En el caso del sistema In/DTPA la unión se garantizó trabajando con una solución del radiofármaco comercial $^{111}\text{InDTPA}$. El objetivo fue estudiar la posibilidad de obtener información de las interacciones hiperfinas estáticas en el sitio del ^{111}In para lo cual se intentó disminuir la rotación difusional por aumento de la viscosidad de la solución, evaporación del solvente y congelación de la muestra.

En el caso de los complejos con hafnio se estudiaron en primer lugar mediante Correlaciones Angulares Perturbadas los sólidos que resultan de mezclar en solución cantidades adecuadas de $^{181}\text{Hf-HfF}_4$ y EDTA (experimento equivalente al de Amaral *et al* [Ama 09]) y el que se obtiene a partir de $^{181}\text{Hf-HfF}_4$ y DTPA. Con el objetivo de establecer la naturaleza de los productos formados se realizaron controles de síntesis involucrando sólo reactivos inorgánicos que se identificaron por difracción de rayos X y se caracterizaron por PAC. En una segunda parte del trabajo se logró poner a punto la síntesis química de $\text{KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (y su análogo $\text{KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a partir de HfOCl_2 (o ZrOCl_2) siguiendo un procedimiento establecido en la literatura [Dav 92]. Una vez corroborado el éxito del procedimiento mediante estudios de difracción de rayos X, se procedió a la síntesis de los compuestos radiactivos $^{181}\text{Hf-KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (y $^{181}\text{Hf-KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) que fueron estudiados, a temperatura ambiente, por Correlaciones Angulares Perturbadas. En vistas de estudiar el comportamiento térmico de estos complejos mediante PAC, se realizaron medidas termogravimétricas y de calorimetría diferencial de barrido con el objetivo de establecer las temperaturas en las cuales pueden esperarse cambios. Se realizaron estudios PAC del complejo $^{181}\text{Hf-KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en función de la temperatura (desde -265 hasta 277 °C). Las distintas interacciones hiperfinas encontradas fueron interpretadas en términos de las medidas

calorimétricas previamente mencionadas. Adicionalmente se realizaron estudios PAC de la hidratación rápida y lenta del $^{181}\text{Hf-KZrDTPA}$.

4.2.2.1 Estudios PAC de $^{111}\text{In-DTPA}$

El radiofármaco comercial $^{111}\text{In-DTPA}$ en buffer fosfato a pH 7,0-7,6 (Mallinckrodt Medical Katalog Nr. DRN 4916) se colocó, dentro de un tubo eppendorf, entre los detectores PAC y fue medido a temperatura ambiente. En la figura 33 se presenta el espectro PAC obtenido que muestra el típico comportamiento exponencial de un sistema que se reorienta con $\omega_Q\tau_c \ll 1$. El ajuste de los datos se realiza considerando la existencia de dos fracciones de sondas:

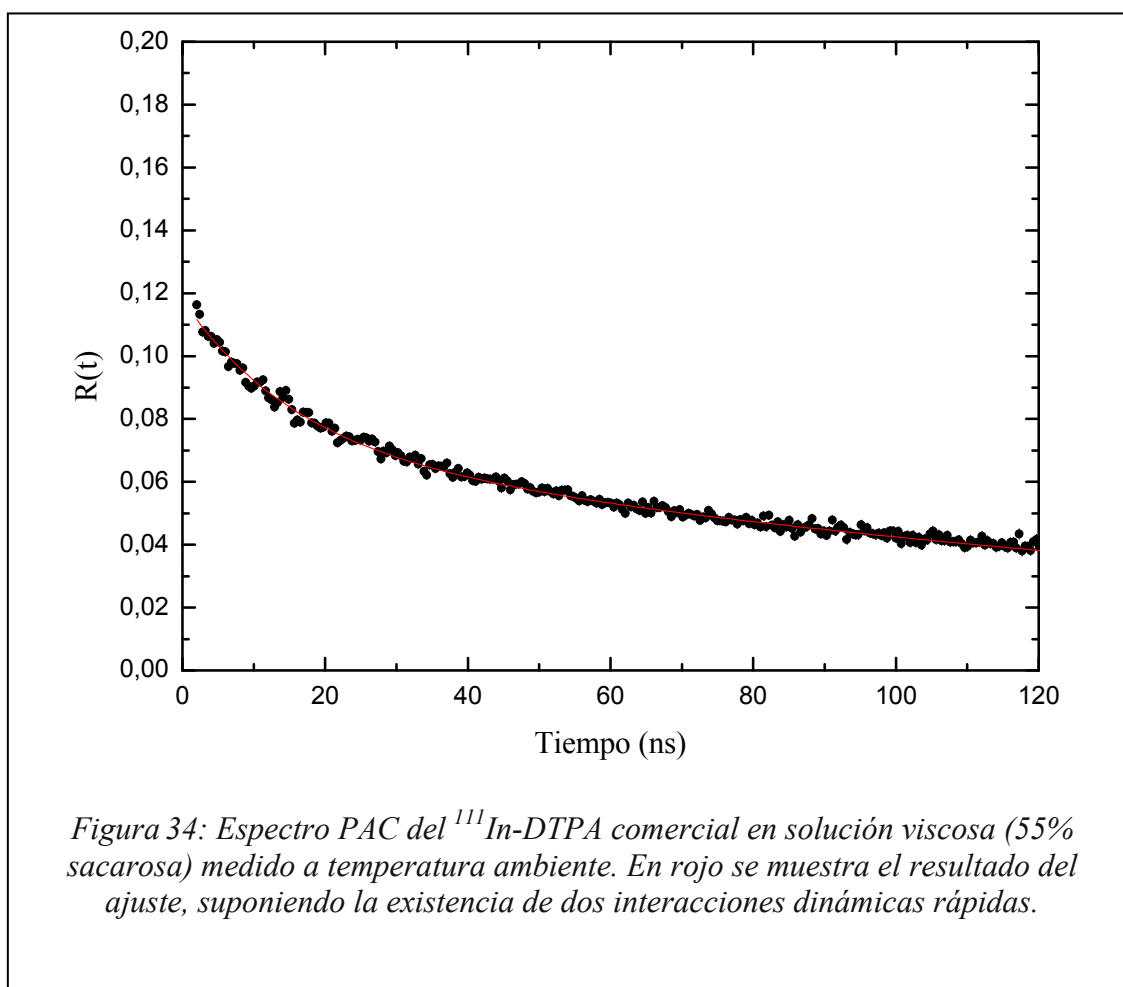


$$f_1 = 60\% \quad \lambda_0 = 0 \text{ MHz.}$$

$$f_2 = 40\% \quad \lambda_1 = 30 \text{ MHz}$$

Sobre las bases de la proporcionalidad existente entre el tiempo de correlación y el volumen de la molécula donde está unida la sonda, la componente de mayor factor de relajación se asocia con sondas ligadas al DTPA mientras que la fracción f_1 debe asociarse con sondas “libres” o ligadas a moléculas de menor tamaño. No es posible establecer si las especies incluidas en f_1 estaban presentes en la solución comercial o si se generan por ruptura del InDTPA como consecuencia de la ionización de la sonda asociada con la captura electrónica (ver inciso 2.2.2.1. b)).

Con el objetivo de disminuir el movimiento molecular, el ^{111}In -DTPA se midió, a temperatura ambiente, en un medio altamente viscoso (sacarosa 55%). El espectro obtenido (figura 34) muestra nuevamente el comportamiento exponencial característico



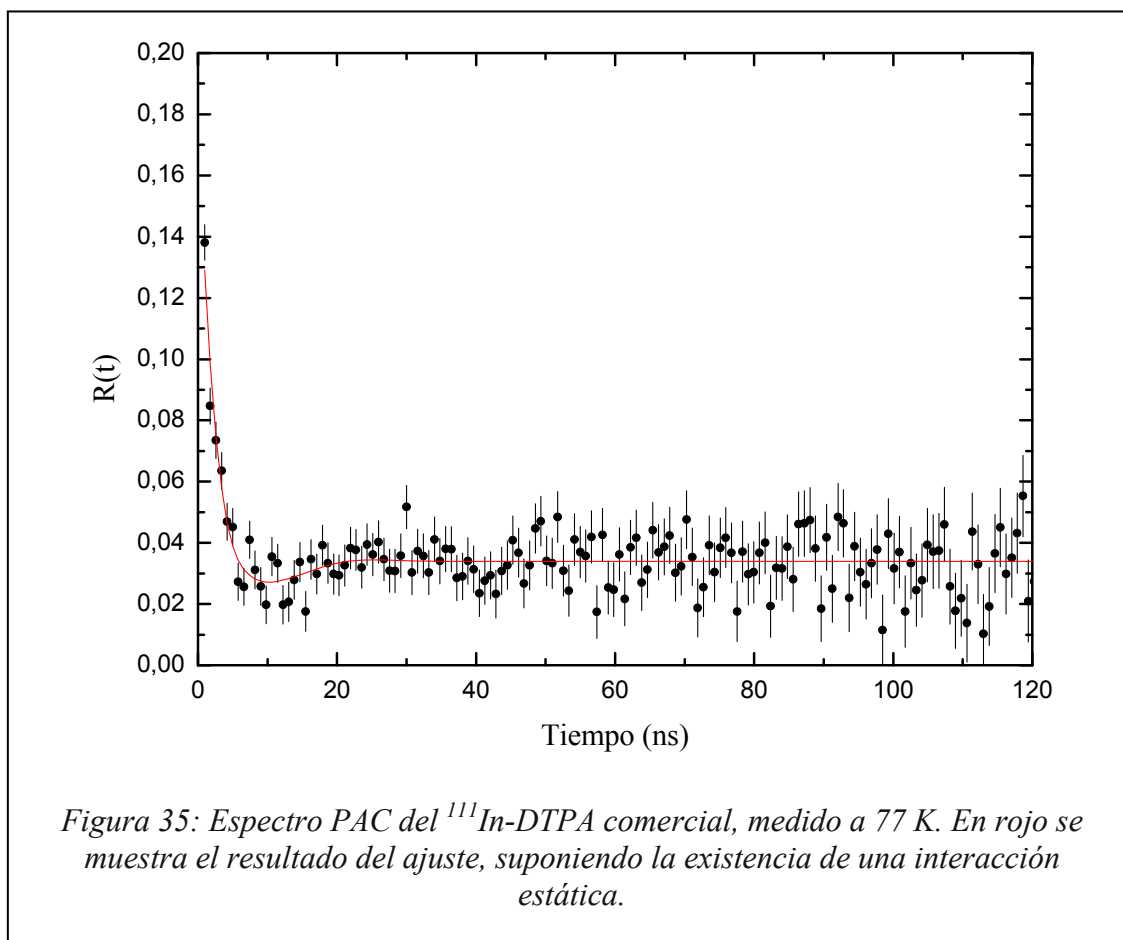
de rotaciones difusionales rápidas. Nuevamente, los datos son satisfactoriamente ajustados con dos interacciones dinámicas rápidas:

$$f_1 = 60\% \quad \lambda_0 = 5 \text{ MHz.}$$

$$f_2 = 40\% \quad \lambda_1 = 64 \text{ MHz}$$

El incremento de los tiempos de correlación de las fluctuaciones que afectan a ambas fracciones se atribuye al incremento de la viscosidad de la solución debida al agregado de sacarosa. Sin embargo, aún en esta situación, no es posible obtener, a partir de las medidas PAC, información sobre el arreglo atómico alrededor de la sonda.

Una medida a baja temperatura fue realizada sobre el mismo sistema a fin de disminuir aún más la rotación difusional. En la figura 35 se observa el resultado de medir a 77 K la solución comercial de $^{111}\text{InDTPA}$. Los datos pueden ajustarse satisfactoriamente considerando la existencia de una interacción estática de parámetros

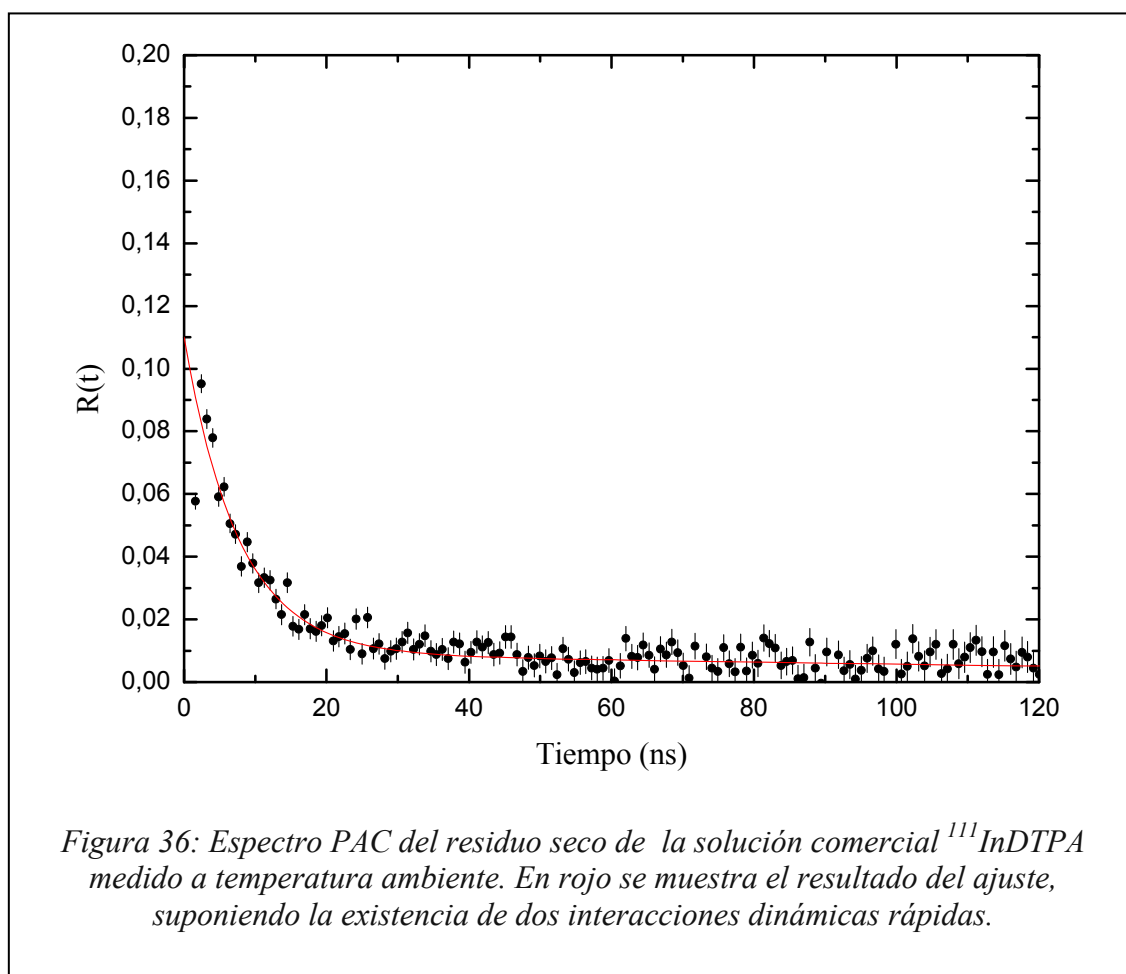


hiperfinos $\omega_Q=37$ (1) Mrad/s , $\eta=0$ y $\delta=80$ (8) %. La alta distribución de esta interacción refleja que la distribución de cargas en torno de cada sonda es distinta. Este hallazgo puede interpretarse de las siguientes maneras:

a) el congelamiento lleva a la formación de un sólido muy desordenado y cada átomo de ^{111}In “ve” una distribución de cargas distinta.

b) la captura electrónica que sucede durante la desintegración del ^{111}In resulta en una modificación de las cargas alrededor de las sondas que es distinta en cada una de ellas. El hecho de encontrarse a bajas temperaturas no hace posible la redistribución de cargas adecuada para arribar a la configuración que corresponde al equilibrio.

Con el objetivo de eliminar la posibilidad de rotación difusional y de allí la interacción dinámica asociada, se evaporó el solvente de la preparación comercial y se



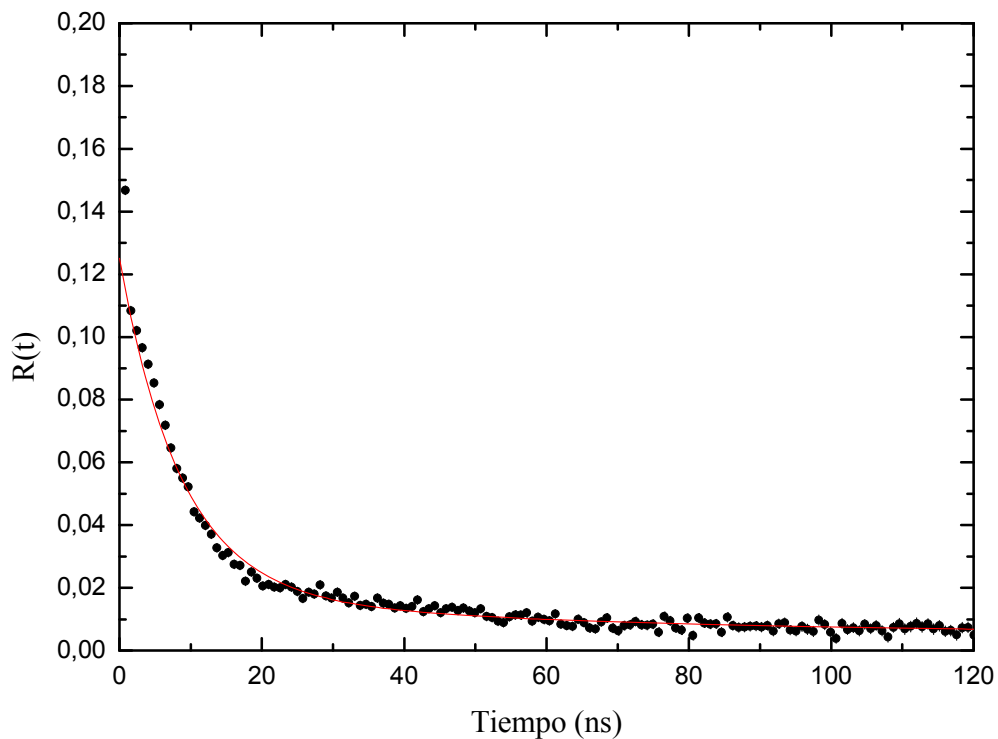


Figura 37: Espectro PAC del $^{111}\text{In-InCl}_3$ seco medido a temperatura ambiente. En rojo se muestra el resultado del ajuste, suponiendo la existencia de dos interacciones dinámicas rápidas.

medió por PAC el residuo seco, experimento cuyo resultado se muestra en la figura 36.

El espectro, que muestra nuevamente el comportamiento exponencial característico de interacciones rápidas puede ajustarse con dos contribuciones:

$$f_1 = 84\% \quad \lambda_0 = 131 \text{ MHz.}$$

$$f_2 = 16\% \quad \lambda_1 = 2 \text{ MHz}$$

A diferencia de las medidas en solución a temperatura ambiente, este efecto dinámico no puede atribuirse a la rotación difusional. Una interpretación posible es que la distribución de cargas en torno de la sonda, distorsionada por el proceso de captura electrónica, evoluciona hacia el equilibrio (*after effects*). El hecho de que haya dos componentes significa que, en promedio, se pueden distinguir dos apartamientos de la distribución normal de carga.

Un efecto semejante se observó al medir el $^{111}\text{In-InCl}_3$ seco, cuyo espectro PAC a temperatura ambiente se muestra en la figura 37 y puede ajustarse con dos interacciones dinámicas:

$$f_1 = 89\% \quad \lambda_0 = 117 \text{ MHz.}$$

$$f_2 = 11\% \quad \lambda_1 = 17 \text{ MHz}$$

Las diferencias entre los parámetros correspondientes a los dos experimentos tienen naturalmente que ver con la diferencia en la composición química de las sustancias.

Es interesante destacar que medidas PAC del $^{111}\text{In-InCl}_3$ a 250°C resultan en espectros que reflejan la interacción estática correspondiente al gradiente de campo eléctrico inherente al estado cristalino del compuesto (datos no mostrados). En otras palabras, a 250°C se lograron eliminar los *after effects* de la captura electrónica del ^{111}In . El efecto de la temperatura es semejante al conocido en el caso de compuestos semiconductores y óxidos conductores donde el incremento de la temperatura aumenta la disponibilidad electrónica en el sitio de la sonda. El intento de un experimento similar con el InDTPA no se pudo concretar debido a la descomposición térmica del mismo.

4.2.2.2 Estudios PAC de complejos poliaminocarboxílicos de ^{181}Hf

4.2.2.2.1 Sólidos que resultan a partir de HfF_4 y EDTA (o DTPA)

El ^{181}Hf necesario para la preparación de las muestras PAC se obtuvo a partir de la activación del ^{180}Hf presente en hafnio metálico natural, por captura de neutrones térmicos en el reactor RA3 de CNEA (Comisión Nacional de Energía Atómica-

Argentina). Luego, el hafnio metálico radiactivo fue disuelto en soluciones de ácido fluorhídrico de diferentes concentraciones.

Las muestras fueron preparadas mezclando cantidades adecuadas de 0,15 M Na₂EDTA.2H₂O (ó 0,10 M Na₂DTPA) con ¹⁸¹Hf-HfF₄ en HF 4% (muestras “bajo fluoruro”) o ¹⁸¹Hf-HfF₄ en HF 40% (muestras “alto fluoruro”). En las muestras control las soluciones de las sales sódicas de los ácidos poliaminocarboxílicos fueron reemplazadas por NaOH 0,30 M. En la Tabla 3 se presentan, para cada muestra, los reactivos utilizados en su preparación y la relación de átomos de flúor a átomos de sodio obtenida en cada caso. Para todas las muestras el volumen final fue de 60-70 ul y se verificó la aparición de un pequeño precipitado que contenía toda la radioactividad. Estos pellets, junto con la solución sobrenadante, fueron colocados para su posterior medida en el espectrómetro PAC.

	0.15 M Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.10 M Na ₂ DTPA	NaOH 0,30 M	¹⁸¹ Hf- HfF ₄ en HF 4%	¹⁸¹ Hf- HfF ₄ en HF 40%	Cociente átomos de flúor/ átomos de sodio
Control bajo fluoruro			X	X		1,4
Hf/EDTA bajo fluoruro	X			X		1,4
Hf/DTPA bajo fluoruro		X		X		1,2
Control alto fluoruro			X		X	4
Hf/EDTA alto fluoruro	X				X	3,9
Hf/DTPA alto fluoruro		X			X	3

Tabla 3: Detalle de las muestras obtenidas a partir de ¹⁸¹Hf-HfF₄ indicando con cruces los reactivos utilizados en su preparación. En la última columna se muestra la relación entre los átomos de flúor y los átomos de sodio a la que se arriba en cada caso.

Con el objetivo de elucidar la naturaleza química de los productos de reacción, se prepararon controles “bajo fluoruro” y “alto fluoruro” no radiactivos (equivalentes a los de la Tabla 3) para realizar medidas de difracción de rayos X.

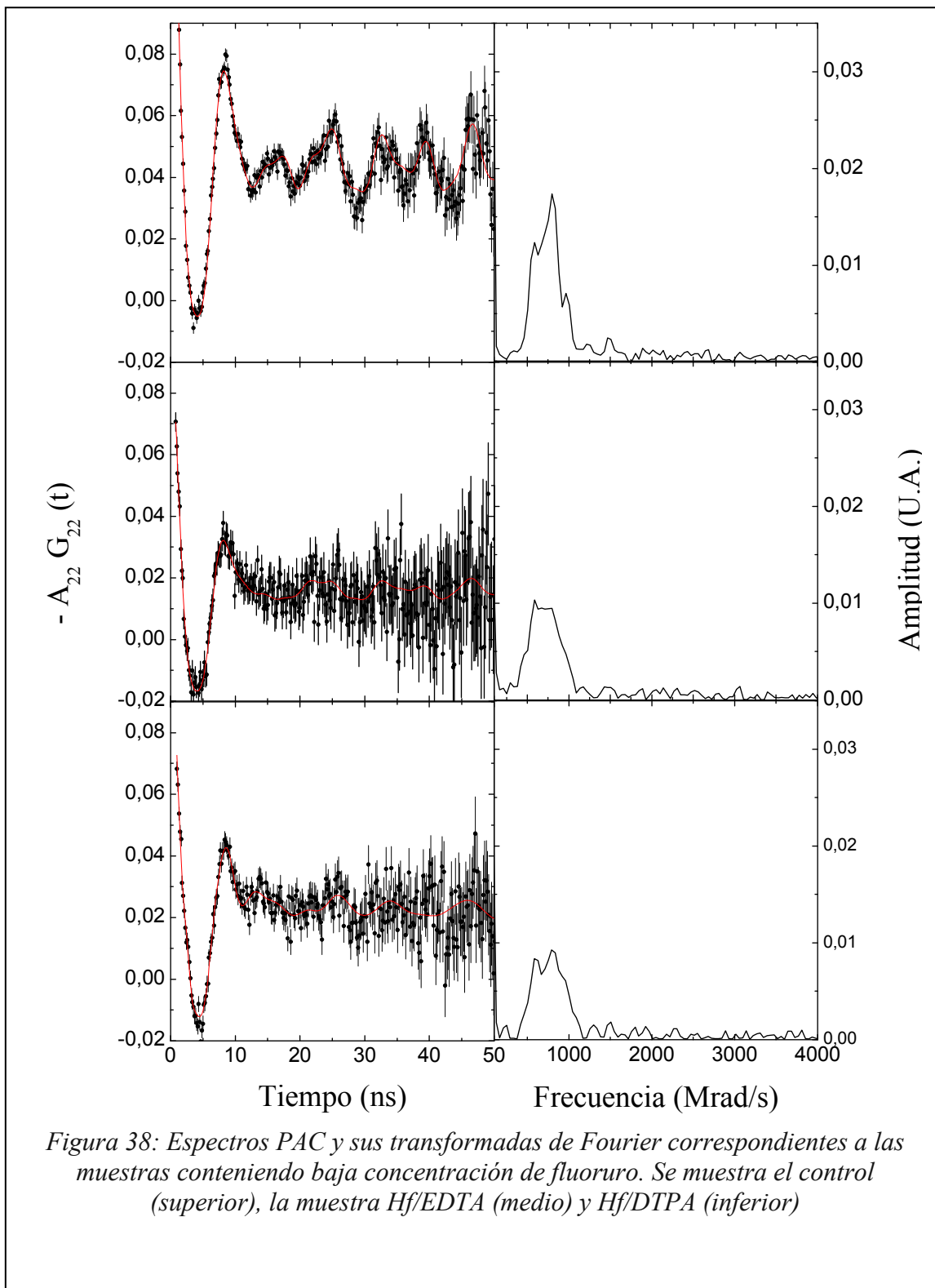


Figura 38: Espectros PAC y sus transformadas de Fourier correspondientes a las muestras conteniendo baja concentración de fluoruro. Se muestra el control (superior), la muestra Hf/EDTA (medio) y Hf/DTPA (inferior)

En la Figura 38 se muestran los espectros PAC y sus transformadas de Fourier para las muestras que contienen baja concentración de fluoruro. Los espectros fueron ajustados asumiendo la existencia de dos interacciones cuadrupolares principales ($\omega_Q=73(1)$ Mrad/s, $\eta=0,84(1)$ y $\omega_Q=52(1)$ Mrad/s, $\eta=0,95(5)$) con diferentes amplitudes en cada caso. Una tercera componente minoritaria ($\omega_Q=86(1)$ Mrad/s, $\eta=0,80(1)$) apareció en todos los espectros. Cabe destacar que en la investigación PAC de Hf/EDTA de Amaral *et al* [Ama 09], donde el compuesto se preparó en forma análoga a la realizada en el presente trabajo, el espectro obtenido es muy similar a los que se están describiendo. El difractograma del control “bajo fluoruro” (mostrado en Fig. 39 a) contiene principalmente los picos de difracción del Na_3HfF_7 y una fracción minoritaria de Na_2HfF_6 .

En la figura 40 se muestran los resultados PAC para las muestras conteniendo alta concentración de iones fluoruro. El procedimiento de ajuste se realizó utilizando parámetros S_{2n} libres para tener en cuenta la existencia de direcciones preferenciales del gradiente de campo eléctrico. En todos los casos aparece una única interacción bien definida ($\omega_Q=94(0)$ Mrad/s, $\eta=0,38(0)$). El difractograma del control conteniendo alta concentración de fluoruro corresponde esencialmente a tridecafluorodihafnato de sodio ($\text{Na}_5\text{Hf}_2\text{F}_{13}$).

Cabe destacar que los espectros resultantes son independientes del pH de las muestras ya que los parámetros hiperfinos obtenidos para muestras control preparadas a partir de NaF 0,30 M (pH final 2-3) fueron virtualmente idénticos a los de las muestras control presentadas en este trabajo (pH final 6-7). Asimismo, es remarcable que los resultados experimentales obtenidos a partir de muestras secadas al aire (resultados no mostrados) son casi idénticos a los obtenidos a partir de las muestras aquí medidas, que contenían, como se mencionó, tanto los sólidos precipitados como el sobrenadante.

De esta manera, las frecuencias cuadrupolares encontradas en las muestras conteniendo DTPA o EDTA son virtualmente idénticas a aquellas que caracterizan a las muestras que incluyen sólo los componentes inorgánicos. Se concluye entonces que el

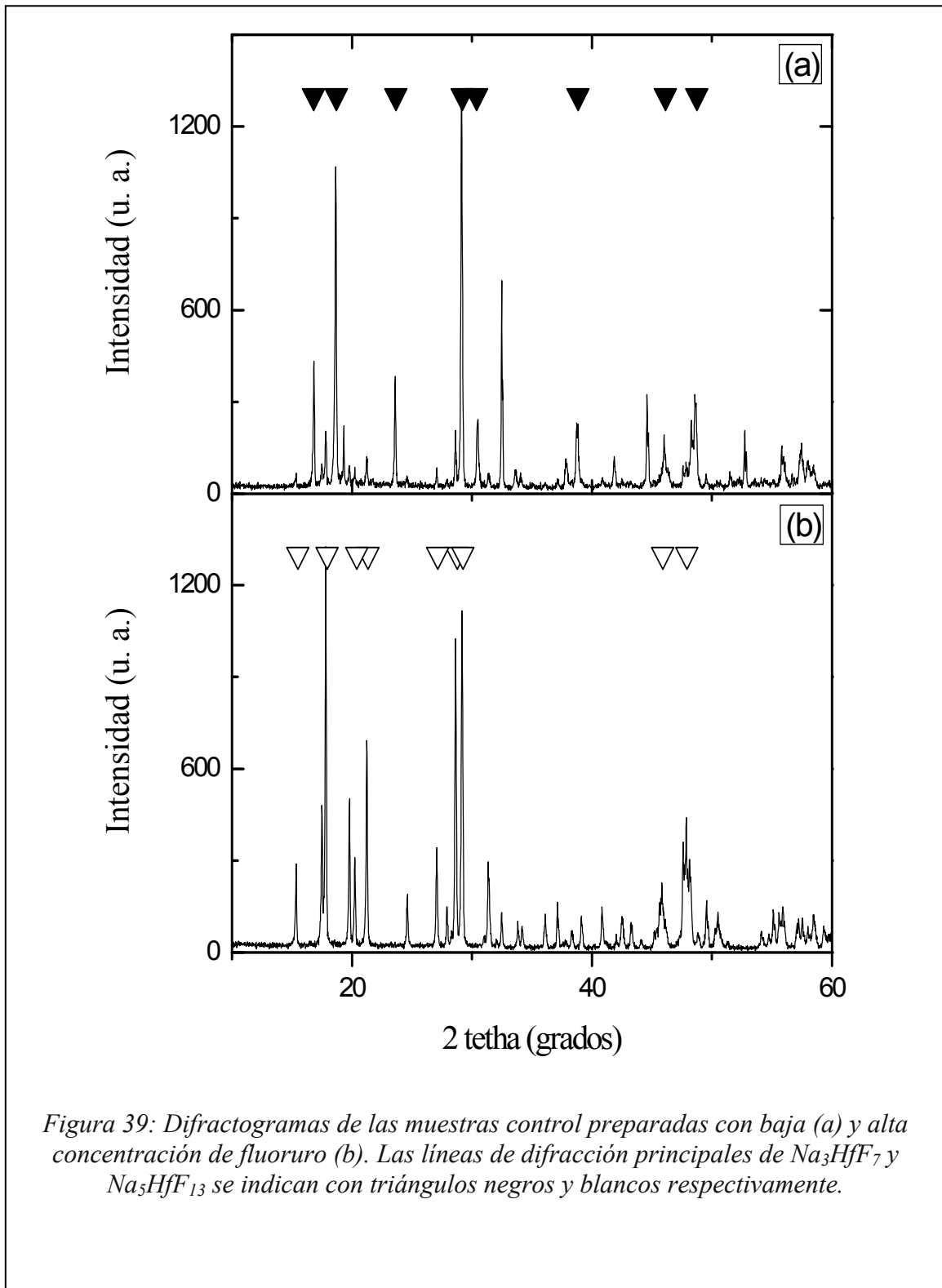


Figura 39: Difractogramas de las muestras control preparadas con baja (a) y alta concentración de fluoruro (b). Las líneas de difracción principales de Na_3HfF_7 y $\text{Na}_5\text{HfF}_{13}$ se indican con triángulos negros y blancos respectivamente.

procedimiento realizado no conduce en ningún caso al dopaje de los ácidos poliaminocarboxílicos. En particular, el mezclado de las sales de sodio de DTPA (o EDTA) y HfF_4 da lugar a la formación de fluoruros de diferente estequiometría dependiendo del cociente de átomos de flúor a átomos de sodio presente en el tubo de reacción: Na_3HfF_7 o $\text{Na}_5\text{Hf}_2\text{F}_{13}$ para cocientes de alrededor de 1,5 y 3,5 respectivamente.

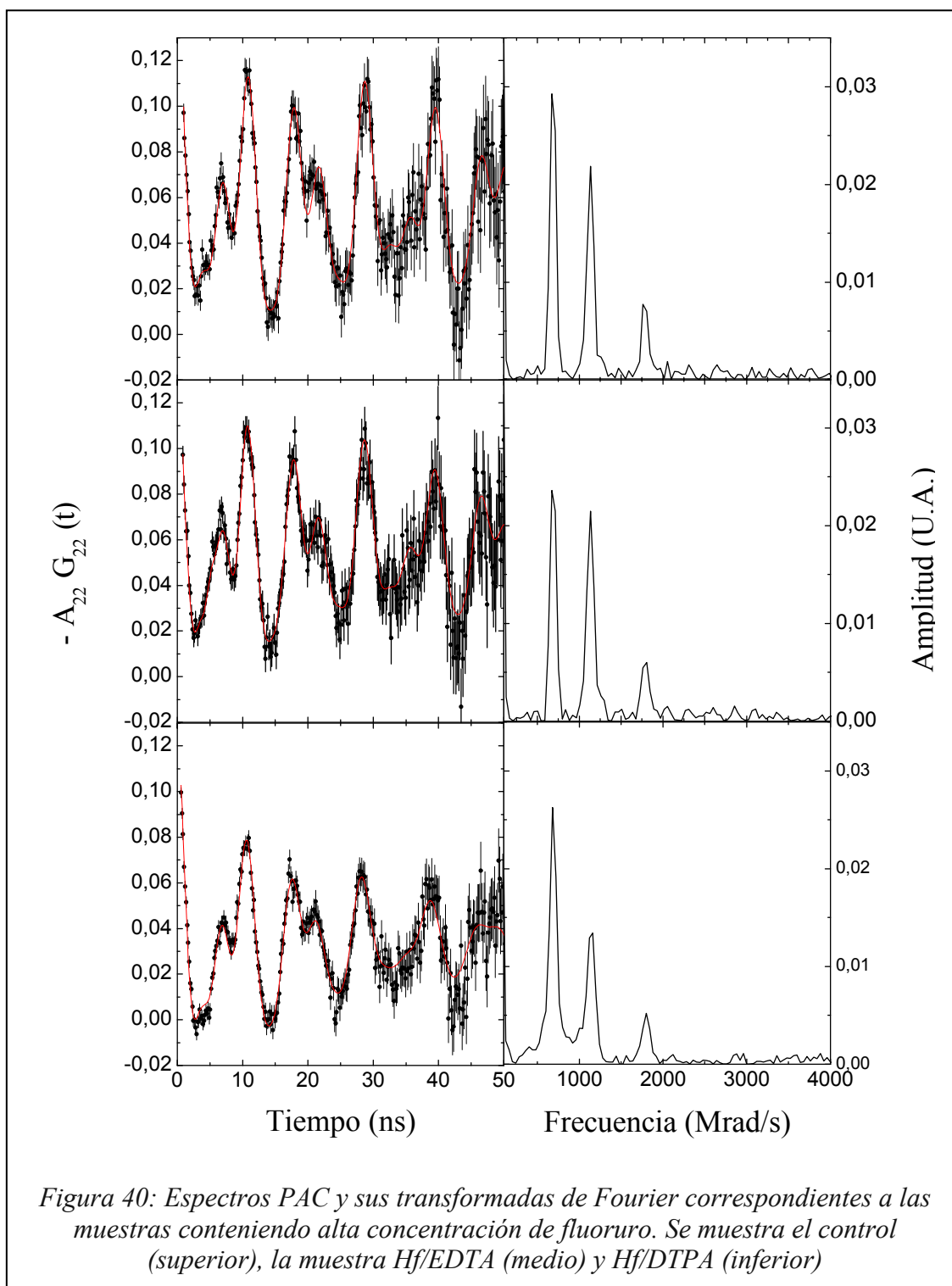


Figura 40: Espectros PAC y sus transformadas de Fourier correspondientes a las muestras conteniendo alta concentración de fluoruro. Se muestra el control (superior), la muestra Hf/EDTA (medio) y Hf/DTPA (inferior)

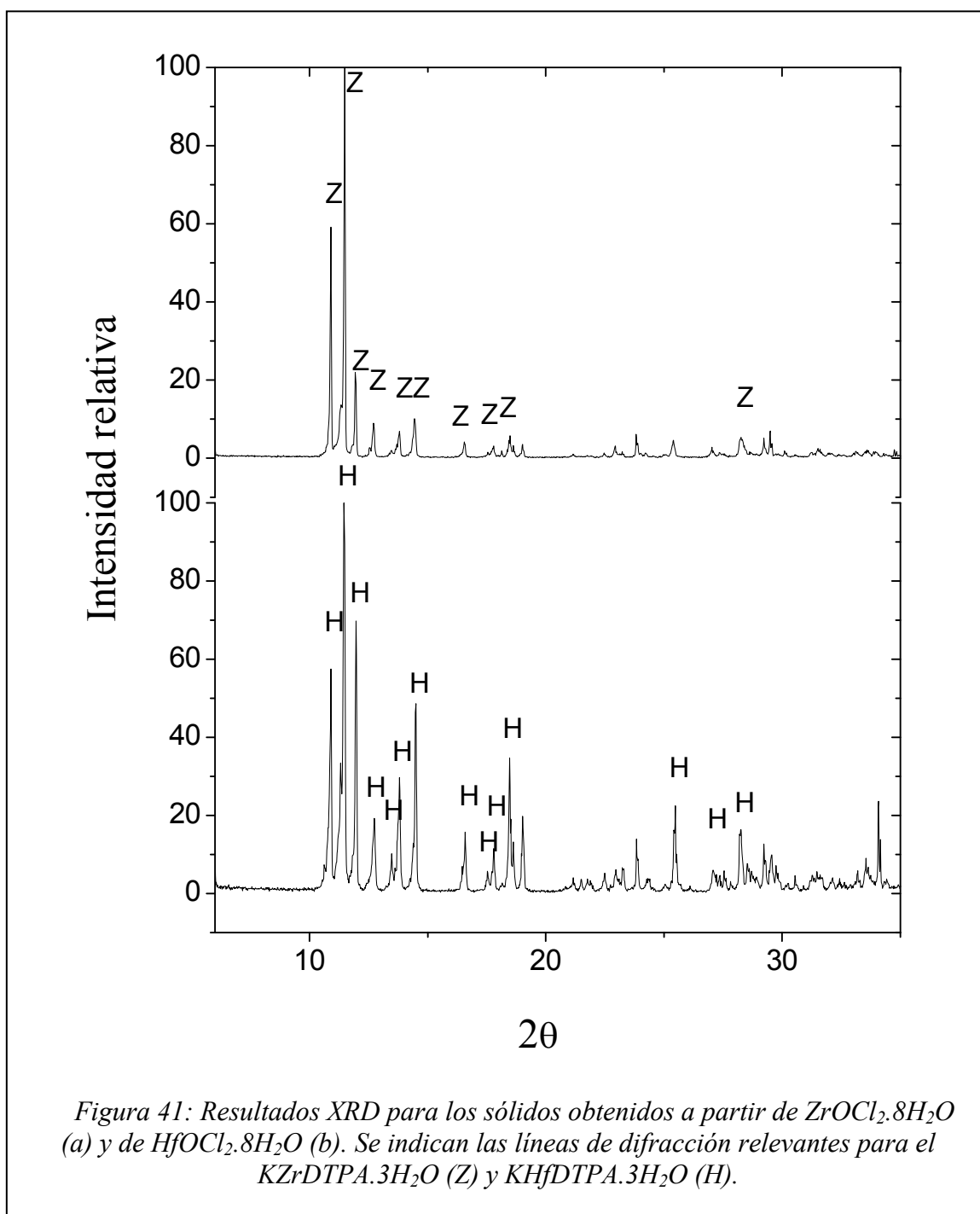
Por otra parte, la similitud de los valores de los parámetros hiperfinos reportados por Amaral *et al* [Ama 09] para el $^{181}\text{Hf}/\text{EDTA}$ con los obtenidos en el presente trabajo para la condición de “bajo fluoruro” indica que los mencionados autores se equivocan al suponer que el ^{181}Hf se encuentra complejado por EDTA y de allí la interpretación de los resultados PAC por ellos obtenidos resulta incorrecta.

4.2.2.2.2 Sólidos que resultan a partir de HfOCl_2 (o ZrOCl_2) y DTPA

En primer lugar se puso a punto la síntesis química de $\text{KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (y su análogo $\text{KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a partir de HfOCl_2 (o ZrOCl_2) siguiendo un procedimiento establecido en la literatura [Dav 92]. Los sólidos obtenidos fueron analizados en un difractómetro Phillips X'pert PW 3050 utilizando la radiación K_α del cobre, en el rango $6^\circ \leq 2\theta \leq 35^\circ$ con pasos de $0,05^\circ$ cada dos segundos. Los difractogramas obtenidos, que se muestran en la figura 41, verifican que la síntesis química resultó esencialmente en los compuestos $\text{KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $\text{KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (para $A=\text{Zr}$ y $A=\text{Hf}$, respectivamente). Las demás líneas que aparecen con una intensidad menor al 20 % corresponden a DTPA sin reaccionar.

Una vez establecido el éxito de la síntesis, se procedió a la síntesis radioquímica de $^{181}\text{Hf}-\text{KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $^{181}\text{Hf}-\text{KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, siguiendo el mismo procedimiento aunque incorporando cantidades traza de $^{181}\text{Hf}-\text{HfOCl}_2$. El oxiclورو de hafnio radiactivo se obtuvo por activación del ^{180}Hf presente en HfOCl_2 natural (98+%, Alfa Aesar GmbH & Co KG) por captura de neutrones térmicos en el reactor RA 3 de la Comisión Nacional de Energía Atómica-Argentina. Cantidades equimolares de $\text{AOCl}_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ($A= \text{Hf}$ o Zr) y ácido dietilentriaminopentaacético (0,03 moles de cada uno) fueron disueltos junto con $60 \mu\text{Ci}$ de $^{181}\text{Hf}-\text{HfOCl}_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml de agua

destilada con agitación y calentamiento. A la solución transparente así obtenida se agregó carbonato de potasio (47 mg para Zr y 67 mg para Hf) en pequeñas porciones con agitación. En este punto el pH de la solución pasó de 1 a 2 y la solución se tornó parcialmente turbia. El precipitado formado fue removido por filtración y la solución fue lentamente evaporada hasta 0,8 ml y se dejó reposar durante 24 horas para que los cristales incoloros cristalizaran lentamente



Los sólidos sintetizados $^{181}\text{Hf-KHfDTPA.3H}_2\text{O}$ y $^{181}\text{Hf-KZrDTPA.3H}_2\text{O}$ así como el reactivo de partida $^{181}\text{Hf-HfOCl}_2.8\text{H}_2\text{O}$ fueron medidos, a temperatura ambiente, por la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas. Los espectros PAC obtenidos y sus correspondientes transformadas de Fourier se muestran en la figura 42.

El espectro correspondiente al $^{181}\text{Hf-HfOCl}_2.8\text{H}_2\text{O}$ puede ser ajustado asumiendo la existencia de una interacción cuadrupolar principal:

$$^{181}\text{Hf-HfOCl}_2.8\text{H}_2\text{O}: \quad \omega_Q=113(0) \text{ Mrad/s} \quad \eta=0.54(1) \quad \delta=6(0) \%$$

datos que son consistentes con los reportados en la literatura (**Ler87**) para este compuesto.

Los espectros PAC de los dietilentriaminopentaacetatos son ajustados satisfactoriamente con una única interacción cuadrupolar

$$^{181}\text{Hf-KHfDTPA.3H}_2\text{O}: \quad \omega_Q=141(0) \text{ Mrad/s} \quad \eta=0.97(0) \quad \delta=1(0) \%$$

$$^{181}\text{Hf-KZrDTPA.3H}_2\text{O}: \quad \omega_Q=140(0) \text{ Mrad/s} \quad \eta=1(0) \quad \delta=1(0) \%$$

Estos resultados PAC son consistentes con la existencia de un único sitio para el Hf (o el Zr) en el cristal [**IIy 00**]. Un cálculo simple, asumiendo todos los iones como cargas puntuales y tomando en cuenta únicamente los vecinos más cercanos del hafnio (a distancias menores a 3,3 Å) resulta en una frecuencia cuadrupolar ω_Q de 137 Mrad/s y un parámetro de asimetría de 0.88 para el KHfDTPA.3H₂O, valores que se encuentran en buen acuerdo con los resultados experimentales. Las bajas distribuciones de frecuencias encontradas en ambos casos ($\delta < 1\%$) son evidencia de que las síntesis químicas resultaron en compuestos con mínima cantidad de defectos cristalinos.

Finalmente, el hecho de que en $^{181}\text{Hf-KHfDTPA.3H}_2\text{O}$ y $^{181}\text{Hf-KZrDTPA.3H}_2\text{O}$ todos los átomos de ^{181}Hf estén localizados en los sitios metálicos de los dietiléntriaminopentaacetatos constituye una evidencia de la ausencia de hafnio en los

compuestos responsables de los picos extra de los difractogramas de las muestras inactivas equivalentes.

Los resultados de la investigación previa de Das *et al* [Das 90], donde se intentó

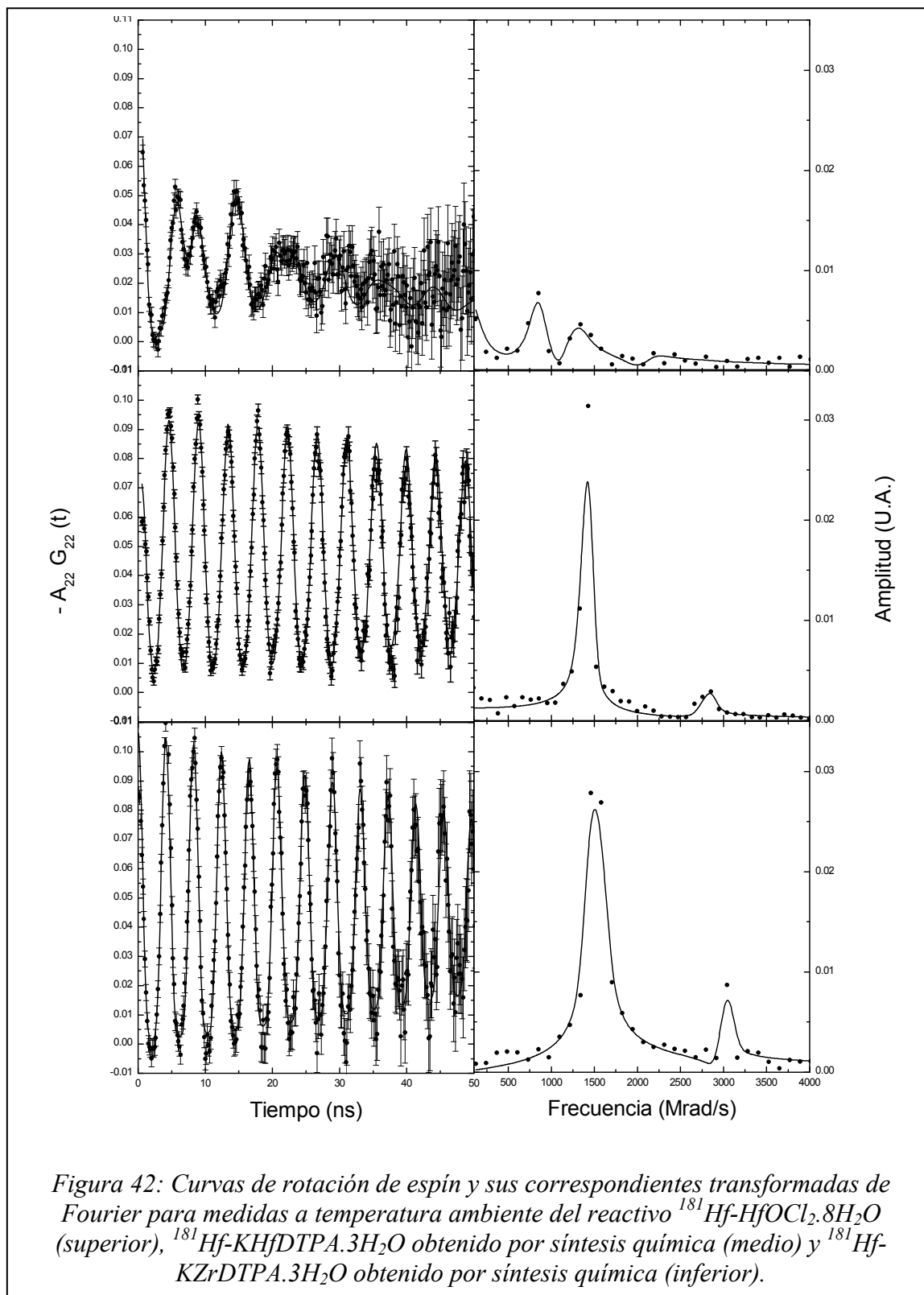


Figura 42: Curvas de rotación de espín y sus correspondientes transformadas de Fourier para medidas a temperatura ambiente del reactivo $^{181}\text{Hf-HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (superior), $^{181}\text{Hf-KHfDTPA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ obtenido por síntesis química (medio) y $^{181}\text{Hf-KZrDTPA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ obtenido por síntesis química (inferior).

caracterizar el HfDTPA mediante PAC, son muy diferentes a los encontrados en la presente investigación y tienen similitud con los correspondientes a $\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, lo cual es indicativo de que el procedimiento radioquímico utilizado en el mencionado trabajo no condujo a la quelación esperada.

Estudios PAC de ^{181}Hf -KHfDTPA.3H₂O en función de la temperatura

En primer lugar se realizaron medidas PAC a bajas temperaturas del compuesto ^{181}Hf -KHfDTPA.3H₂O. Con dicho objetivo la muestra se colocó en un criógeno en el centro de los detectores y se realizaron sucesivamente medidas PAC a 250 K, 200 K, 150 K, 100 K, 50 K, 8 K, 225 K, 275 K y 300 K. Los espectros PAC así obtenidos y sus transformadas de Fourier se presentan en la figura 43. Los datos experimentales fueron satisfactoriamente ajustados suponiendo la existencia de una única interacción cuadrupolar en la muestra cuyos parámetros hiperfinos se muestran en la figura 44.

Los resultados pueden interpretarse en términos de la existencia de una única interacción bien definida ($\delta = 1\%$) y muy asimétrica caracterizada por una frecuencia cuadrupolar de 140(2) Mrad/s, que es esencialmente independiente de los cambios térmicos para temperaturas menores a 300 K. Esta interacción se asocia con KHfDTPA.3H₂O.

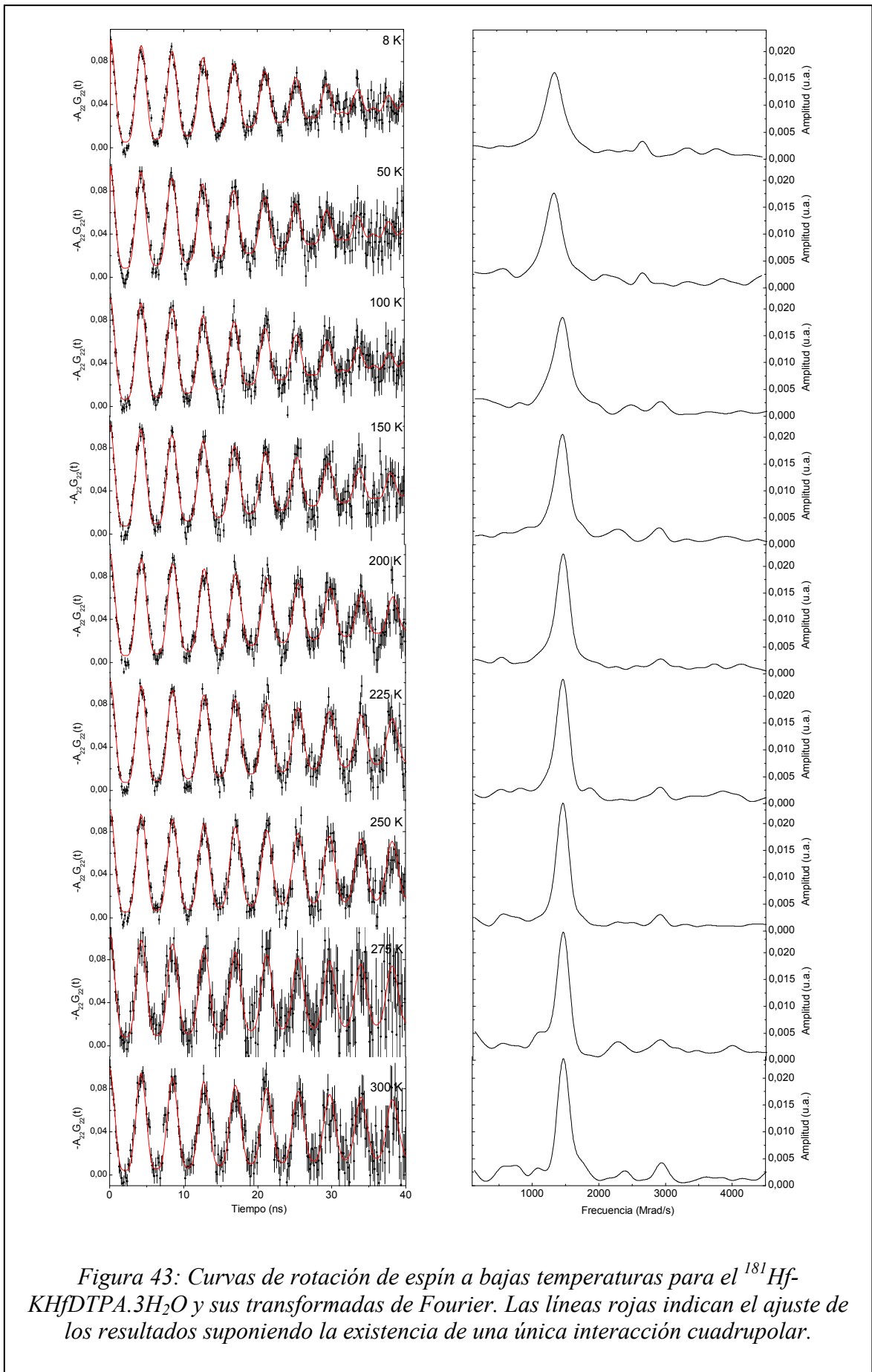
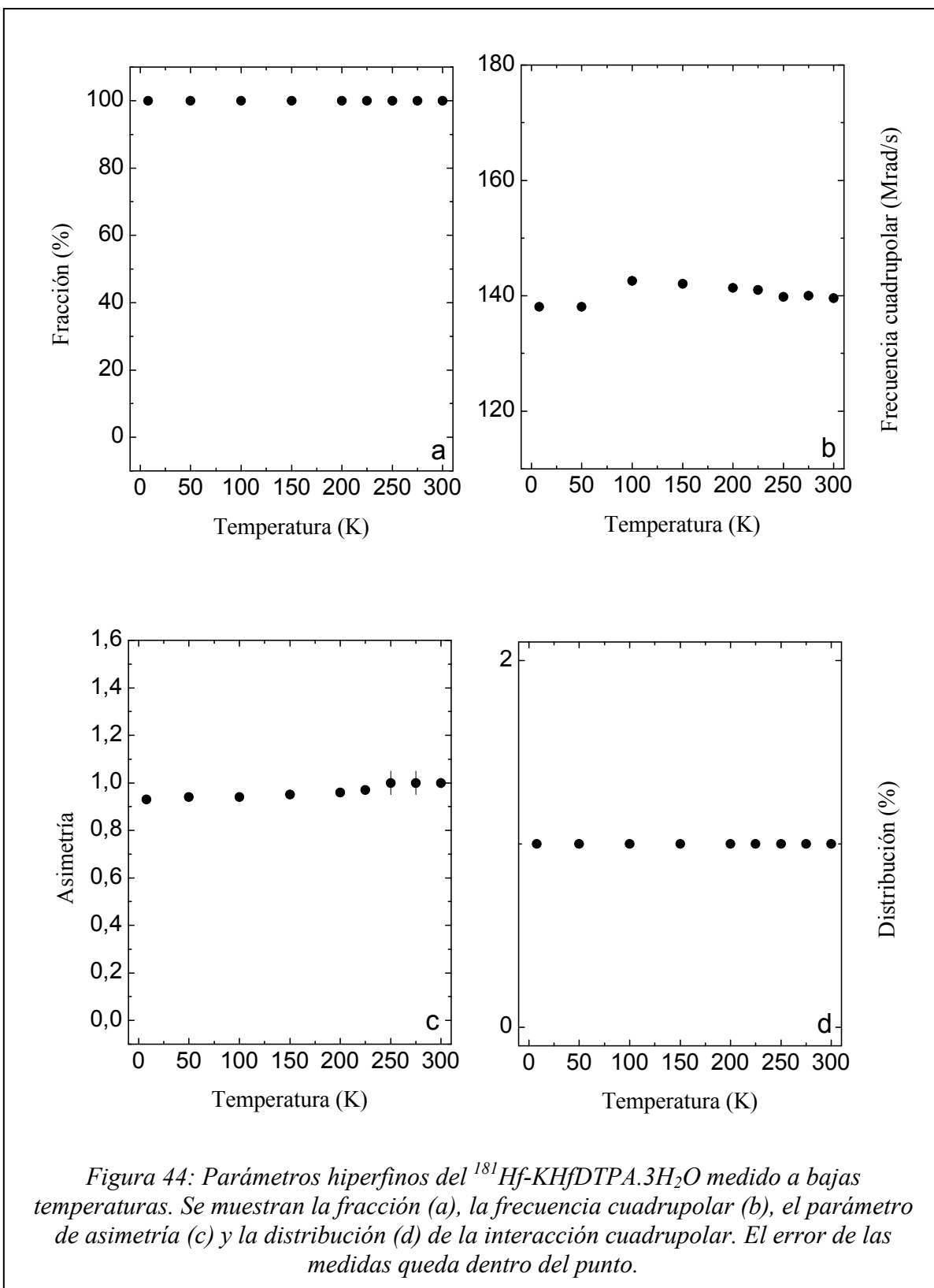


Figura 43: Curvas de rotación de espín a bajas temperaturas para el $^{181}\text{Hf-KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y sus transformadas de Fourier. Las líneas rojas indican el ajuste de los resultados suponiendo la existencia de una única interacción cuadrupolar.



Con el objetivo de establecer las temperaturas donde algún tipo de cambio en los dietilentriaminopentaacetatos puede ser esperado se realizaron experimentos de análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). La termogravimetría mide de forma dinámica el cambio de masa de la muestra en función de la temperatura. La calorimetría diferencial de barrido es una técnica termoanalítica que permite evaluar cambios en el calor latente de una muestra. La medida se realiza por diferencia del flujo de calor entre una muestra y una referencia como una función de la temperatura (en general el aumento de temperatura es lineal con el tiempo). El principio básico subyacente a esta técnica es que cuando la muestra experimenta una transformación física (tal como una transición de fase), se necesitará que fluya más (o menos) calor a la muestra que a una sustancia de referencia, para mantener ambas a la misma temperatura. La sustancia utilizada como referencia debe tener una capacidad

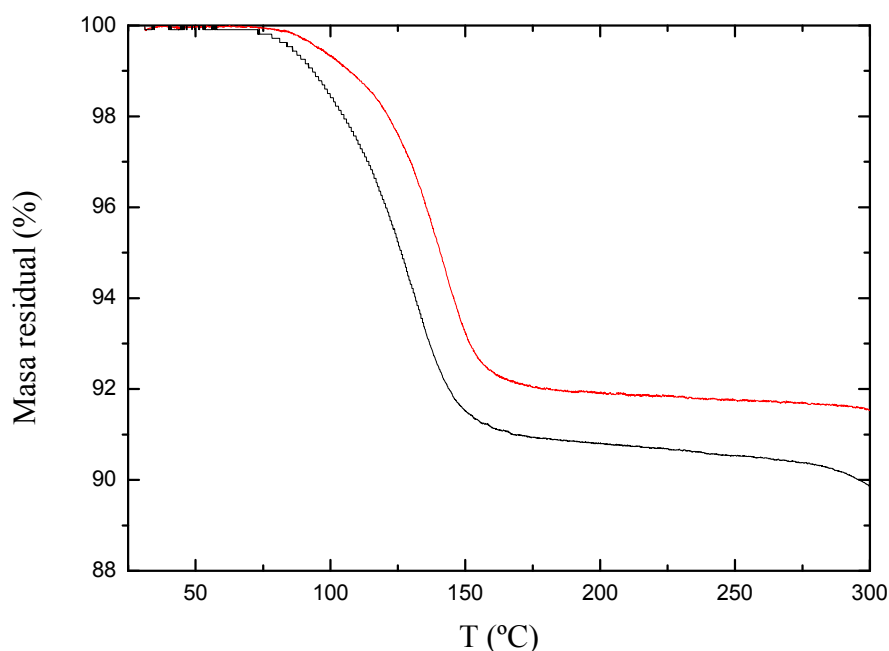
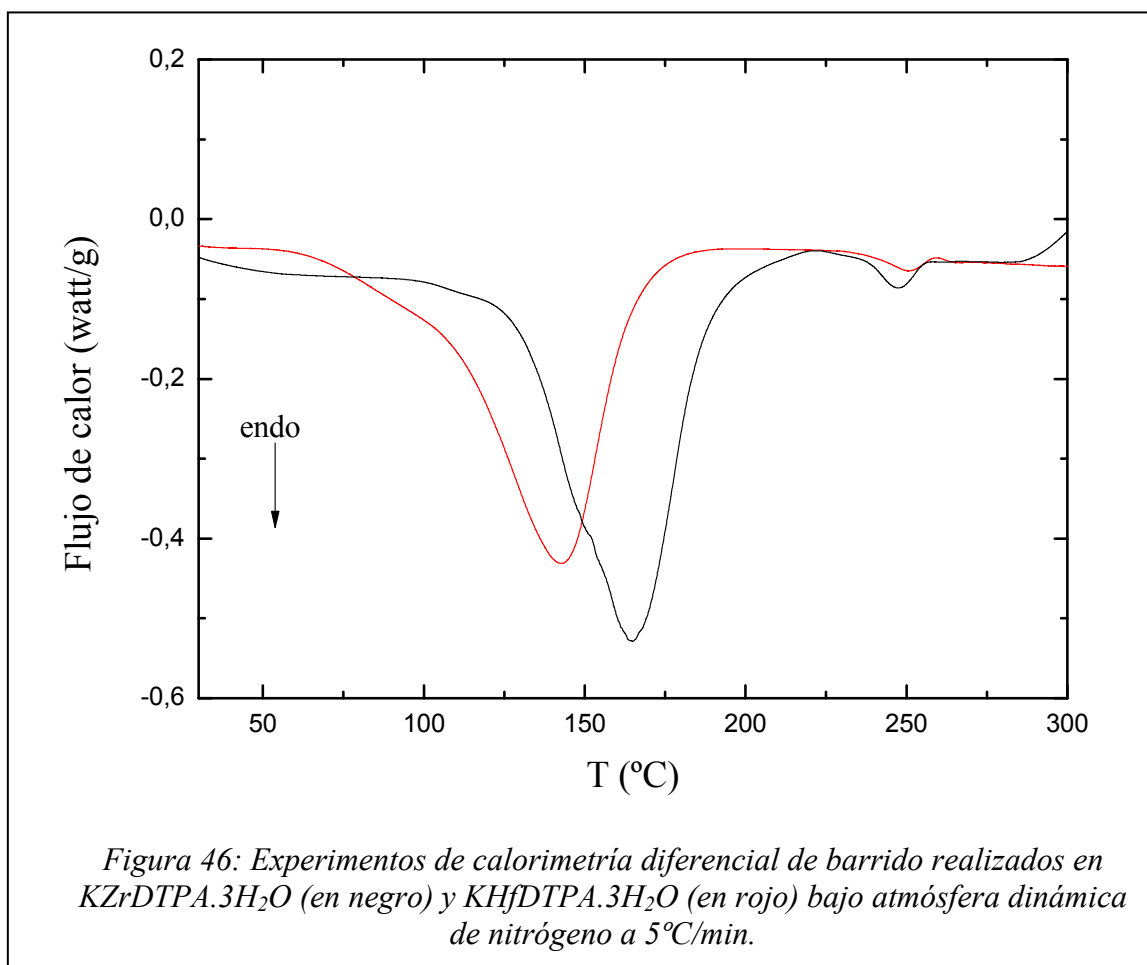


Figura 45: Curvas termogravimétricas para el $\text{KHfDTPA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (en rojo) y $\text{KZrDTPA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (en negro)

calorífica bien definida (idealmente constante) en el intervalo de temperaturas en que vaya a tener lugar el barrido, de forma que cualquier cambio observado se deba a la muestra. Finalmente, la diferencia de flujo de calor que ocurre a una cierta temperatura puede asociarse con cambios estructurales o transiciones de fase, entre otros fenómenos. Los experimentos presentados en esta tesis fueron llevados a cabo en equipos Shimadzu (DSC-50 y TGA-50H respectivamente) bajo una atmósfera dinámica de nitrógeno utilizando una velocidad de calentamiento de 5 °C/min, utilizando como referencia Al_2O_3 . en el rango térmico desde temperatura ambiente hasta 300 °C

En primer lugar se estudiaron los dietiléntriaminopentaacetatos hidratados de hafnio y zirconio mediante análisis termogravimétrico. Los resultados obtenidos para $\text{KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $\text{KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se muestran juntos en la figura 45 como curvas



negra y roja respectivamente. Las curvas termogravimétricas muestran en ambos casos una pérdida de masa que se hace evidente entre 85 °C y 160 °C. Un cálculo simple de la masa residual luego de dicha disminución coincide con la pérdida de 2,95 moles de H₂O por mol de KXDTPA.3H₂O (X= Hf, Zr), hallazgo consistente con la deshidratación de KXDTPA.3H₂O para producir KXDTPA (X= Hf, Zr).

Un análisis más detallado de la evolución térmica de KZrDTPA.3H₂O y KHfDTPA.3H₂O se realizó mediante experimentos de calorimetría diferencial de barrido, cuyos resultados se muestran en la figura 46. La curva DSC muestra en ambos compuestos la existencia de dos cambios endotérmicos caracterizados por temperaturas que se presentan en la tabla 4. Puede observarse que el segundo cambio ocurre esencialmente a la misma temperatura (alrededor de 248°C) independientemente si se trata del compuesto con hafnio o con zirconio, mientras que el otro se encuentra corrido hacia mayores temperaturas en el caso del Zr.

KHfDTPA.3H ₂ O	KZrDTPA.3H ₂ O
142 °C (endo)	164 °C (endo)
250 °C (endo)	246 °C (endo)

Tabla 4: Temperaturas características y naturaleza de los picos encontrados por calorimetría diferencial de barrido para KHfDTPA.3H₂O y KZrDTPA.3H₂O en el rango térmico desde temperatura ambiente hasta 300°C.

El primer pico coincide en ambos casos con el rango térmico donde se observaba la pérdida de masa en los análisis termogravimétricos y puede ser asociado, en base a dichos resultados, con la deshidratación de los compuestos para dar KXDTPA (X= Hf o Zr). La diferencia en las temperaturas características de la deshidratación puede asociarse con pequeñas variaciones estructurales en KHfDTPA.3H₂O y KZrDTPA.3H₂O debidas principalmente al tamaño del catión. El segundo pico puede

atribuirse a la fusión de DTPA (punto de fusión= 220°C), hallazgo que coincide con las trazas de DTPA sin reaccionar evidentes en los análisis de DRX de las muestras.

Una vez establecidas las temperaturas donde pueden esperarse cambios en los dietiléntri Aminopentaacetatos se procedió a realizar las medidas PAC de $^{181}\text{Hf-KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a alta temperatura.

El $^{181}\text{Hf-KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ fue sometido a tratamientos térmicos dentro de un horno de grafito y medido *in situ* por la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas. Los parámetros de los calentamientos secuenciales, indicando tiempo y temperatura, se muestran en la tabla 5.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
1	77	18
2	127	6
3	177	6
4	227	6
5	277	6
6	127	6
7	177	6
8	227	6
9	127	6

Tabla 5: Secuencia de calentamiento del $^{181}\text{Hf-KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Los espectros PAC resultantes junto con sus transformadas de Fourier se presentan en la figura 47 donde se incluyen, a fines comparativos, los espectros a temperatura ambiente de la muestra no calentada y luego de los tratamientos térmicos en el horno (espectro superior e inferior respectivamente). Todos los espectros, excepto el correspondiente a 127 °C, pueden ser ajustados satisfactoriamente suponiendo la existencia de una única interacción cuadrupolar. En la Figura 48 se presentan los parámetros hiperfinos de la muestra a temperatura ambiente y aquellos obtenidos de las medidas a distintas temperaturas.

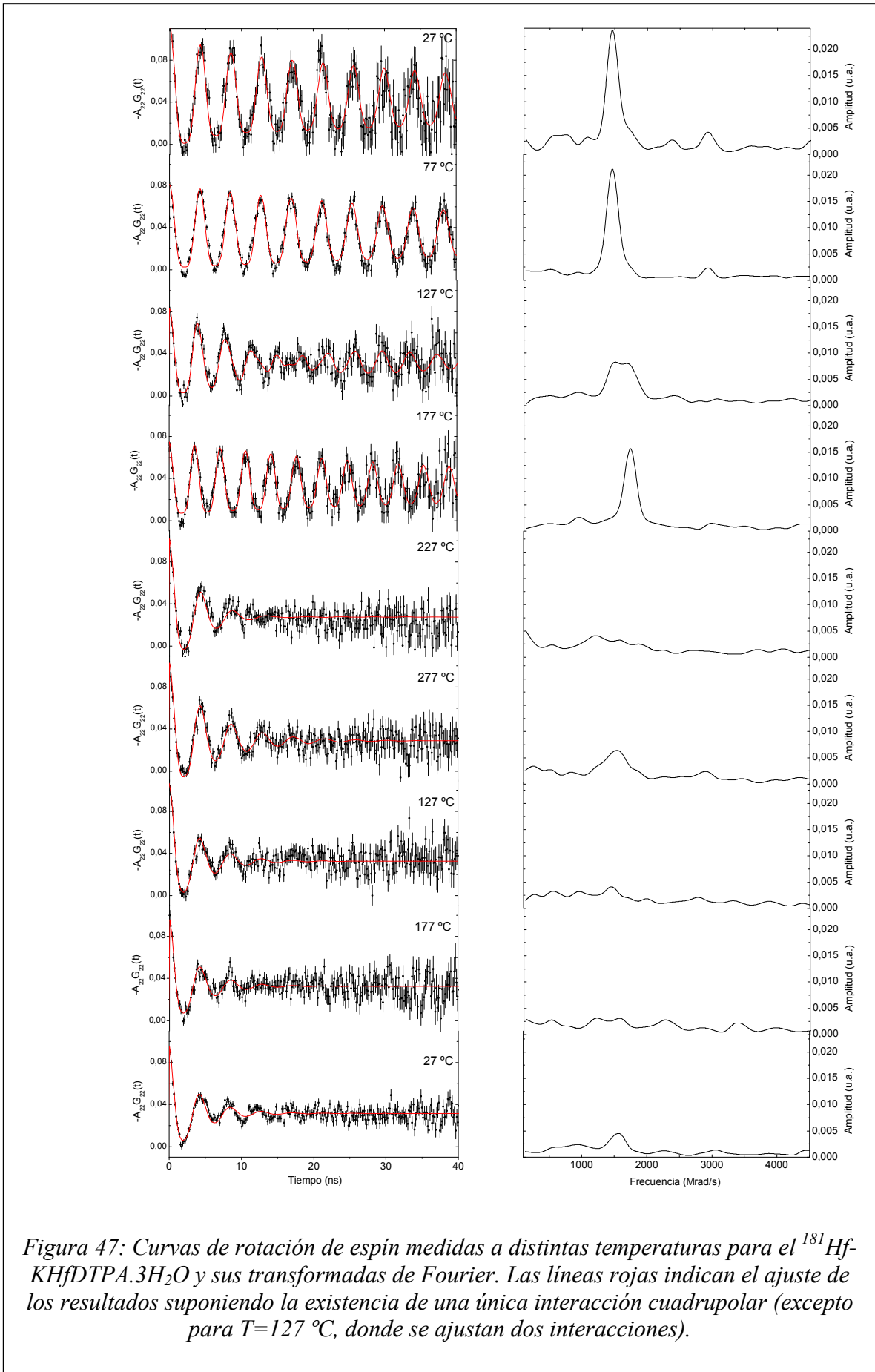
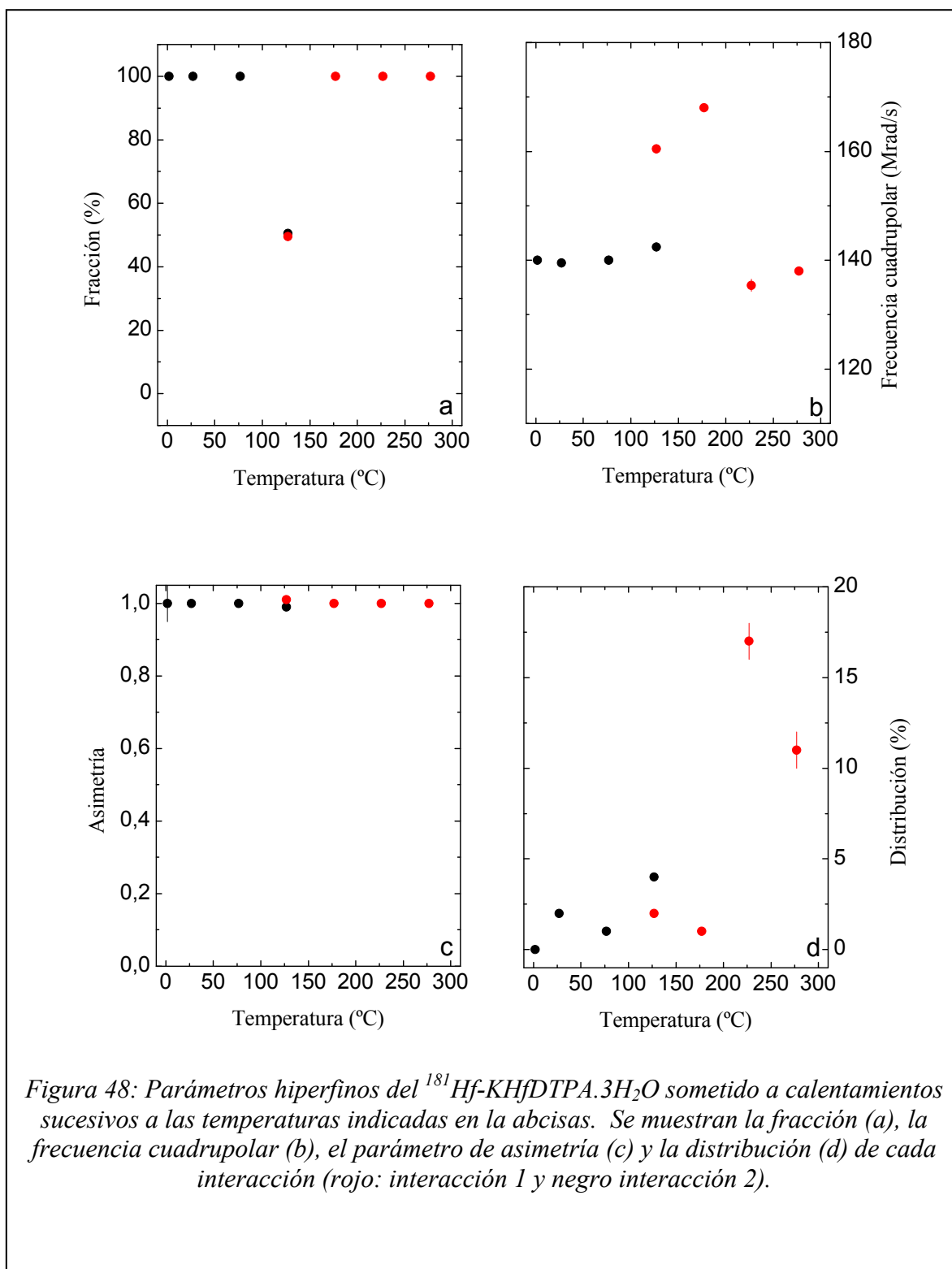


Figura 47: Curvas de rotación de espín medidas a distintas temperaturas para el ^{181}Hf -KHfDTPA.3H₂O y sus transformadas de Fourier. Las líneas rojas indican el ajuste de los resultados suponiendo la existencia de una única interacción cuadrupolar (excepto para $T=127\text{ °C}$, donde se ajustan dos interacciones).



Con el objetivo de facilitar la discusión de los resultados, en la tabla 6 se detallan los parámetros hiperfinos obtenidos para la muestra no calentada medida a temperatura ambiente junto con aquellos correspondientes a los tratamientos a 77 °C (18 hs), 127 °C (6 hs) y 177 °C (6 hs).

Condiciones de medida	Fracción (%)	Frecuencia cuadrupolar (Mrad/s)	Parámetro de asimetría	Distribución (%)
27°C	100(0)	140(0)	1(0)	2(0)
77°C, 18 horas	100(0)	140(0)	1(0)	1(0)
127 °C, 6 horas	50(0)	142(0)	1(0)	4(0)
	50(0)	160(0)	1(0)	2(0)
177 °C, 6 horas	100(0)	168(0)	1(0)	1(0)

Tabla 6: Parámetros hiperfinos del ¹⁸¹Hf-KHfDTPA.3H₂O en distintas condiciones de medida (indicadas en la primera columna).

Los espectros PAC del ¹⁸¹Hf-KHfDTPA.3H₂O medidos a 27 °C y a 77 °C están caracterizados por una interacción muy definida y asimétrica con frecuencia cuadrupolar ω_Q de 141(0) Mrad/s mientras que una frecuencia cuadrupolar más alta, ω_Q de 168(0) Mrad/s, también muy definida y totalmente asimétrica caracteriza al compuesto a 177 °C. Sin embargo, a 127 °C se encuentra una situación intermedia donde aparecen fracciones iguales de dos interacciones hiperfinas, una de ellas con frecuencia cuadrupolar $\omega_Q = 142(0)$ Mrad/s y la otra con 160(0) Mrad/s (puntos negros y rojos en la figura 48 respectivamente), ambas bastante definidas ($\delta < 4\%$) y totalmente asimétricas.

Según los resultados de los análisis termogravimétricos no ocurre una deshidratación significativa del compuesto antes de los 80 °C, de allí que la interacción cuadrupolar que caracteriza a la muestra cuando es medida a 77 °C puede ser atribuida al KHfDTPA.3H₂O. Por otro lado, la pérdida de las tres moléculas de agua lograda alrededor de los 180 °C que se corresponde con el espectro PAC a 177 °C nos permite

asociar la interacción cuadrupolar totalmente asimétrica de frecuencia cuadrupolar 168 Mrad/ con el compuesto anhidro KHfDTPA:

$$^{181}\text{Hf- KHfDTPA anhidro: } \omega_Q=167(0) \text{ Mrad/s} \quad \eta=1,00(0) \quad \delta=1(0) \%$$

La naturaleza de esta interacción hiperfina puede ser explicada en términos de la contracción que sufre la esfera de coordinación del hafnio (sin pérdida de asimetría) cuando las moléculas de agua se pierden.

Por otro lado, la deshidratación parcial lograda a 127 °C, evidente a partir del termograma, está en buen acuerdo con la existencia a dicha temperatura de una mezcla de interacciones cuadrupolares correspondientes al dietilentriaminopentaacetato de hafnio hidratado y anhidro.

El calentamiento de la muestra a temperaturas mayores a 200 °C resulta en el reemplazo de las interacción bien definida del KHfDTPA anhidro por una muy poco definida (δ entre 10 y 15 %) de frecuencia cuadrupolar alrededor de $\omega_Q=140$ Mrad/s. A esa temperatura, que es coincidente con la fusión del DTPA y que puede significar un ablandamiento del KHfDTPA, puede ocurrir un reordenamiento de las moléculas hacia una configuración más estable. La presencia de un efecto dinámico asociado con dicha reorganización no puede ser excluida.

Cuando se disminuye la temperatura de medida a temperatura ambiente la frecuencia cuadrupolar permanece en el valor correspondiente a la medida a 277 °C pero la distribución se hace notablemente mayor indicando la presencia de defectos en la estructura cristalina del compuesto. Este hecho puede asociarse con que, durante la medida a esta temperatura, ocurre una hidratación parcial de la muestra.

Estudios PAC de hidratación de $^{181}\text{Hf-KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Con el objetivo de lograr su deshidratación, el $^{181}\text{Hf-KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se sometió a un tratamiento térmico que osciló entre 130 °C y 160 °C durante 1 hora luego del cual se observó un leve oscurecimiento del sólido. La muestra así secada fue colocada en un tubo eppendorf cuya tapa fue agujereada para permitir la hidratación a humedad ambiente de la muestra durante la medida PAC. Los espectros PAC resultantes luego de 24 horas de hidratación a temperatura ambiente, son mostrados en la figura 49.

Los resultados fueron ajustados suponiendo la existencia de una única interacción cuadrupolar en todos los casos, con excepción de la medida tomada luego de 6 horas, donde se necesitaron dos interacciones cuadrupolares para lograr un ajuste satisfactorio. Los parámetros hiperfinos resultantes son presentados en gráficos en la figura 50. Los resultados pueden interpretarse en términos de la existencia de dos entornos muy definidos cuya intensidad en el espectro PAC es dependiente del tiempo que la muestra se ha sometido a hidratación. Así, en los tiempos cortos de hidratación se encuentra una interacción cuadrupolar totalmente asimétrica que en promedio puede ser caracterizada por 169 (1) Mrad/s con una distribución 3,5 (1) %. Esta interacción es única hasta las 3 horas de hidratación, disminuye al 27 % a las 6 horas de hidratación y desaparece totalmente luego de una hidratación de 9 horas. Una segunda interacción totalmente asimétrica de frecuencia cuadrupolar 144 (1) Mrad/s aparece con un 73 % de intensidad luego de 6 horas de hidratación y se hace única a partir de la novena hora.

Aunque la frecuencia cuadrupolar se mantiene prácticamente constante con el tiempo de hidratación tendiendo al valor 141 (0) Mrad/s, la interacción se hace más definida a medida que el tiempo transcurre, la distribución de la frecuencia disminuye del 7 al 2 %, este hecho puede asociarse a la paulatina incorporación de moléculas de

agua para llegar al estado trihidratado. La primera interacción puede asociarse con un estado anhidro KZrDTPA que se va hidratando a medida que transcurre el tiempo para finalmente producir $\text{KZrDTPA} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ algo distorsionado. La segunda interacción se

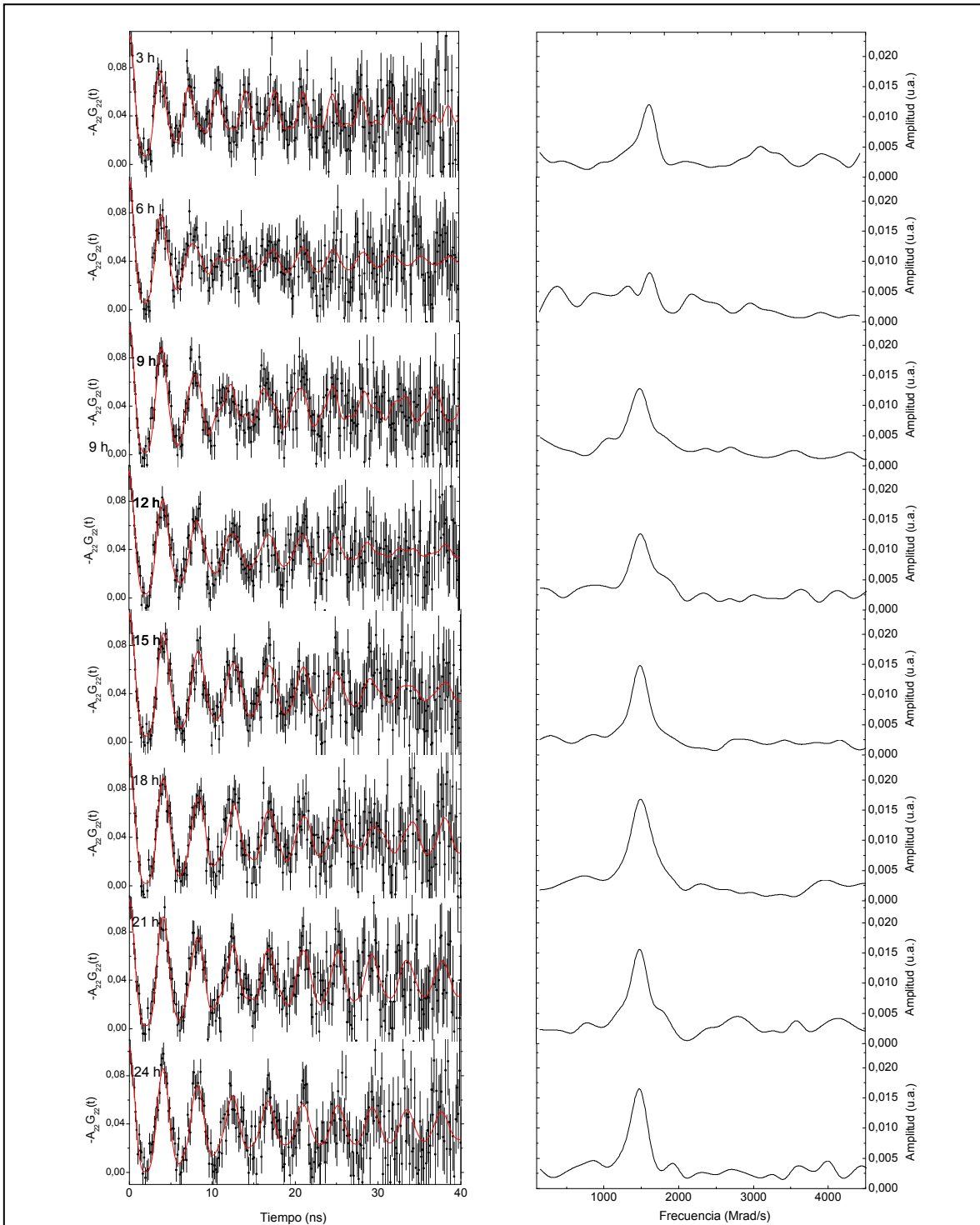
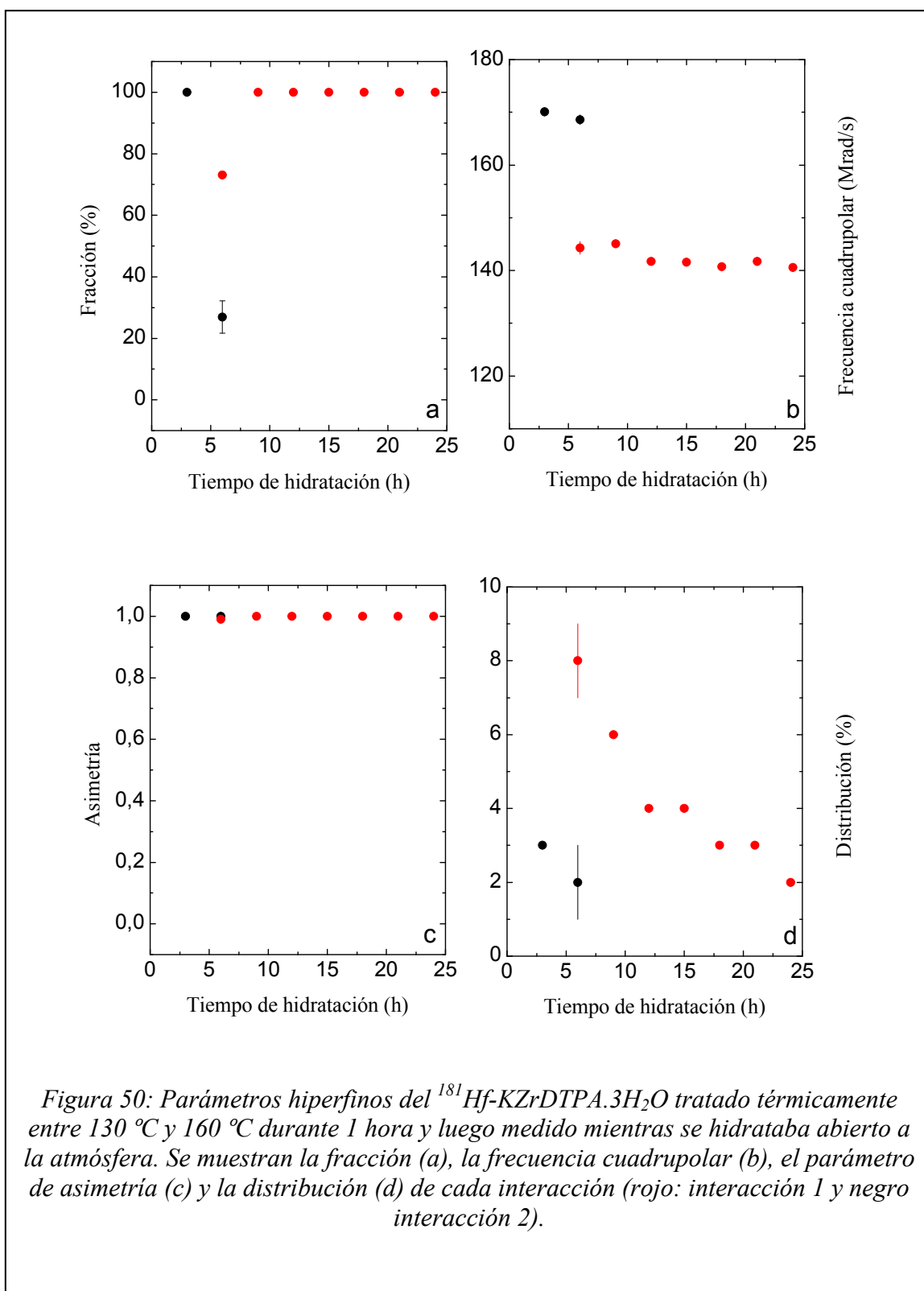


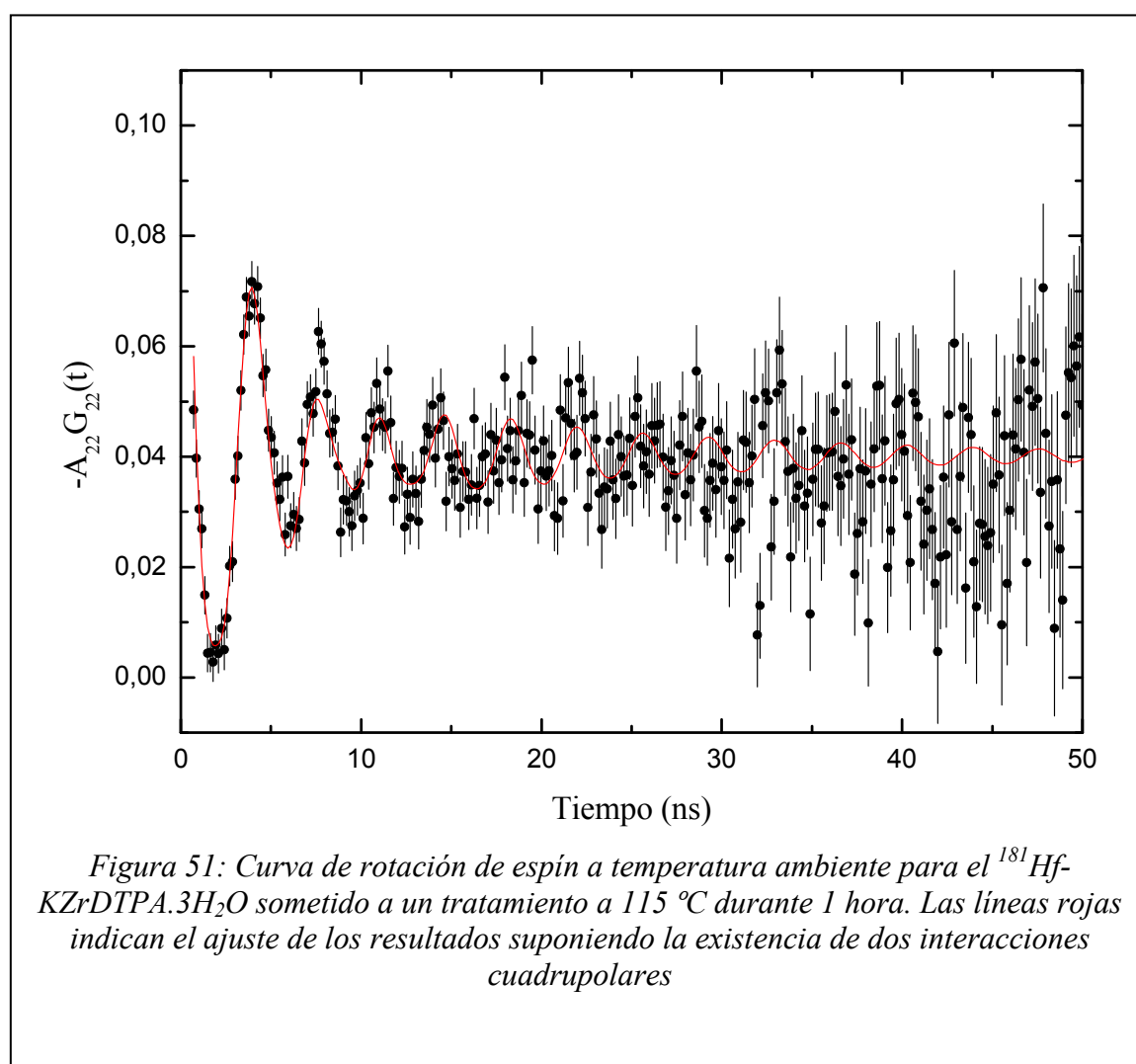
Figura 49: Curvas de rotación de espín a temperatura ambiente para el ^{181}Hf -KZrDTPA.3H₂O secado durante 1 hora entre 130 °C y 160 °C medido abierto a la atmósfera. Las líneas rojas indican el ajuste de los resultados suponiendo la existencia de una interacción cuadrupolar (excepto para la medida luego de 6 hs de hidratación, que se ajustó con dos interacciones).

asocia con el $\text{KZrDTPA}\cdot x\text{H}_2\text{O}$ distorsionado que a medida que transcurre la hidratación llega al estado $\text{KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ bien definido.



En vistas de la rápida cinética de hidratación del KZrDTPA se procedió a realizar un segundo estudio de la hidratación, esta vez más lentamente. Con ese fin, el $^{181}\text{Hf-KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ que resultó del tratamiento anterior se sometió a un nuevo tratamiento de deshidratación calentándolo alrededor de $115\text{ }^\circ\text{C}$ (entre $108\text{ }^\circ\text{C}$ y $122\text{ }^\circ\text{C}$) durante 1 hora. Finalizado el tratamiento se observó que el sólido tenía color marrón claro.

La muestra fue trasvasada a un tubo eppendorf de $0,5\text{ ml}$ que se tapó herméticamente para medir en el espectrómetro PAC a temperatura ambiente. El espectro PAC resultante se muestra en la figura 51. Los resultados experimentales aquí obtenidos son bien ajustados suponiendo la existencia de dos interacciones cuadrupolares:



Interacción 1: $f_1=70$ (%) $\omega_{Q1}=141$ (Mrad/s) $\eta_1=0,89$ $\delta_1=14$ (%)

Interacción 2: $f_2=30$ (%) $\omega_{Q2}=162$ (Mrad/s) $\eta_2=1$ $\delta_2=4$ (%)

Sobre las bases de los parámetros hiperfinos ajustados y los modelos propuestos en el punto anterior, se concluye que este tratamiento térmico resultó en una fracción mayoritaria de $KZrDTPA \cdot xH_2O$ junto con $KZrDTPA$ anhidro. De esta manera, el calentamiento realizado no logró la deshidratación total del compuesto como en el caso previo, como era de esperar por la menor temperatura aquí utilizada.

Continuando la investigación, se realizaron estudios PAC de la muestra sometida a períodos de hidratación cortos. Se procedió de la siguiente manera: la muestra se dejaba “abierta a la atmósfera” (con la tapa del eppendorf agujereada) por una hora, luego de la cual la tapa se reemplazaba por una tapa hermética y se medía por PAC, cerrada, durante dos días. Los espectros PAC resultantes luego de 9 hidrataciones sucesivas obtenidos a temperatura ambiente, son mostrados en figura 52. Los resultados fueron ajustados suponiendo la existencia de una interacción cuadrupolar, excepto en la medida luego de 1 hora de hidratación, para la cual fue necesario considerar la existencia de dos interacciones. Los parámetros hiperfinos resultantes son presentados en gráficos en la figura 53. Puede observarse que la frecuencia asociada al anhidro $KZrDTPA$ (puntos rojos en la figura 53) desaparece luego de la primera hora de hidratación en beneficio del compuesto parcialmente hidratado $KZrDTPA \cdot xH_2O$ (puntos negros). La alta distribución indica un apartamiento de la hidratación total.

La diferencia entre los tratamientos de hidratación lento y rápido se puede asociar, en principio, con el tiempo de permanencia en un dado estado de hidratación, el cual vuelve al compuesto $KZrDTPA \cdot xH_2O$ más estable frente a hidrataciones sucesivas.

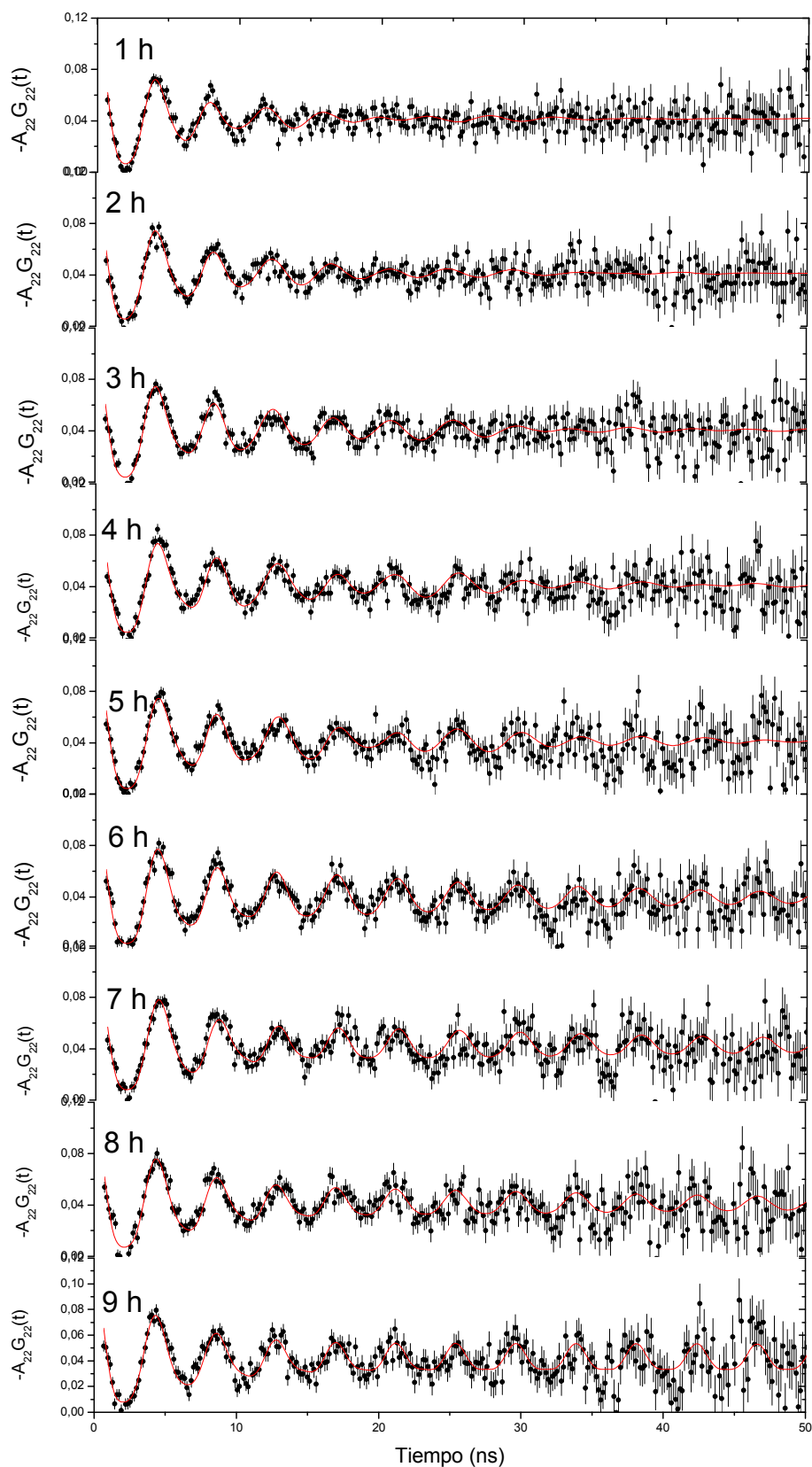
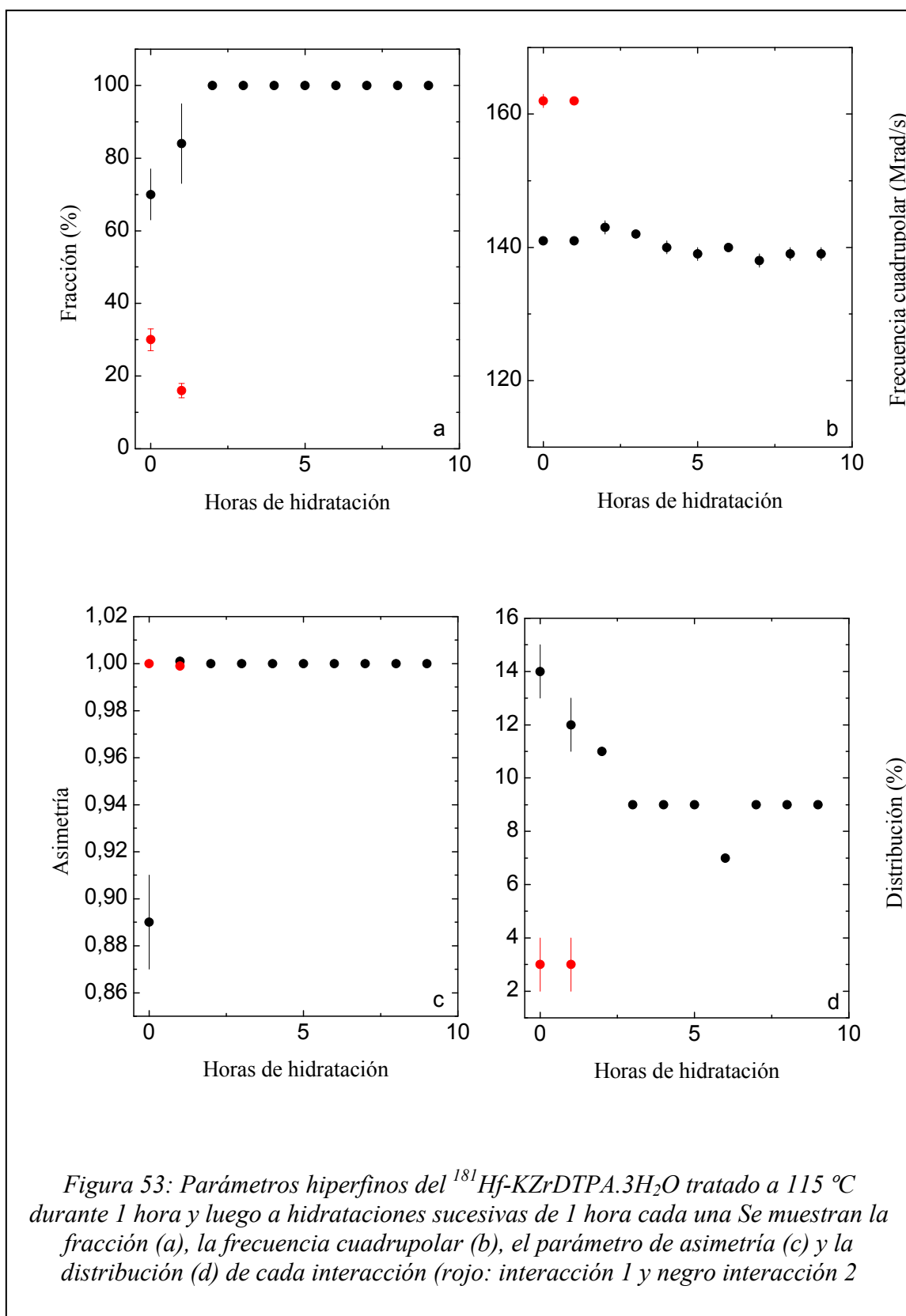


Figura 52: Curvas de rotación de espín a temperatura ambiente para el ^{181}Hf - $\text{KZrDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sometido a un tratamiento a $115\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora y luego a hidrataciones sucesivas de 1 hora cada una. Las líneas rojas indican el ajuste de los resultados suponiendo la existencia de una interacción cuadrupolar (excepto en el primer espectro, en el cual son necesarias dos interacciones).



4.3 Experimentos Mössbauer en clusters de Fe-S

4.3.1 Estado del arte

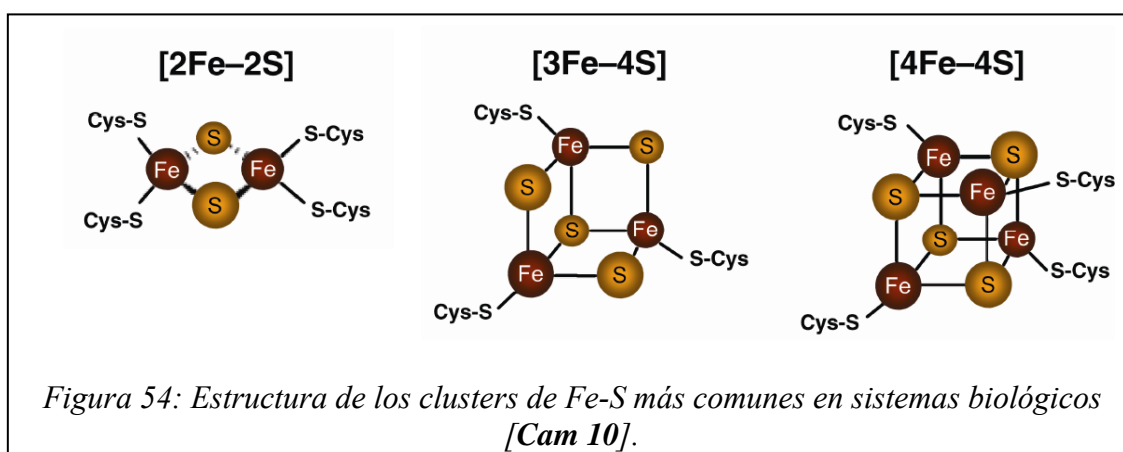
Las proteínas son macromoléculas que surgen de la unión sucesiva de monómeros llamados aminoácidos de fórmula química $\text{NH}_2\text{-CRH-COOH}$ donde R= H o a un grupo orgánico, dependiendo del aminoácido particular. Se describen distintos grados de organización para las proteínas. A la estructura primaria (secuencia lineal de aminoácidos) le sigue el ordenamiento en hojas plegadas o hélices alfa (estructura secundaria) que se disponen a su vez en estructuras tridimensionales características de la estructura terciaria. En el caso de proteínas constituidas por más de una cadena de aminoácidos, se habla de estructura cuaternaria.

La estructura de una proteína determina su función, que depende del tipo particular de proteína que se considere: la hemoglobina transporta oxígeno, los anticuerpos tienen funciones defensivas y el colágeno función estructural. Algunas proteínas llamadas “conjugadas” requieren, para ser funcionales, de la presencia de una parte no aminoacídica además de la secuencia de aminoácidos. Dicha parte se llama “grupo prostético” cuando su unión con la cadena de aminoácidos es covalente. Un ejemplo bien conocido de proteína conjugada es la hemoglobina que está constituida por cadenas de globina (partes aminoacídicas) unidas covalentemente a grupos hemo (grupos prostéticos).

Los clusters de Fe-S son agrupaciones de átomos de hierro y azufre que conforman los grupos prostéticos de las llamadas “proteínas de Fe-S”. Se trata de uno de los más ubicuos y versátiles grupos prostéticos, abundantes en todas las formas de vida. Estas proteínas participan en una amplia gama de procesos que incluyen catálisis

enzimática, regulación y mantenimiento de la estructura proteica, aunque su principal función es la transferencia electrónica. La estructura de los clusters de Fe-S que se encuentran más frecuentemente en sistemas biológicos se ilustra en la figura 54.

En la mayoría de los clusters de Fe-S, el hierro se encuentra coordinado por cuatro átomos de azufre en un entorno cuasi- tetraédrico. El azufre presente en estos sistemas es de dos tipos: por un lado, el llamado “azufre inorgánico” que genera SH₂ por tratamiento de la proteína con ácidos inorgánicos diluidos y por otro, el denominado “azufre orgánico”, que proviene en general del aminoácido cisteína (aunque en algunos casos de la histidina, aspártico, serina u otros residuos) [Bar]. Los clusters más comunes son del tipo [2Fe-2S], [3Fe-4S] y [4Fe-4S].



Los clusters pueden experimentar reacciones de oxidación- reducción en un amplio intervalo de potenciales redox [Bar] pudiendo existir sitios con valencia localizada Fe⁺² o Fe⁺³ y pares Fe^{+2,5}- Fe^{+2,5} donde un electrón se deslocaliza entre ambos sitios. En la figura 55 se presentan los estados de oxidación descritos para los clusters de hierro- azufre más frecuentes [Cam 10].

Los parámetros Mössbauer de los clusters de Fe-S son claramente distintos de aquellos de otras moléculas biológicas con centros de hierro. En particular los corrimientos isoméricos son característicamente pequeños debido a que los enlaces Fe-S son cortos y de naturaleza covalente como consecuencia de la coordinación cuatro y la

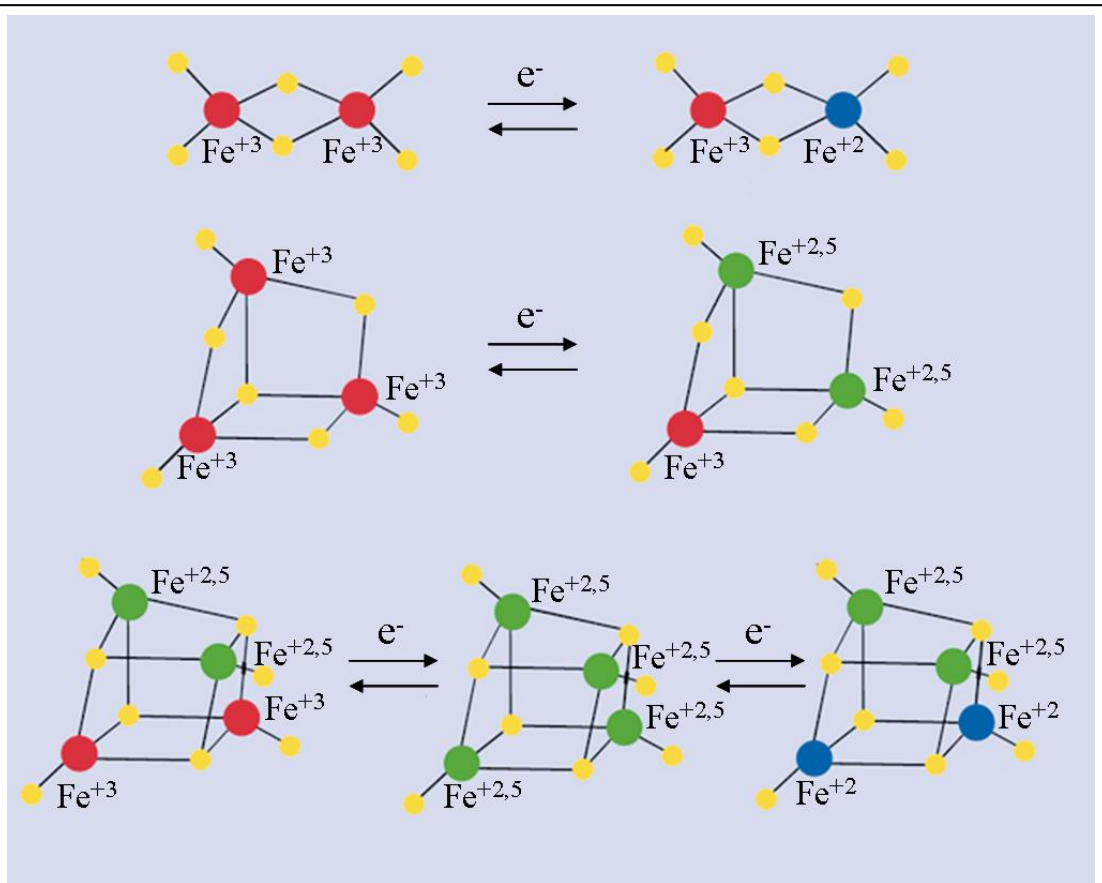


Figura 55: Estados de oxidación descritos para los clusters de Fe-S más comunes [Cam 10].

alta covalencia del azufre [Güt 11]. En la tabla 7 se resumen los parámetros Mössbauer característicos de los clusters de Fe-S más comunes.

Tipo	Valencia formal	δ (mm/s) a 4K	Δ (mm/s)
$[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$	2xIII	0.27	0.6
$[2\text{Fe}-2\text{S}]^{1+}$	III,II	0.35, 0.65	0.6, 2.7
$[3\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$	3xIII	0.27	0.63
$[3\text{Fe}-4\text{S}]^0$	{II/III}, III ^c	0.46, 0.32	1.47, 0.52
$[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$	{II/III}, 2xII	0.5, 0.58	1.32, 1.89
$[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$	2x{II/III}	0.42	1.12
$[4\text{Fe}-4\text{S}]^{3+}$	{II/III}, 2xIII	0.4, 0.29	1.03, 0.88 ^c

Tabla 7: Parámetros Mössbauer de los clusters de Fe-S más comunes [Eck 11].

La existencia de clusters de Fe-S no es, sin embargo, dependiente de la presencia de proteínas. Existe un amplio campo de investigación en química inorgánica que ha resultado en una gran variedad de análogos sintéticos de los sitios activos de las proteínas de Fe-S, donde los clusters Fe-S son estabilizados por unión a distintas moléculas [Ven 04]. En el caso particular de los análogos sintéticos de sitios [2Fe-2S], la mayoría de las iniciativas resultan en la estabilización de clusters totalmente oxidados $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{+2}$, mientras que los clusters de valencia mixta $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{1+}$ sólo pueden ser obtenidos por métodos electroquímicos en solución [Mas 81].

El glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH) es el principal péptido celular que contiene grupos -SH, y su concentración en la célula llega hasta 10 mM. Está presente en una variedad de sistemas celulares y participa de una importante serie de funciones, fundamentalmente en relación al metabolismo del oxígeno. La estructura del glutatión se muestra en la figura 56. Muchos reportes recientes demostraron que las enzimas glutarredoxinas forman dímeros unidos por puentes $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$, donde el glutatión provee dos ligandos tiol exógenos. Estos hallazgos sugieren que el glutatión podría tener un rol en la estabilización de los clusters $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$.

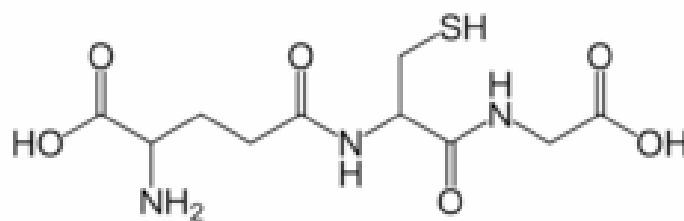
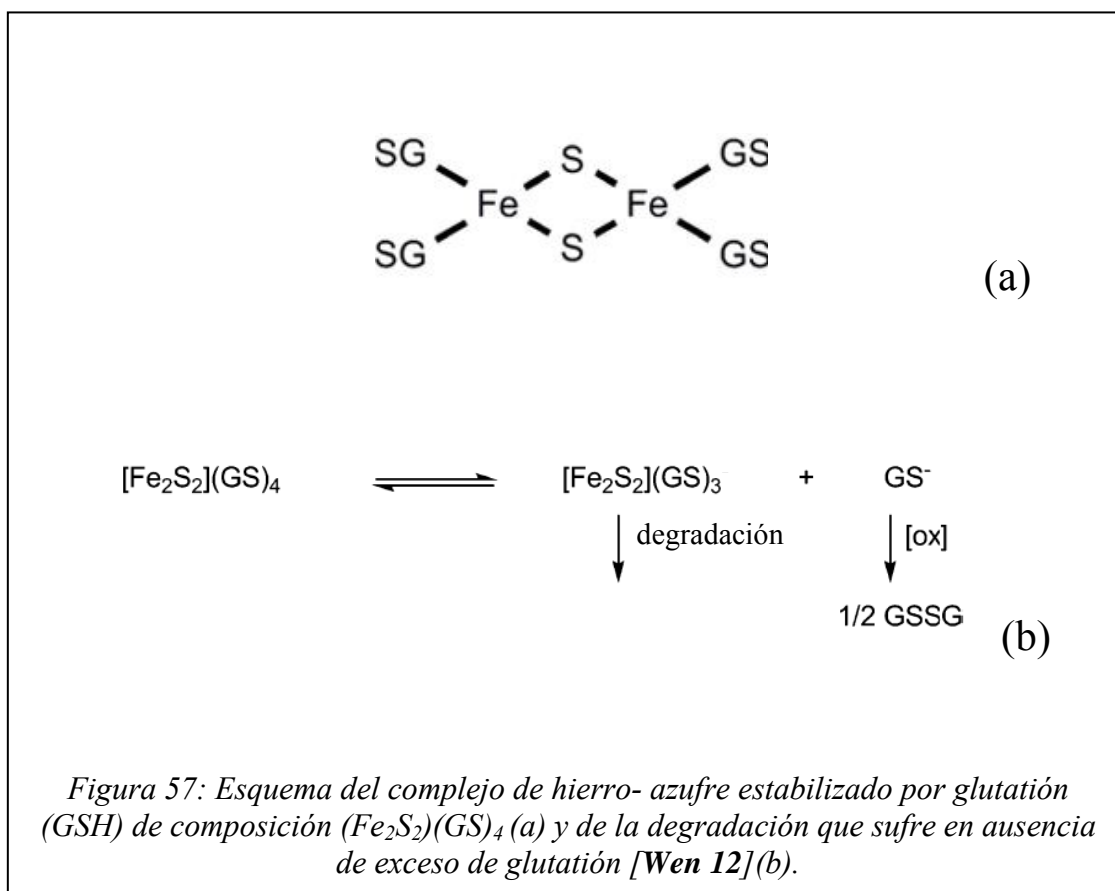


Figura 56: Estructura del glutatión (GSH)

La posibilidad de que el glutatión pueda coordinar y estabilizar a clusters de Fe-S fue estudiada por el grupo del Dr. J. Cowan de la Universidad de Ohio. Efectivamente, estudios ópticos, redox, de Resonancia Magnética Nuclear y de Espectroscopía de Masas del compuesto que resulta de mezclar en condiciones adecuadas ión férrico, sulfuro y glutatión permitieron concluir que el glutatión puede, bajo condiciones fisiológicas y sin asistencia enzimática, estabilizar *in vitro* clusters Fe_2S_2 para dar lugar a complejos de estequiometría $Fe_2S_2(GS)_4$ [Wen 12]. La estructura del complejo sintetizado se esquematiza en la figura 57(a). En consistencia con su presencia en la célula y su rol funcional, se encontró que el cluster complejado con glutatión es estable a la presencia de O_2 si se encuentra en solución de glutatión en concentración fisiológica. En ausencia de exceso de glutatión, se observa una



degradación que se atribuye a la oxidación de glutatión seguida de su disociación del cluster, como se representa en la figura 57(b) [Wen 12].

4.3.2. Experimental

En esta tesis se estudió mediante Espectroscopía Mössbauer el complejo de síntesis $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$ obtenido por el grupo del Dr. Cowan con el objetivo de establecer el estado de oxidación de los átomos de hierro cuando dicho complejo se encuentra en solución.

Dado el bajo porcentaje atómico de hierro en la muestra, se hizo necesario el enriquecimiento de la misma en ^{57}Fe . Con dicho objetivo, la síntesis química inicialmente puesta a punto fue adaptada a fin de obtener, a partir de $^{57}\text{Fe}^0$, $^{57}\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$. El procedimiento de síntesis se presenta en la primera parte de esta sección seguido de una medida Mössbauer a temperatura ambiente del sólido así obtenido. Posteriormente, y con el objetivo de caracterizar el estado de oxidación del hierro de los clusters en condiciones cercanas a las fisiológicas, se realizaron medidas Mössbauer del complejo en solución a bajas temperaturas.

Por otra parte se realizó un estudio mediante Espectroscopía Mössbauer del sólido en distintas condiciones de humedad para indagar sobre la posible dependencia de los resultados obtenidos con dicha variable.

4.3.2.1 Medidas Mössbauer en el sistema $^{57}\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$

Preparación de $^{57}\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$: 10 mg de ^{57}Fe metálico fueron disueltos en 250 μl de una mezcla 1:1 de HCl concentrado y HNO_3 . La suspensión resultante fue agitada por

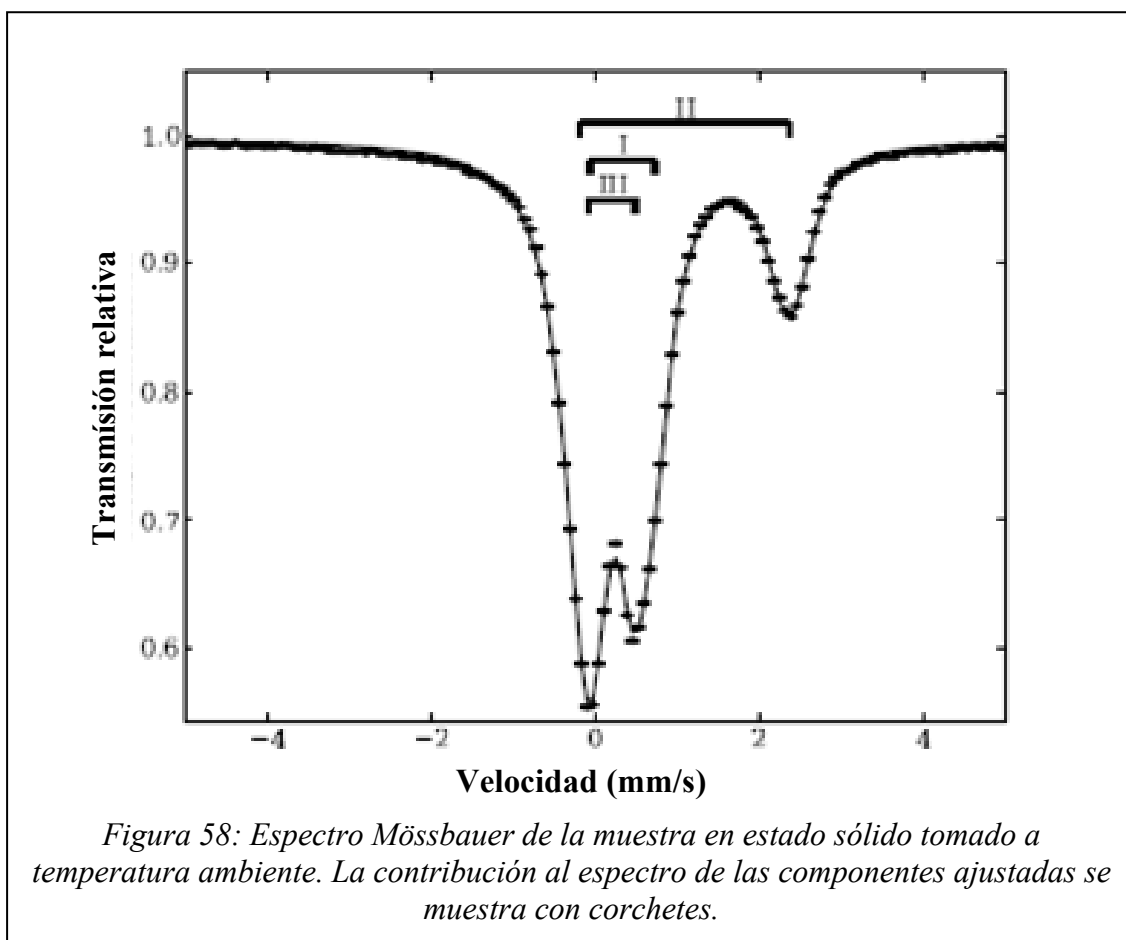
aproximadamente 10 minutos hasta que todos los sólidos se disolvieron y el desprendimiento de gases cesó. Una solución de NaOH 5 M fue entonces agregada lentamente en alícuotas de 20 μL , luego de cada una de las cuales el pH de la solución fue chequeado. Se continuó con este agregado hasta alcanzar un pH $\sim 7,4$ (típicamente $\sim 300\text{-}340$ μL de NaOH 5 M). El color de la mezcla viró a amarillo claro y luego a anaranjado oscuro. Esta solución stock de sal de ^{57}Fe fue subsecuentemente utilizada para sintetizar los complejos marcados con ^{57}Fe . La solución fue centrifugada para descartar cualquier precipitado, y luego 0,077 g de GSH en 4 mL de H_2O , a pH 8.6, fueron agregados. Finalmente se agregaron 500 μL de una solución de Na_2S 200 mM y la reacción continuó por 10 minutos antes de la precipitación con exceso de etanol, con agitación. La solución resultante fue centrifugada a 14.000 rpm y el sobrenadante removido por decantación. El sólido fue resuspendido dos veces más en etanol con agitación y fue colectado por centrifugación antes de un secado final en *speedvac* por un período de cuatro horas para obtener 82 mg de muestra.

4.3.2.1.1 Muestra en estado sólido

El absorbente Mössbauer fue preparado distribuyendo uniformemente los 82 mg de la muestra en un portamuestra plástico circular de 2 cm de diámetro que luego se cerró con una tapa plástica complementaria (la forma habitual de trabajo). Se realizó una medida Mössbauer a temperatura ambiente que resultó en el espectro que se muestra en la figura 58. Los datos pudieron ser satisfactoriamente ajustados considerando el modelo del absorbente grueso. Dicho ajuste arrojó la existencia de tres dobletes Lorentzianos cuyos parámetros se listan a continuación

Fracción I	56 (1) %	$\delta = 0,21$ (2) mm/s	$\Delta = 0,55$ (3) mm/s
------------	----------	--------------------------	--------------------------

Fracción II	23 (1) %	$\delta = 1,10$ (4) mm/s	$\Delta = 2,54$ (8) mm/s
Fracción III	21 (1) %	$\delta = 0,33$ (2) mm/s	$\Delta = 0,79$ (3) mm/s



Una primera inspección de los parámetros obtenidos teniendo en cuenta los datos reportados para sistemas similares (ver tabla 7) muestra que el corrimiento isomérico de la componente II se aparta mucho de lo que se espera para los clusters del tipo $[2Fe_2S]$. Sin embargo, es posible asignar esta componente, en base a su corrimiento isomérico y desdoblamiento cuadrupolar $[Gre]$, a Fe en estado de oxidación +2.

Los parámetros hiperfinos de las componentes I y III se encuentran dentro de lo esperado para clusters completamente oxidados $[2Fe_2S]^{2+}$, pudiéndose asignar estas contribuciones, en principio, a este tipo de compuestos.

La existencia de más de una contribución al espectro revela la presencia de al menos tres clases distintas de átomos de hierro en la muestra, hallazgo que puede

interpretarse en términos de una reacción incompleta o, teniendo en cuenta que la medida se realizó varios días después de la síntesis, de una degradación parcial de la muestra.

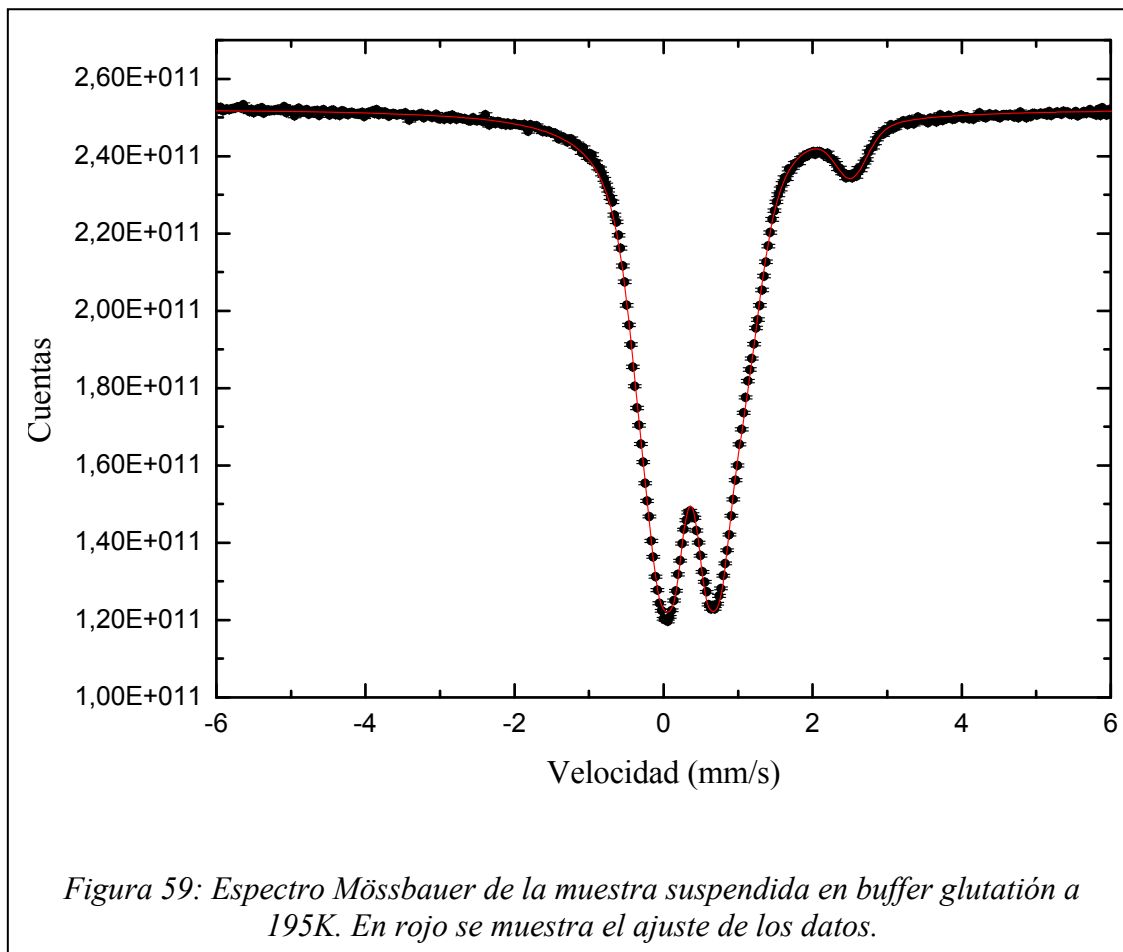
Aproximadamente la mitad de este sólido fue utilizada para realizar los experimentos en solución que se detallan a continuación y la otra mitad se conservó en desecador conteniendo sílica gel para indagar sobre la posible degradación del compuesto con el tiempo, experimentos que se detallan en la sección 4.3.2.1.3.

4.3.2.1.2 Muestra en solución

Considerando que es de interés caracterizar al compuesto sintetizado en condiciones cercanas a las fisiológicas, se procedió a estudiar el sólido en solución. Con el fin de trabajar con una solución de composición química lo más simple posible y que a su vez simulara las condiciones del interior celular en las cuales se sabe que el complejo es estable, se preparó un buffer acuoso 10 mM en GSH de pH 8,58 (“buffer glutatión”).

Como ya fue adelantado, aproximadamente la mitad del sólido sintetizado fue colocada en 300 μ l de buffer glutatión fresco. Aunque la disolución total del sólido no fue alcanzada, la suspensión se colocó en un portamuestras cilíndrico de 2 cm de diámetro y fue tapada con un film plástico. Esta muestra fue estudiada por espectroscopía Mössbauer, a 195 K utilizando el arreglo *ad hoc* comentado en la sección 2.3.3. El espectro Mössbauer obtenido se muestra en la Figura 59. A simple vista se observa una disminución de la componente de Fe^{+2} . El ajuste satisfactorio de los datos hace necesaria la utilización del modelo del absorbente grueso y resulta en tres dobletes Lorentzianos:

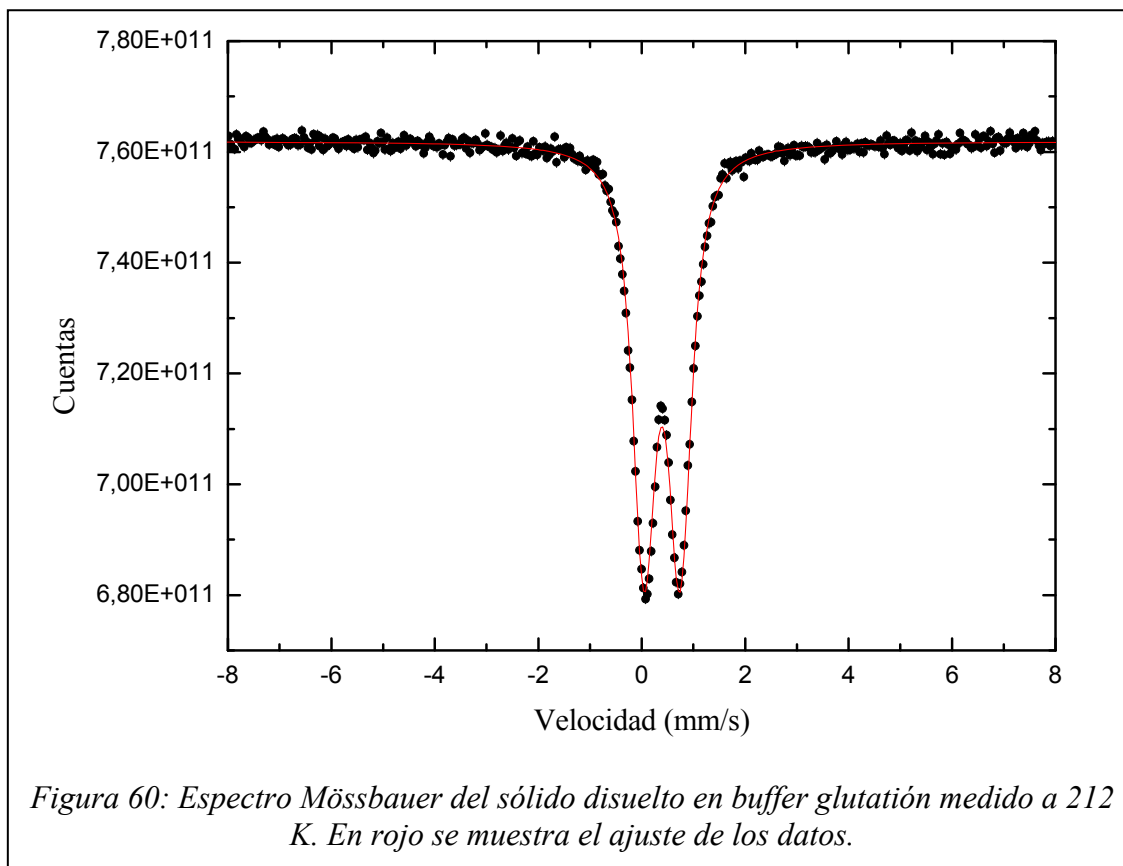
Fracción I	90 (2) %	$\delta = 0,36 (1) \text{ mm/s}$	$\Delta = 0,63 (1) \text{ mm/s}$
Fracción II	2 (1) %	$\delta = 1,16 (9) \text{ mm/s}$	$\Delta = 2,7 (3) \text{ mm/s}$
Fracción III	8 (2) %	$\delta = 0,44 (3) \text{ mm/s}$	$\Delta = 1,17 (7) \text{ mm/s}$



Nuevamente, y de acuerdo a los valores del corrimiento isomérico δ , las componentes I y III pueden ser asociadas con Fe(III) y la otra con Fe(II). El aumento de los valores de δ con respecto a la medida del sólido a temperatura ambiente es consistente con la menor temperatura de este experimento [Gre].

Con el objetivo de lograr su disolución, más buffer glutatión fue agregado a la muestra. Y dado que era de interés definir con mayor exactitud las fracciones de cada una de las especies presentes, se procedió a medir una pequeña cantidad de la muestra disuelta con el fin de realizar el experimento en el límite del absorbente delgado. Con esta idea, el absorbente Mössbauer consistió en 600 μl de una solución 9,3 mM de la

muestra en buffer glutatión que fue transferida al portamuestras Mössbauer cilíndrico. La medida Mössbauer fue realizada a 212 K y resultó en el espectro que se muestra en la figura 60 donde se observa la desaparición de la componente asociada al Fe^{+2} .



El espectro puede ser ajustado, considerando el modelo del absorbente delgado, con un único doblete Lorentziano de parámetros:

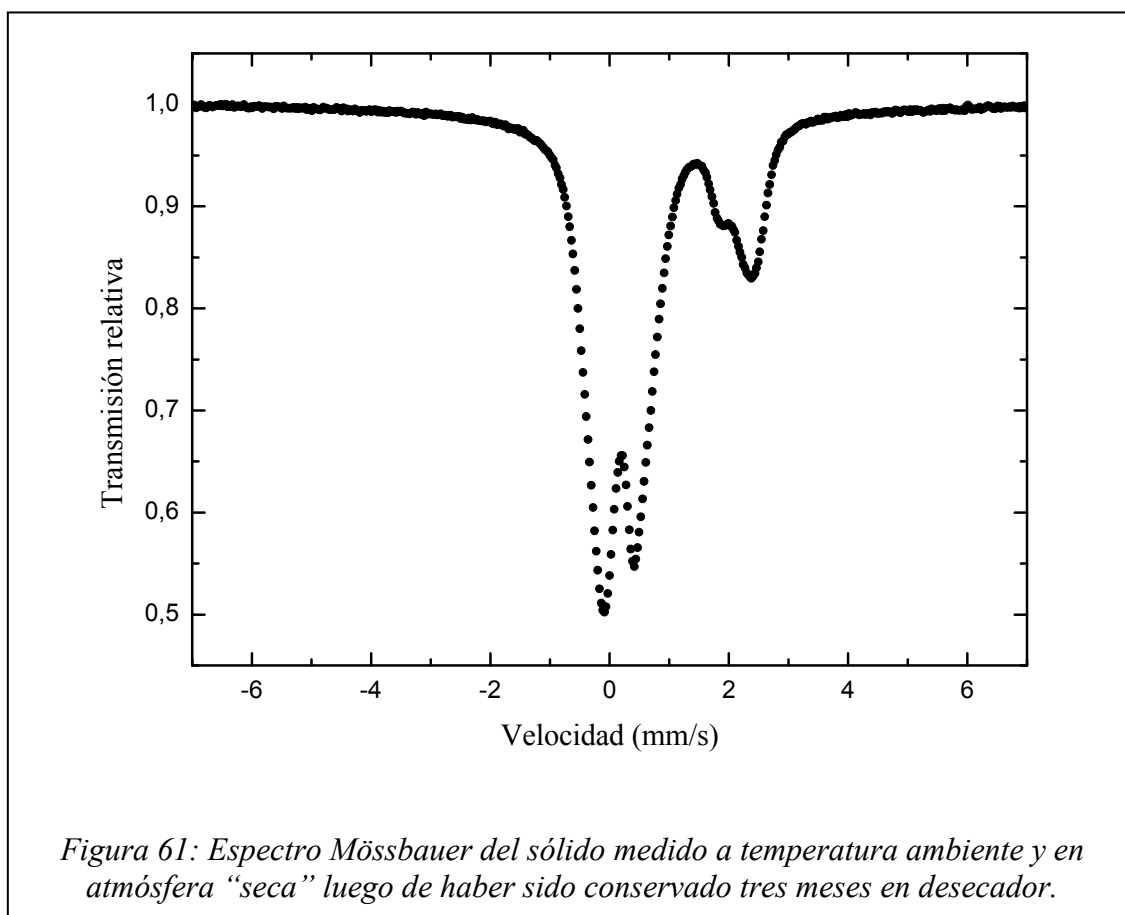
Fracción I 100 (0) % $\delta = 0,393 (1) \text{ mm/s}$ $\Delta = 0,676 (2) \text{ mm/s}$

Sobre las bases de la presencia de clusters de estequiometría $2\text{Fe}2\text{S}(\text{GS})_4$ en la muestra y la concordancia de los parámetros hiperfinos con los reportados para sistemas de este tipo (tabla 7), se puede asignar esta componente a $\text{Fe}(\text{III})$ presente en clusters $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$. De esta manera se logra establecer que el estado de oxidación de los átomos de Fe en el complejo $2\text{Fe}2\text{S}(\text{GS})_4$ disuelto en solución es +3.

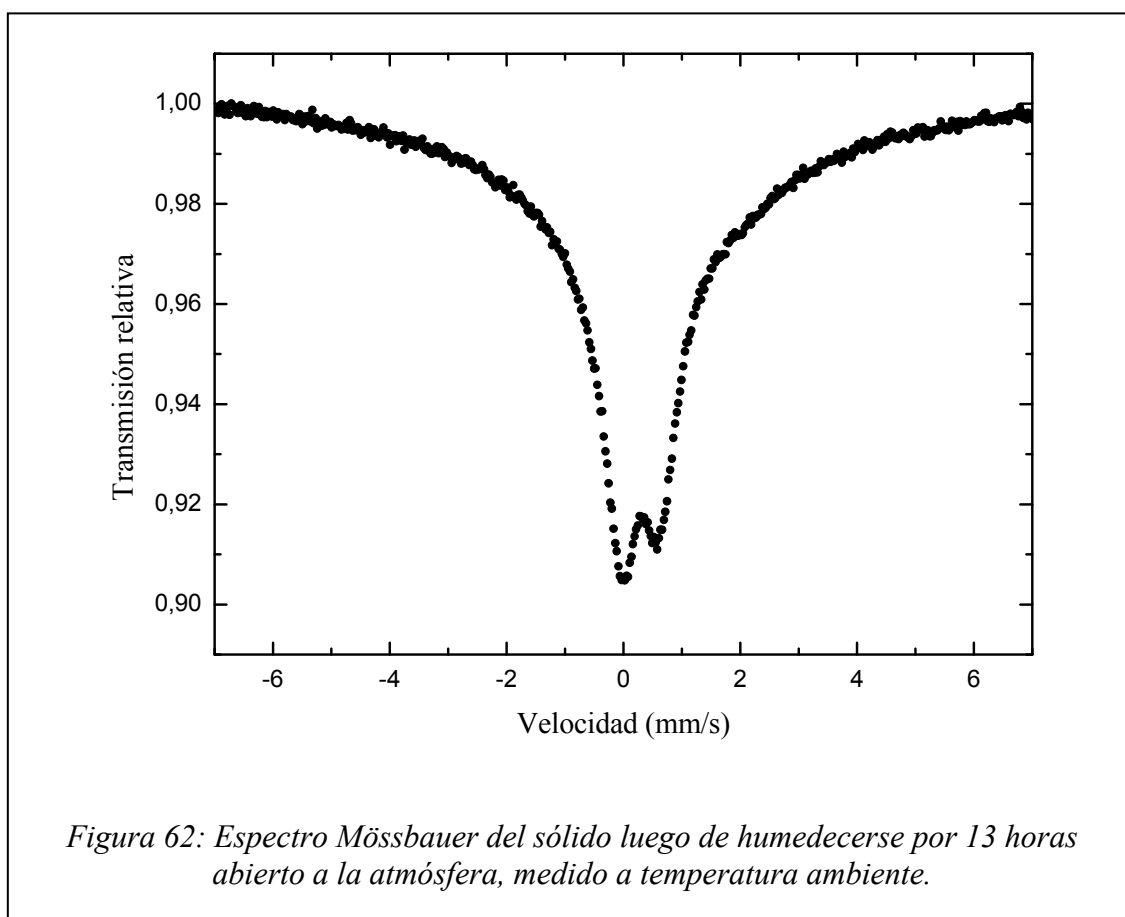
La existencia de una sola componente indica que hay sólo un tipo de átomos de hierro luego de la disolución en buffer glutatión indicando que se completó la reacción química o que se revirtió la posible degradación del cluster.

4.3.2.1.3 Muestra en distintas condiciones de humedad

Como ya hemos señalado en “estado del arte” se ha descrito que el complejo $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4]^{+2}$ se degrada con el tiempo. Una observación experimental es que, expuesto a la atmósfera, el sólido obtenido por síntesis química se humedece rápidamente. Para establecer si existe una relación entre la degradación y el contenido de humedad de la muestra, se realizaron los experimentos que se describen a continuación.



La porción de la muestra que se caracterizó inicialmente en la sección 4.3.2.1.1 y que se conservó en desecador fue medida nuevamente tres meses después. La medida se realizó sin exponer la muestra a la humedad ambiental. De esta manera, el experimento Mössbauer fue realizado en condiciones de atmósfera “seca” con la muestra sin la tapita superior del portamuestra, en una bolsita conteniendo piedritas de sílica gel que se cerró herméticamente y luego se colocó, para su medida a temperatura ambiente, en el espectrómetro. El espectro Mössbauer obtenido se muestra en la figura 61 donde puede observarse un hombro en el pico asociado al Fe^{+2} que señala la aparición de Fe^{+2} en otro entorno químico. Para establecer si esta transformación resulta del proceso de secado se procedió a estudiar la dependencia del espectro con la humedad de la muestra.



Seguidamente la muestra fue retirada de la bolsita conteniendo sílica gel y fue medida, abierta a la atmósfera, durante alrededor de 13 horas tomando espectros Mössbauer cada 120 segundos. Después de ese tiempo se realizó una medida Mössbauer

en las mismas condiciones, pero de mayor duración para aumentar la estadística, que resultó en el espectro que se muestra en la figura 62. Este resultado muestra el ensanchamiento típico de los picos producto del movimiento molecular del sólido humedecido. Por otra parte el espectro revela una asimetría alrededor del doblete correspondiente al Fe(III) que se debe a la presencia, a corrimientos isoméricos altos, del Fe(II) que en este caso no se resuelve.

La evolución del espectro Mössbauer desde que la muestra seca se expuso a la humedad hasta que se tomara el espectro recién discutido, se muestra en el gráfico de la

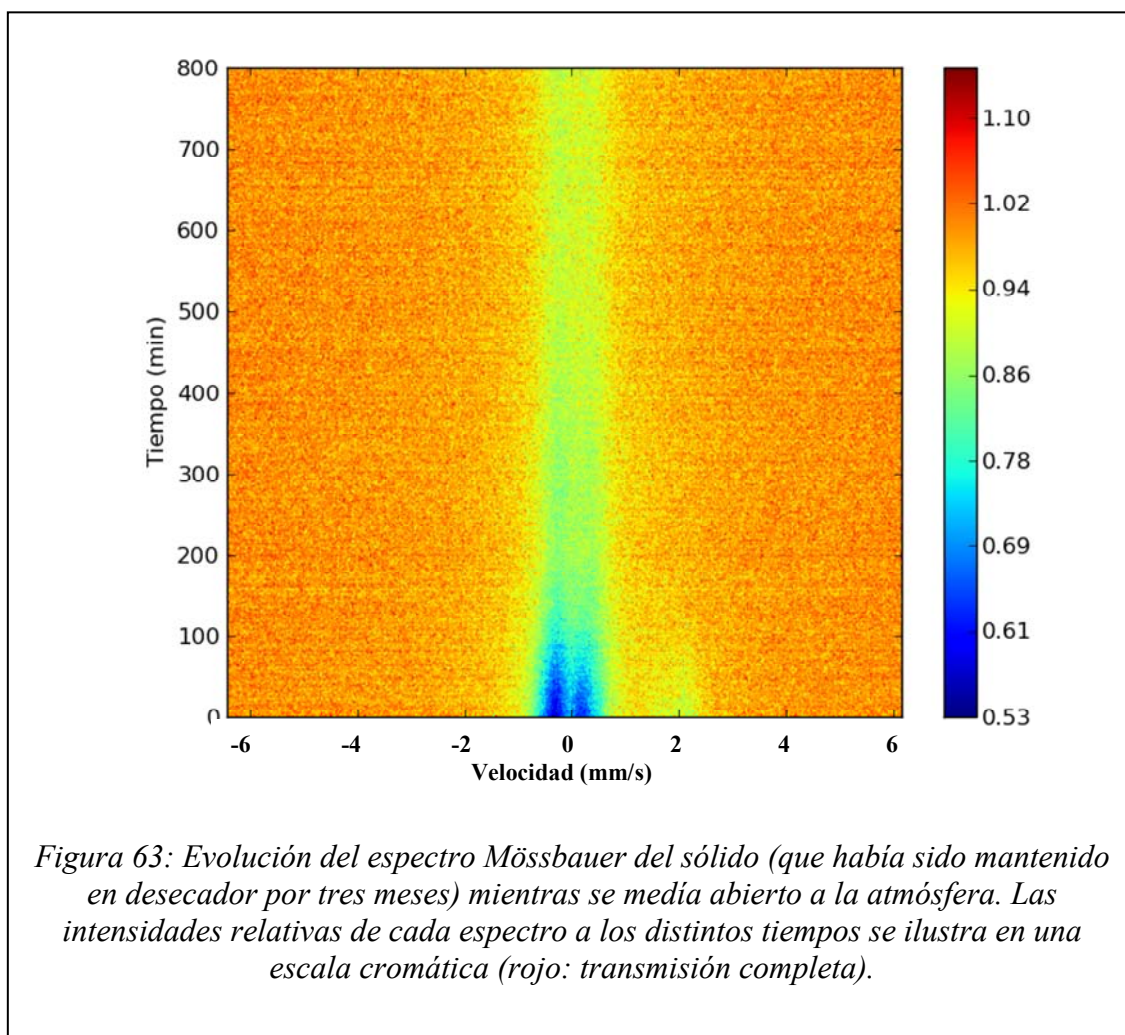
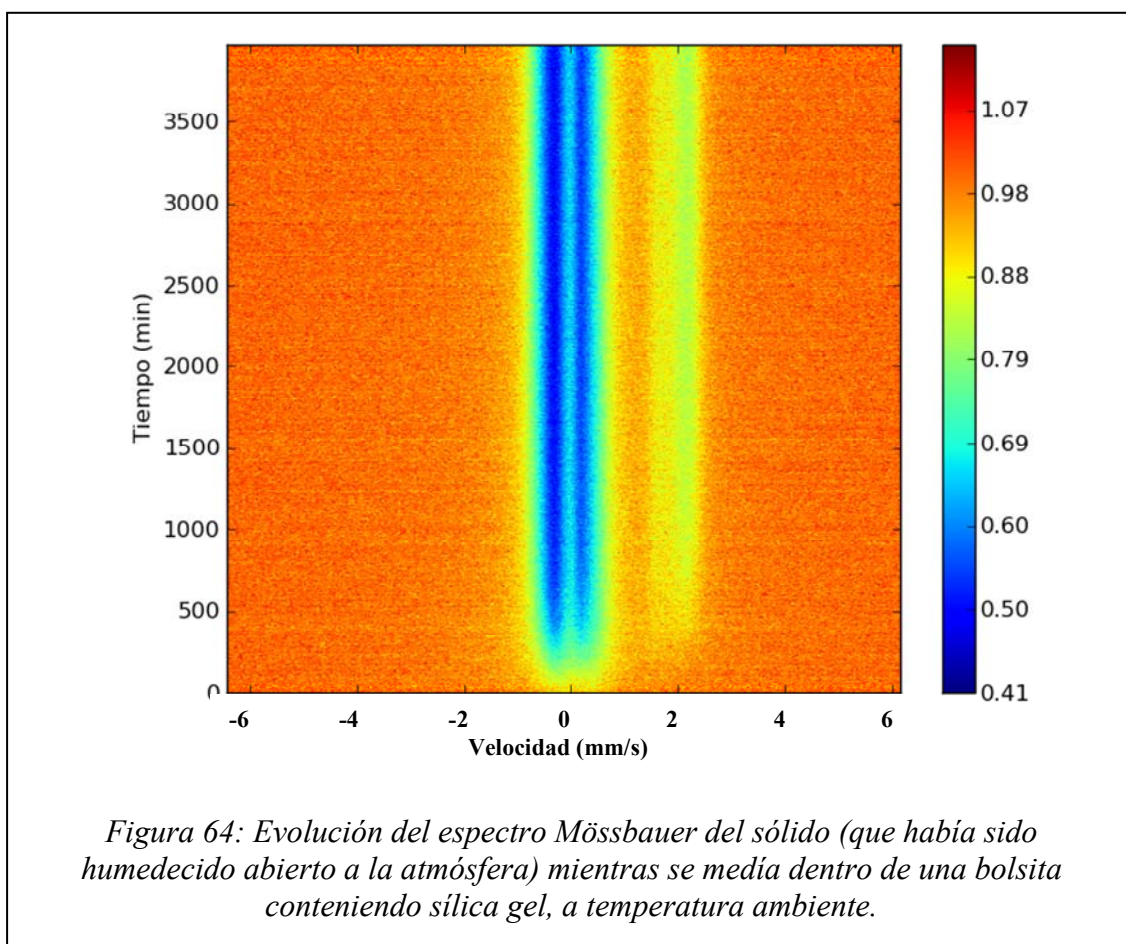


figura 63. En el eje vertical se grafica el tiempo de medida (tiempos más largos hacia arriba) y en las abscisas la velocidad relativa entre la fuente y el absorbente. A cada tiempo le corresponde un espectro que se representa por una escala de colores asociada

a distintas absorciones o profundidades de los picos (el azul indica un pico profundo o, lo que es lo mismo, una alta absorción resonante). Se observa que la hidratación ocurre en lapsos menores a 100 minutos y que en ningún momento de la hidratación se pierde el “hombro” del pico de Fe^{+2} . De esta manera, las diferencias entre los resultados Mössbauer del sólido secado por tres meses en desecador respecto al inicial no puede atribuirse a una diferencia en el grado de humedad de la muestra, evidenciando la degradación progresiva del material.

Finalmente se analizó la evolución de los espectros con el secado. Para ello el



sólido totalmente humedecido (luego de la medida anterior) fue colocado, sin tapa del portamuestra, en una bolsita conteniendo sílica gel. Se realizaron medidas Mössbauer de la muestra así preparada a temperatura ambiente cada 120 segundos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 64. Se observa que el secado ocurre en lapsos de

tiempo menores a 500 minutos resultando esencialmente en el espectro Mössbauer de la muestra seca inicial. Esta observación es evidencia de la reversibilidad del proceso de humedecido/ secado.

Los experimentos Mössbauer del humedecido/ secado del sólido son evidencia de que, en principio, la degradación química del $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$ que ocurre con el tiempo no se encuentra en relación con el grado de humedad de la muestra.

La muestra seca, resultante del experimento anterior, fue disuelta en buffer glutatión y medida, a bajas temperaturas, por Espectroscopía Mössbauer (datos no mostrados). El espectro esencialmente igual al mostrado en la figura 60 y pudo ser satisfactoriamente ajustado con un solo doblete de parámetros hiperfinos consistentes con la existencia de complejos $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4]^{+2}$.

4.4 Experimentos de Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en sistemas tisulares

4.4.1 Estado del arte

La célula es la menor unidad estructural que posee características vitales. Sus componentes químicos incluyen 75- 85 % de agua, 10- 20 % de proteínas, 2-3 % de lípidos, 1% de glúcidos y 1 % de materia orgánica [Gen]. El tamaño promedio de la mayoría de las células varía de 10 a 50 μm .

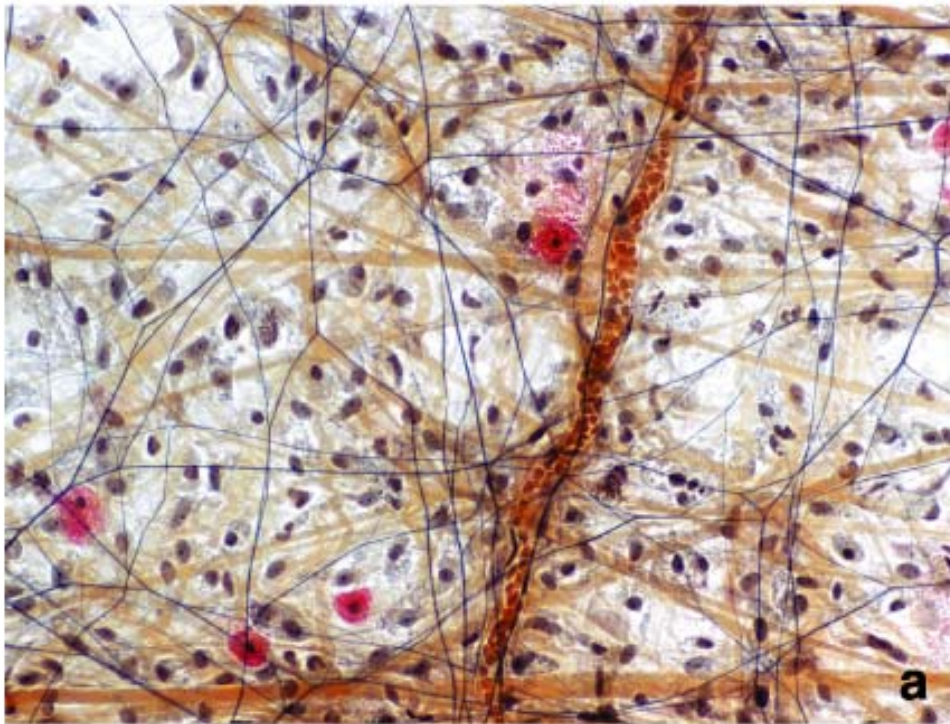


Figura 65: Imagen de microscopía óptica de un preparado de tejido conectivo. Las células se revelan por su núcleo, que aparece como manchas ovaladas o redondeadas violetas. Se observa entre ellas el entramado correspondiente a la matriz extracelular.

Los tejidos son agrupaciones de células con igual función. Dos o más tejidos forman unidades funcionales mayores llamadas “órganos” como son la piel, el hígado o el útero, entre otros. A pesar de sus diferencias estructurales y funcionales, todos los órganos están compuestos por sólo cuatro tipos básicos de tejidos: epitelial, conectivo, muscular y nervioso [**Ros 05**]. Los tejidos epitelial, muscular y nervioso están constituidos esencialmente por células especializadas en funciones particulares. El conectivo es especial como tipo de tejido debido a su contenido de sustancia intercelular y es el que da sostén a los otros tejidos básicos, tanto estructural como funcionalmente. Está compuesto por células y una matriz extracelular que presenta un entramado constituido por proteínas y glúcidos embebidos en agua, sales y otras sustancias de bajo peso molecular [**Gen 04**]. En la figura 65 se muestra una imagen de microscopía óptica de un corte histológico de tejido conectivo, donde se pueden observar las células que los constituyen y el entramado correspondiente a la matriz extracelular.

Se llama tumor al crecimiento anormal de algún tejido corporal. Los tumores están formados esencialmente por los mismos componentes que el tejido de origen y el grado de diferenciación de dichos componentes respecto al tejido normal depende del tipo de tumor [**Rob 05**].

Como hemos mencionado, la técnica PALS ha comenzado a aplicarse recientemente al estudio de tejidos animales y humanos. La motivación de dichas investigaciones es tratar de establecer si la técnica puede ser útil para distinguir el tejido propio del tumor del tejido normal que le dio origen. Algunos investigadores confían incluso en que, a largo plazo, la técnica pueda servir como base para el desarrollo de ensayos de estadificación de tumores [**Jea 06, Liu 07, Yan 09**].

Se han reportado estudios en cáncer de útero [**Eli 06**], cáncer de piel [**Jea 06, Liu 07**] y cáncer de cerebro [**Yan 09**] cuyas características y principales resultados se

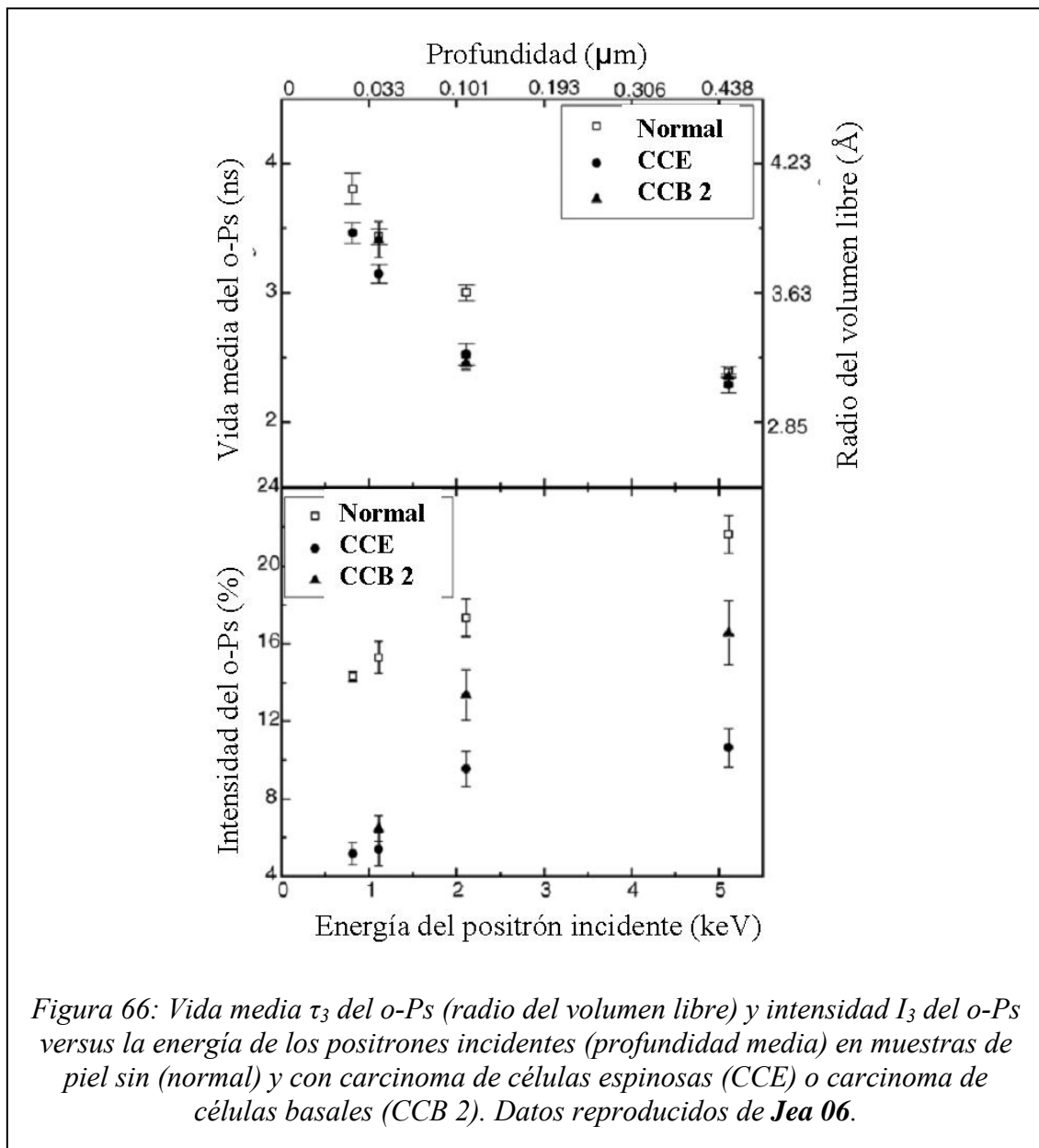
destacan en la tabla 8 donde sólo se incluyen, como ya se anticipó, los parámetros de aniquilación correspondientes a la vida media larga.

	Tumor de útero (ratón)	Tumor de piel (humano)	Tumor de piel (humano)	Tumor de cerebro (rata)
Objetivo	Determinar volúmenes libres en función del tiempo de evolución del tumor	Estudiar aniquilación de positrones a distintas profundidades	Distinguir tejido sano y tejido tumoral	Distinguir tejido sano y tejido tumoral
Número de muestras	6 (1 muestra normal y 5 tumores de distinta edad)	3 (dos porciones tumorales y una porción sana)	4 (dos porciones tumorales y dos porciones sanas)	4 (secciones de cerebro conteniendo cada una porción sana y tumoral)
Espesor de la muestra	6 mm	0,015 mm	No informa	2 mm
Conservación	-	Las muestras fueron extraídas y transportadas en hielo seco hasta la medida.	La muestra disecada se conserva en solución bacteriostática hasta la medida.	Solución formol al 4 %
Resultados	Muestra normal: $\tau_3 = 2,927$ (30) ns $I_3 = 6,54$ (26) % Muestras tumorales: $\tau_3 = 2,695$ (20)- 1,841 (20) ns $I_3 = 7,72$ (10)- 10,13 (11) % (según el tiempo de evolución del tumor)	Resultados correspondientes a positrones de 5 keV (1 μ m) Muestra normal: $\tau_3 = 2,40$ (1) ns $I_3 = 22$ (1) % Muestra tumoral CCE: $\tau_3 = 2,20$ (1) ns $I_3 = 13$ (1) % Muestra tumoral CCB 2: $\tau_3 = 2,30$ (1) ns $I_3 = 10$ (1) %	Muestra normal CE: $\tau_3 = 2,043$ (8) ns $I_3 = 14,65$ (10) % Muestra tumoral CCE: $\tau_3 = 1,951$ (11) ns $I_3 = 13,70$ (14) % Muestra normal CB 2: $\tau_3 = 2,081$ (8) ns $I_3 = 14,16$ (10) % Muestra tumoral CCB 2: $\tau_3 = 2,026$ (5) ns $I_3 = 13,59$ (6) %	Muestra normal: $\langle \tau_3 \rangle = 2,07$ (17) ns Muestra tumoral: $\langle \tau_3 \rangle = 2,04$ (14) ns
Referencia	Eli 06	Jea 06	Liu 07	Yan 09

Tabla 8: Características y principales resultados de las investigaciones previas de tejidos tumorales utilizando Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de medición de vidas medias.

En el trabajo de M. M. Elias *et al* [**Eli 06**] se investiga la aniquilación de positrones en muestras de tumores de distinto tiempo de evolución. Se observa, a medida que el tumor evoluciona, una variación monótona de los parámetros τ_3 e I_3 a partir de los valores de tejido sano cuyos valores extremos pueden verse en la tabla 8. Los autores postulan que la intensidad de aniquilación del *o-Ps* (I_3) es proporcional a la probabilidad de que el positrón encuentre un hueco en el cual quedar confinado, de modo que es un indicador del número de esas cavidades. De esta manera se propone que la evolución del tumor trae aparejado un aumento en el número de cavidades, que es acompañado con un decrecimiento de su tamaño, lo que explica la disminución de τ_3 . Las cavidades o volúmenes se asignan en este caso a espacios intercelulares.

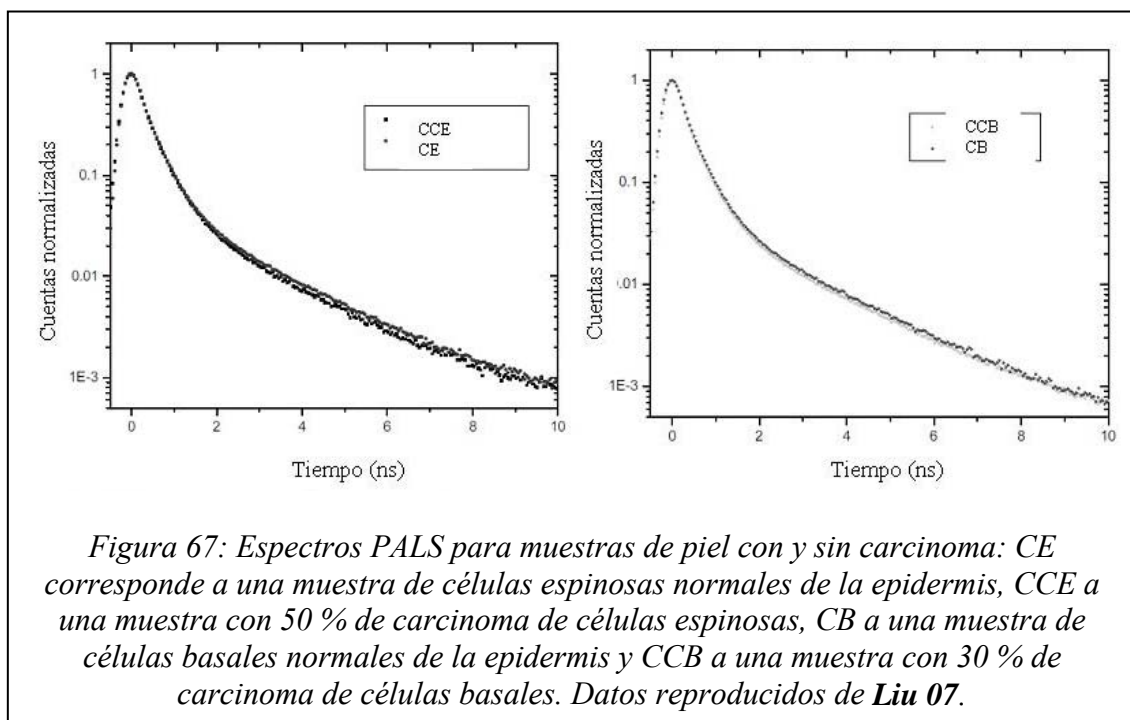
En el trabajo de Jean *et al* [**Jea 06**] se aplica un haz de positrones lentos a la investigación de cáncer de piel humana. Los experimentos PALS usando positrones lentos se llevaron a cabo utilizando los positrones emitidos por una fuente de ^{22}Na que fueron frenados con una delgada lámina de tungsteno desde la cual los positrones son eyectados con una energía de 3 eV. A partir de allí los positrones son acelerados con energías que van de 100 eV a 30 keV. Este rango de energías corresponde profundidades de penetración en materiales biológicos de 1 nm a 8 μm . Se estudiaron células normales de la epidermis (muestra normal), una muestra de piel con 50 % de carcinoma de células espinosas (CCE) y otra con 30 % de carcinoma de células basales (CCB 2). Las muestras fueron extraídas y transportadas en hielo seco desde la facultad médica hasta el laboratorio de positrones lentos. Los experimentos se realizaron con un vacío de 10^{-10} atmósferas y los autores destacan que las muestras debieron ser secadas bajo vacío por un período de al menos 3 días hasta que los resultados de los experimentos PALS permanecieron constantes. En la figura 66 se reproducen los resultados obtenidos para la vida media τ_3 y la intensidad I_3 en las muestras estudiadas



como función de la energía del positrón incidente. En la tabla 8 se presentan los valores de τ_3 e I_3 para las muestras mencionadas, extraídos de la figura 66 para el caso de los positrones de aproximadamente 5 keV. A partir de las diferencias en los parámetros observados los autores concluyen que en las muestras patológicas la aniquilación de positrones aparece con intensidades y vidas medias menores que aquellas que caracterizan a la piel normal. Los autores asocian los datos obtenidos con una reducción del volumen libre debido a la presencia de las células patológicas. Los sitios con espacio libre para la localización del positronio son los espacios intermoleculares dentro de las

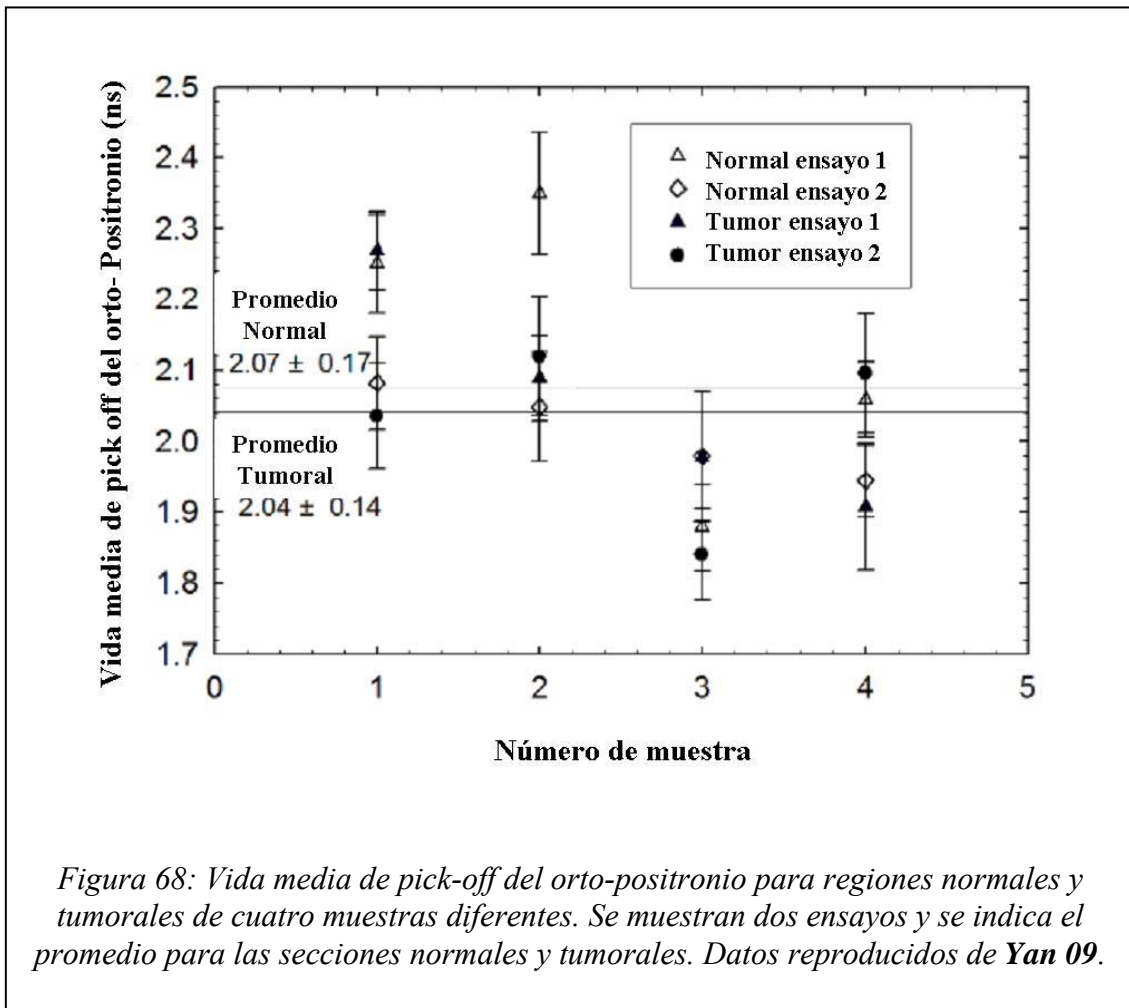
células, que aparecen disminuidos en los tejidos con cáncer respecto del normal. La diferencia más importante entre las muestras con y sin cáncer ocurre en la amplitud I_3 . Los autores la asocian a efectos químicos y físicos debido a la presencia de células tumorales y concluyen que existen diferencias importantes en la aniquilación de positrones en la piel humana con/sin cáncer. Los autores proponen dos modelos para explicar la menor amplitud I_3 de las muestras tumorales respecto a las normales. En primer lugar, el positronio tiene una afinidad para reaccionar con especies químicas dentro de la célula cancerosa. Por otra parte la formación de positronio podría ser inhibida porque los electrones secundarios en la trayectoria del positrón son capturados por fuertes *scavengers* dentro de las células cancerosas.

Posteriormente los mismos autores investigaron muestras de cáncer de piel humana utilizando el arreglo sándwich convencional [Liu 07]. Los experimentos fueron realizados en condiciones de humedad ambiente. Se investigaron muestras de cáncer de piel extraídas de dos pacientes: uno con CCB y otro con CCE. En ambos casos se extrajeron muestras de piel normal (CE corresponde a una muestra de células espinosas



normales y CB a una muestra de células basales normales de la epidermis). Las muestras extraídas fueron mantenidas en soluciones bacteriostáticas hasta la realización de los experimentos PALS. Los espectros obtenidos se reproducen en la figura 67 y en la tabla 8 se muestran los parámetros asociados con la aniquilación del *o*-Ps. Comparando los valores de I_3 y τ_3 entre las muestras con y sin cáncer del mismo paciente los autores concluyen que estos resultados están de acuerdo con la observación previa obtenida con el haz de positrones lentos para energías de 5 keV (profundidades de 1 μ m). También observan que las vidas medias del positrón en las muestras patológicas son más cortas que en la piel normal.

Con el interés de investigar si PALS puede ser útil para distinguir tejido nervioso normal y tumoral, Yang *et al* [Yan 09] investigaron los parámetros de aniquilación de positrones en secciones de cerebro conteniendo regiones de tejido normal y de tejido



tumoral provenientes de un modelo de glioma de rata. En la figura 68 se reproducen los resultados obtenidos con las distintas muestras. Como puede observarse, los datos sugieren que hay más variación entre las cuatro muestras que entre el valor correspondiente al tejido normal o patológico en cualquiera de ellas. En la tabla 8 se consignan los valores medios de τ_3 obtenidos con los tejidos normal y tumoral en los diferentes experimentos.

En este punto es conveniente discutir algunos aspectos de las comentadas investigaciones a fin de establecer el plan de trabajo a desarrollar:

1) en el trabajo de Elías *et al* [Eli 06] se reportan diferencias notables en la vida media τ_3 observada en un tejido normal comparada con tumores de distinto tiempo de evolución. En lo que concierne a las investigaciones sobre cáncer de piel [Jea 06, Liu 07], a pesar de que los autores concluyen que PALS permite distinguir tejidos normales de tumorales, las pequeñas diferencias en las vidas medias observadas no constituyen una buena base para sostener dicha conclusión. El hecho de que sólo se haya analizado una muestra de cada tipo no permite estimar la dispersión que puede estar afectando a los resultados. En este sentido, la investigación de Yang *et al* [Yan 09] presenta conclusiones más realistas ya que están basadas en la observación de varias muestras donde se pone de manifiesto la dispersión mencionada.

2) en lo que concierne al parámetro τ_3 en tejidos normales y patológicos es interesante observar que en todos los resultados consignados en la tabla 8 τ_3 es superior en las muestras normales que en los tejidos patológicos, aunque sólo en el caso de la investigación de Elías *et al* [Eli 06] las diferencias son significativas.

3) en lo que respecta a la amplitud I_3 , Elías *et al* reportan un notable incremento a partir de la muestra normal con el tiempo de evolución del tumor. Por otra parte, en los trabajos en cáncer de piel [Jea 06, Liu 07] se observa una disminución de dicha

amplitud cuando se comparan los tejidos tumorales con tejidos normales. Estos resultados podrían estar señalando una dependencia de los comportamientos de los parámetros de aniquilación con el tipo de tejido.

4) por otra parte, Yang *et al* [Yan 09] reconocen la importancia de investigar las distintas formas de conservación de las muestras y su incidencia en la vida media del o - Ps . También resulta importante la investigación del efecto del envejecimiento y del secado de las muestras en los parámetros de aniquilación obtenidos. En este sentido es interesante la observación realizada en los experimentos con positrones lentos donde se establece la necesidad de secar varios días las muestras en vacío hasta que los resultados PALS permanezcan constantes. La discrepancia en los valores de τ_3 reportados en las dos investigaciones que tratan con cáncer de piel (ver tabla 8) tal vez puedan deberse a una diferencia de humedad en las muestras.

4.4.2 Experimental

En esta tesis se investiga la aplicación de la Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de medición de vidas medias a muestras de tejidos. En una primera etapa se realizaron estudios tendientes a definir las condiciones experimentales más adecuadas para estudiar mediante PALS estos sistemas altamente complejos. En este sentido se investigó la factibilidad de realizar este tipo de medidas utilizando el arreglo sándwich estándar, las características deseables de las fuentes de positrones, distintos métodos de conservación de las muestras y el efecto del grado de humedad de la muestra en los parámetros de aniquilación.

En una segunda etapa se procedió a investigar la factibilidad de caracterización mediante PALS de tejidos normales y tumorales. Con este objetivo se realizaron

estudios en distintas porciones de órganos sanos, de histología más conocida y homogénea que la de los tumores, a fin de evaluar la reproducibilidad de las medidas y establecer su posibilidad de caracterización. Finalmente se realizaron estudios de distintas muestras tumorales del mismo tipo.

4.4.2.1 Preparación de la fuente de positrones

Tres fuentes de positrones fueron preparadas y caracterizadas a fin de elegir la más adecuada para las medidas PALS en tejidos. Las bondades de dichas fuentes serán discutidas en términos de la facilidad de manipulación y de la fracción y vidas medias de los positrones que se aniquilan en la fuente.

	Actividad de ^{22}Na a 10 cm ($\mu\text{Sv/h}$)	Material	Dimensiones	Sellado	Posibilidad de pérdida de radiactividad
Fuente 1	300	Aluminio	2 cm x 2 cm	Metacrilato	Alta
Fuente 2	1000	Kapton	2 cm x 2 cm	Metacrilato	Moderada
Fuente 3	200	Kapton	1 cm x 1 cm	Resina epoxi	Baja

Tabla 9: Características de las fuentes de positrones preparadas.

Las fuentes se prepararon depositando una solución acuosa de $^{22}\text{NaCl}$ en el centro de una pequeña lámina soporte de aluminio muy delgado o de kapton de $1,42 \text{ mg/cm}^2$. La lámina se dejó secar al aire y luego fue cubierta con otra de igual tamaño y sus bordes sellados con pegamento. La actividad relativa del ^{22}Na depositado se midió

con un monitor Geiger. Las características de las fuentes preparadas se muestran en la tabla 9.

Desde un punto de vista práctico es importante procurar que la fuente no se quiebre al manipularla, con la consecuente pérdida de radiactividad y contaminación de la muestra bajo estudio. Una comparación de la fragilidad de las láminas soporte reveló que la facilidad de producción de fisuras es mayor en el caso de la lámina de aluminio y aumenta con la superficie de la lámina. Por otro lado, la utilización de metacrilato para el pegado de la fuente 2 produjo pequeñas fisuras de la lámina de kapton en la zona de sellado (con posibles pérdidas de radiactividad), problema que no apareció cuando el mismo material fue sellado utilizando resina epoxi (fuente 3).

La aniquilación de los positrones en las fuentes preparadas fue evaluada midiendo láminas de hafnio metálico (τ experimental= 170-180 ps) en el arreglo sándwich estándar. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10.

	τ_1 (ps)	I_1 (%)	τ_2 (ps)	I_2 (%)	τ_3 (ps)	I_3 (%)
Fuente 1	179 (2)	72 (1)	460 (10)	25 (1)	1700 (50)	2,3 (0,1)
Fuente 2	182 (3)	82 (1)	405 (9)	18 (1)	-	-
Fuente 3	195 (6)	57 (3)	378 (11)	41 (3)	1690 (60)	2,3 (0,1)

Tabla 10: Parámetros de aniquilación de positrones en cada una de las fuentes preparadas.

En todos los casos se verifica la aparición de una vida media corta (τ_1) que puede atribuirse a la aniquilación del positrón en el material de referencia, en acuerdo con el valor esperado. Las otras vidas medias, cuya asignación se discutirá en breve, corresponden a la aniquilación en los materiales de la fuente. En este sentido, es deseable que sólo una pequeña fracción de los positrones se aniquilen en la fuente de modo que la mayoría sean capaces de atravesarla y estén disponibles para aniquilarse en

la muestra bajo estudio. De la tabla 10 se desprende que es la fuente 2, con un 82 % de positrones que se aniquilan en la muestra, la que mejor cumple con este requisito.

La vida media intermedia (τ_2) está en buen acuerdo para las fuentes 2 y 3 con los valores reportados para el kapton ($\tau_{\text{kapton}} = 386$ ps) asignándose entonces a la aniquilación en dicho material. El τ_2 de la fuente 1 se asocia, en base a la intensidad con la cual aparece, con la aniquilación del positrón en la lámina de aluminio. En este caso el valor ajustado se aparta del valor reportado para el aluminio ($\tau_{\text{aluminio}} = 163$ ps) debido a que el material utilizado para depositar la fuente no es libre de defectos.

Finalmente τ_3 es del orden de la vida media del *o*-Ps en materiales poliméricos, hecho que permite asignar esta pequeña contribución a la aniquilación de dicha especie en el pegamento utilizado para el sellado de la fuente.

Priorizando la protección radiológica y considerando que en todas las fuentes la fracción de positrones disponibles para aniquilarse en la muestra es suficiente para llevar a cabo las medidas PALS en un tiempo razonable, se elige la fuente 3 como la más adecuada para las medidas de muestras tisulares que se realizarán en esta tesis.

4.4.2.2 Medidas PALS en tejidos

4.4.2.2.1 Muestras estudiadas

Las muestras tumorales fueron obtenidas de ratones *nude* que fueron inyectados subcutáneamente con suspensiones de células viables de adenocarcinoma de pulmón humano A549 en medio de cultivo Eagle's Minimal Essential Medium. Una vez que los tumores tuvieron 1–3 cm de diámetro, los ratones fueron sacrificados y los tumores

extraídos y fijados mediante distintos métodos. Se utilizaron muestras obtenidas de 6 ratones que serán llamadas, de aquí en adelante, T1 a T6.

Las muestras normales fueron extraídas de hígado de ratas y conservadas en formol. Las medidas en hígado se realizaron a partir del lóbulo superior hepático, que se cortó con un bisturí en 4 muestras de 5 mm de espesor (llamadas H1 a H4) que se secaron en desecador conteniendo sílica gel.

4.4.2.2 Estudios preliminares

Medida PALS de un tejido impregnado en ^{22}Na

El modo de trabajo más común en las medidas PALS es, como se ha mencionado, la utilización de una fuente de ^{22}Na y dos porciones equivalentes de la muestra arregladas a modo de sándwich. A fin de lograr una mejor interpretación de los resultados es deseable que las vidas medias características de aniquilación en la fuente presenten el mínimo solapamiento con las vidas medias propias de la muestra.

Las componentes de aniquilación de positrones en cada una de las fuentes preparadas fueron bien establecidas en la sección 4.4.2.1. En este punto interesa establecer las componentes de aniquilación de los positrones cuando se aniquilan únicamente en el material de interés.

Con el mencionado fin se preparó una *muestra tisular testigo* utilizando una porción del material a investigar fijado en formol y secado al aire que se goteó con algunos μCi de ^{22}Na y se dejó secar al aire nuevamente (no se utilizó la lámina soporte ni material de sellado). La elección de formol como método de conservación de esta muestra responde al hecho de que la fijación en solventes orgánicos es una estrategia

útil para preservar la morfología y la composición química del tejido y mantener de esta manera a la muestra en una condición cercana a su estado *in vivo*.

La muestra fue medida, envuelta en lámina de aluminio, en el equipo PALS. El resultado del ajuste del espectro resultante se presenta en la tabla 11.

Muestra	τ_1 (ps)	I_1 (%)	τ_2 (ps)	I_2 (%)	τ_3 (ps)	I_3 (%)
T4 testigo	199 (8)	50 (3)	490 (20)	39 (2)	1720 (30)	11,0 (4)

Tabla 11: Parámetros de aniquilación de positrones para una muestra tisular fijada en formol, impregnada con $^{22}\text{NaCl}$ y secada al aire.

Tres vidas medias caracterizan a la muestra testigo, hallazgo que es común a todas las muestras investigadas en el presente trabajo. La vida media más larga τ_3 (1500- 2200 ps) corresponde al proceso de *pick off* del *o-Ps* en cavidades grandes. La vida media corta (145- 225 ps) y la intermedia (350- 500 ps) que juntas dan cuenta de alrededor del 90 % del espectro están asociadas a la autoaniquilación del *p-Ps* (125 ps), a la aniquilación de positrones libres y a cortas vidas medias del *o-Ps* (*pick off* y reacciones químicas).

Con respecto a la factibilidad de extraer estas vidas medias en el caso de la medición de tejidos en el arreglo sándwich estándar se observa que las vidas medias más cortas que caracterizan al tejido no pueden resolverse de aquella que corresponde a la aniquilación del positrón en la lámina de kapton. Sin embargo sí será posible la evaluación de la componente de vida media larga de los tejidos. Con respecto a la amplitud de esta última componente habrá que tener en cuenta que está incrementada en una fracción fija y pequeña por la aniquilación en el pegamento de la fuente.

En esta tesis interesa determinar la componente de vida media larga τ_3 que, como ya se mencionó, está ligada a la probabilidad de procesos *pick off* del *o-Ps* en cavidades y puede ser asociada al tamaño de las mismas, brindando información

relevante sobre el sistema biológico bajo estudio. De esta manera, si bien en lo que sigue se especificarán las tres componentes observables en los experimentos, sólo se analizarán los parámetros τ_3 e I_3 como es usual en las aplicaciones PALS en biología.

A pesar de que ambas formas de trabajo, esto es la impregnación de las muestras con ^{22}Na o la medición de muestras utilizando una fuente estándar de ^{22}Na , son factibles de utilizarse para obtener τ_3 , se prefirió trabajar con una fuente de positrones en el arreglo sándwich estándar por cuestiones de costo del material radiactivo y de seguridad radiológica. Concerniente al costo, la actividad de ^{22}Na necesaria para el armado de la fuente (que es la misma para todas las medidas) es mucho menor que la requerida para impregnar tantas muestras como experimentos se realicen. Por otra parte, la impregnación de las muestras con ^{22}Na significa una mayor manipulación del material radiactivo y consecuente generación de residuos radiactivos (al menos tantos como muestras estudiadas). Ambas situaciones atentan contra la seguridad radiológica y se ven agravadas si se considera la larga vida media del ^{22}Na .

Medidas PALS en tejidos fijados por distintos métodos

Si bien parece deseable analizar las muestras tisulares en un estado lo más cercano a la situación *in vivo*, en este tipo de muestras aparece conveniente la realización de tratamientos de conservación tendientes a frenar los procesos de descomposición, de modo de independizar los resultados obtenidos del tiempo transcurrido a partir de la obtención de la misma. En lo que concierne a la literatura existente, en dos trabajos no se describen métodos de conservación [Eli 06, Liu 07] mientras que en el más reciente se estudian muestras fijadas en formol [Yan 09].

Los métodos de conservación disponibles alteran en distinto grado y de diferente manera las características propias de la muestra, por lo cual es interesante definir el método más adecuado para este tipo de iniciativas. Sería de interés también homologar el método de conservación a fin de facilitar la comparación de los resultados obtenidos en distintas investigaciones.

En el presente trabajo las muestras tisulares fueron sometidas a los tratamientos que se detallan a continuación:

1) Fijación en formol: este método, que preserva la morfología y composición química de la célula al reducir el contenido de agua y entonces las alteraciones *post mortem* del tejido, se realizó sumergiendo las muestras directamente en formol.

2) Inclusión en parafina: este método se realiza sumergiendo la muestra en solventes de polaridad decreciente y finalmente en parafina a los fines de sustituir el agua de los tejidos por esta última sustancia.

3) Desparafinización: este proceso, inverso al anterior, tiene por objetivo recuperar el contenido de agua de la muestra. Se lleva a cabo sumergiendo las muestras en solventes de polaridad creciente y finalmente en agua.

Dos muestras tratadas con cada uno de los mencionados métodos junto con dos porciones de la parafina utilizada para la inclusión fueron medidas utilizando el arreglo sándwich. Los espectros PALS resultantes se ajustaron satisfactoriamente con tres contribuciones exponenciales cuyas características se listan en la tabla 12.

En el caso de la parafina pura τ_3 es aproximadamente 2300 ps. Las muestras incluidas en parafina presentan un τ_3 del orden de un 10 % menor, lo que sugiere que la vida media en el tejido es menor que en la parafina. La baja resolución temporal del equipo hace imposible la separación de la vida media larga en más de una componente. Los resultados de las muestras desparafinadas hace dudar del éxito del tratamiento de

desparafinización. Finalmente los valores obtenidos para las muestras fijadas en formol son similares y consistentes con la muestra tisular testigo.

Muestra	Método de conservación	τ_1 (ps)	I_1 (%)	τ_2 (ps)	I_2 (%)	τ_3 (ps)	I_3 (%)
Parafina 1	-	200 (8)	61 (3)	444 (20)	30 (3)	2287 (33)	8,3 (2)
Parafina 2	-	223 (7)	69 (3)	487 (29)	23 (2)	2311 (7)	8,2 (2)
T5	Parafinización	176 (19)	30 (4)	375 (11)	57 (4)	2141 (20)	13,0 (2)
T6	Parafinización	181 (8)	59 (3)	426 (17)	33 (3)	2037 (29)	9,0 (2)
T5	Desparafinización	198 (5)	64 (2)	468 (14)	29 (2)	2169 (5)	7,0 (1)
T6	Desparafinización	192 (6)	51 (3)	420 (12)	37 (2)	1969 (17)	12,4 (2)
T1	Formol	225 (4)	65 (2)	476 (16)	26 (2)	1625 (21)	8,0 (2)
T2	Formol	175 (9)	35 (3)	394 (8)	56 (3)	1701 (23)	8,9 (2)

Tabla 12: Vidas medias y sus respectivas intensidades para muestras tisulares sometidas a distintos tratamientos: inclusión en parafina, desparafinización y fijación en formol.

Estos experimentos permiten concluir que, con el arreglo PALS utilizado, no es posible resolver individualmente los tiempos de vida media del *o*-Ps en la parafina y en los tejidos, situación que no puede revertirse mediante procesos de desparafinización.

Medidas PALS de tejidos con distinto grado de humedad

La fijación de las muestras tisulares en formol se logra por inmersión del material en el solvente. De esta manera, parece conveniente realizar medidas PALS en distintas condiciones de humedad de las muestras para evaluar cómo depende la vida media de aniquilación del positrón con dicho parámetro.

Como primer paso se midió una muestra tisular tumoral retirada del formol que se colocó sobre un papel absorbente a fin de retirar el exceso de solvente. La muestra húmeda fue medida por PALS utilizando una fuente de ^{22}Na y el espectro resultante fue ajustado satisfactoriamente con los parámetros de aniquilación presentados en la tabla 13.

Muestra	Grado de humedad	τ_1 (ps)	I_1 (%)	τ_2 (ps)	I_2 (%)	τ_3 (ps)	I_3 (%)
T4	Húmeda	213 (7)	55 (3)	508 (18)	36 (2)	1730 (31)	9,6 (4)

Tabla 13: Vidas medias y sus respectivas intensidades para una muestra tisular fijada en formol medida húmeda utilizando una fuente de ^{22}Na .

Luego de finalizar la medida y desarmar el arreglo sándwich se verificó la contaminación de la muestra con ^{22}Na proveniente de la fuente de positrones (a través de la lámina de kapton). De esta manera, la estrategia de medición de muestras húmedas fue abandonada y se investigaron distintos métodos de secado.

Una primera estrategia consistió en secar las muestras al aire. La evolución del secado fue seguida por inspección visual del retraimiento y cambio de color de los tejidos. El secado fue dado por finalizado cuando se observó constancia en dichos parámetros, situación que de manera característica llevó alrededor de una semana para este tipo de muestras.

Con el objetivo de acelerar los tiempos, se probó como segunda estrategia el secado de las muestras a 0,001 atmósferas de presión (por dos horas).

Los parámetros resultantes de las medidas PALS realizadas sobre las muestras secadas por ambos procedimientos son presentados en la tabla 14.

De la inspección de los parámetros de la tabla, se observa una modificación de la vida media τ_3 con el grado de humedad de la muestra lo que es consistente con la

observación de Jean *et al* en sus medidas con positrones lentos en tumores de piel [Jea 06]. Así, considerando al tejido “secado en aire” como el estado más representativo de la muestra “viva”, puede desprenderse de este estudio que presiones muy bajas dan como resultado muestras tisulares que no conservan los volúmenes libres propios del tejido en su estado normal. En vistas de esta observación, el resto de las medidas se hizo con muestras secadas al aire, aún cuando es el procedimiento que conlleva mayores tiempos de secado.

Muestra	Secado	τ_1 (ps)	I_1 (%)	τ_2 (ps)	I_2 (%)	τ_3 (ps)	I_3 (%)
T1	Aire	225 (4)	65 (2)	476 (16)	26 (2)	1625 (21)	8,0 (2)
T1	0,001 atmósferas	256 (19)	51 (10)	457 (35)	38 (10)	1931 (30)	11,0 (3)
T2	Aire	175 (9)	35 (3)	394 (8)	56 (3)	1701 (23)	8,9 (2)
T2	0,001 atmósferas	165 (4)	43 (2)	379 (5)	51 (2)	1795 (19)	6,6 (1)

Tabla 14: Vidas medias y sus respectivas intensidades para muestras tisulares secadas al aire (alrededor de una semana) y a 0,001 atmósferas (un par de horas).

Puede verse también que la vida media τ_3 aumenta con el grado de secado. Un comportamiento similar se observa al comparar los resultados obtenidos por Jean *et al* [Jea 06] en cáncer de piel (muestras medidas en alto vacío) con aquellos obtenidos por Liu *et al* [Liu 07] en muestras medidas con humedad ambiente, cuyos datos se consignan en la tabla 8. Más adelante se verá que este comportamiento, que podría parecer general, tiene excepciones.

4.4.2.2.3 Estudios en tejidos tumorales

Después de haber establecido que la fijación en formol de las muestras tisulares seguida por un secado en desecador son los tratamientos que menos alteran las

características de este tipo de muestras, vamos a analizar los resultados obtenidos sobre las muestras tumorales luego de los mencionados tratamientos.

En la tabla 15 se listan los parámetros de aniquilación obtenidos con cuatro muestras tumorales. También se consigna el radio de las cavidades donde se aniquila el *o*-Ps según el modelo de Tao- Eldrup.

Las vidas medias τ_3 aparecen con alguna dispersión respecto del valor medio $\langle \tau_3 \rangle = 1646$ ps lo cual puede ser asociado, según ya se ha discutido, con diferencias en el contenido de agua de las muestras. Por otro lado es esperable que las muestras tumorales presenten diferencias histológicas entre sí, lo que estaría contribuyendo a la dispersión de los resultados observada.

La caracterización que se puede hacer de los tumores a partir de estas medidas es que en ellos la aniquilación del *o*-Ps en cavidades de radio promedio 2,5 (1) Å ocurre con una amplitud del orden de 9 (1) %.

En la próxima sección se intentará determinar si la técnica PALS puede dar resultados menos dispersos en sistemas tisulares de mayor homogeneidad.

Muestra de tumor	Días de secado	τ_1 (ps)	I_1 (%)	τ_2 (ps)	I_2 (%)	τ_3 (ps)	I_3 (%)	Radio de la cavidad (Å)
T1	7	225 (4)	65 (2)	476 (16)	26 (2)	1625 (21)	8,0 (2)	2,5
T2	11	175 (9)	35 (3)	394 (8)	56 (3)	1701 (23)	8,8 (2)	2,6
T3	15	145 (23)	33 (4)	356 (11)	60 (4)	1537 (31)	7,6 (3)	2,4
T4 testigo	7	199 (8)	50 (3)	490 (20)	39 (2)	1720 (30)	11,0 (4)	2,6

Tabla 15: Vidas medias y sus respectivas intensidades para muestras de tumor de pulmón conservadas en formol y secadas por distintos períodos de tiempo de secado en desecador. La muestra T4 testigo fue secada al aire y medida con impregnación de ^{22}Na .

4.4.2.2.4 Estudios en tejidos normales

Como hemos mencionado, la utilización de pocas muestras en las previas investigaciones de tejidos mediante PALS constituye una limitación a la hora de evaluar la dispersión de los resultados obtenidos y la posibilidad de caracterizar mediante PALS a un dado tejido.

Con el fin de investigar la factibilidad de caracterización mediante PALS de muestras de histología homogénea, se realizaron medidas sobre secciones de hígado extraído de ratas y conservado en formol. Las medidas se realizaron a partir del lóbulo superior hepático, que se cortó con un bisturí en porciones de 5 mm de espesor que se secaron en desecador conteniendo sílica gel. Las muestras fueron estudiadas de a pares (porciones contiguas del lóbulo hepático) según el tiempo de secado, realizándose medidas de aniquilación de positrones luego de tiempos cortos de secado (2 a 6 días, según el caso) y luego de un mes adicional de secado.

En la tabla 16 se muestran los parámetros de aniquilación para las distintas muestras indicándose el período de secado en desecador. Los parámetros relevantes τ_3 e I_3 (círculos y triángulos respectivamente) se presentan en la figura 69 para cada una de las muestras del lóbulo hepático luego de cortos período de secado (símbolos llenos) y para tratamientos de secado prolongados (símbolos vacíos).

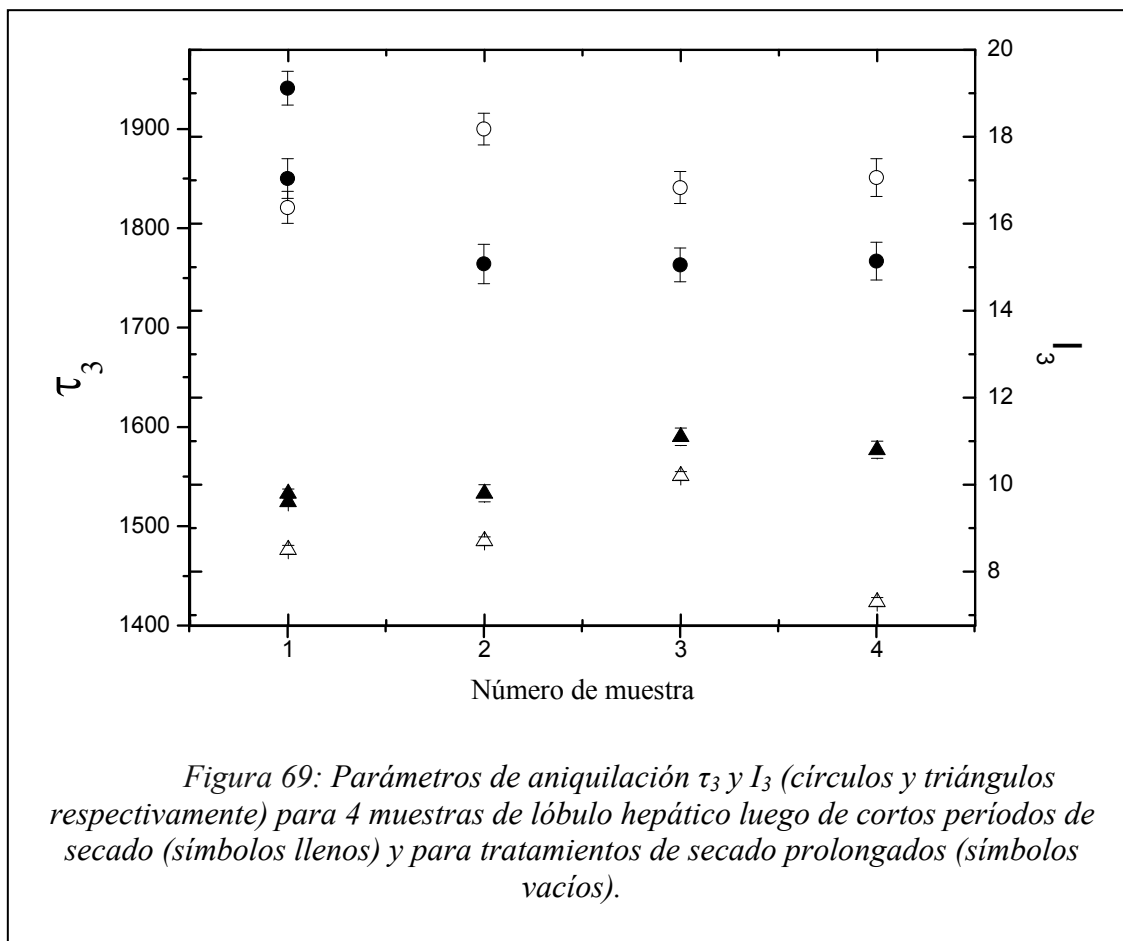
Observando los resultados experimentales obtenidos para tiempos cortos de secado aparece una discrepancia para los resultados de la muestra 1 y las restantes. Por

Muestra de lóbulo hepático	Días en el desecador	τ_1 (ps)	I_1 (%)	τ_2 (ps)	I_2 (%)	τ_3 (ps)	I_3 (%)
H1	2	155 (5)	35 (1)	385 (5)	55 (1)	1941 (17)	9,6 (1)
H1	5	154 (7)	35 (2)	376 (6)	56 (2)	1850 (20)	9,8 (1)
H2	3	143 (8)	32 (2)	360 (6)	59 (2)	1764 (20)	9,8 (2)
H3	5	156 (8)	31 (2)	371 (6)	58 (2)	1763 (17)	11,1 (2)
H4	6	145 (9)	31 (2)	368 (7)	59 (2)	1767 (19)	10,8 (2)
H1	20	156 (5)	37 (2)	369 (5)	55 (2)	1821 (16)	8,5 (1)
H2	24	155 (6)	35 (2)	373 (5)	56 (2)	1900 (16)	8,7 (1)
H3	30	148 (8)	30 (2)	368 (5)	60 (2)	1841 (16)	10,1 (1)
H4	36	167 (6)	40 (2)	371 (6)	53 (2)	1851 (19)	7,3 (1)

Tabla 16: Vidas medias y sus respectivas intensidades para muestras de lóbulo hepático conservadas en formol y secadas por distintos períodos de tiempo en desecador conteniendo sílica gel.

esta razón se repitió la medida de la muestra 1 con un secado corto adicional cuyo resultado se muestra en la tabla 16. Esta segunda medida continuó mostrando diferencias con las otras muestras.

Para los secados largos se observa en las muestras 2, 3 y 4 un incremento en τ_3 con el tiempo de secado, de igual manera que lo encontrado en los tejidos tumorales (sección 4.4.2.2.2.) y en la literatura [Jea 06, Liu 07]. En este caso, la muestra 1 vuelve a mostrar una anomalía en su comportamiento, ya que, en contra de lo esperado, la vida media decreció con el secado adicional. En todos los casos se observa que las amplitudes I_3 decrecen con el secado.



Las anomalías en el comportamiento de los parámetros PALS de la muestra 1 respecto a la observado en el resto de las muestras pueden explicarse en base a una diferencia en la cantidad de tejido conectivo presente en ellas ya que la muestra 1 fue tomada de la parte externa del lóbulo hepático y consecuentemente presenta más tejido conectivo que las demás, que provienen del interior de dicho lóbulo.

La constancia de la vida media del *o-Ps*, dentro del error experimental, muestra que PALS es una técnica viable para caracterizar los volúmenes libres en muestras hepáticas con valores que dependen del grado de humedad de la muestra. Para cortos períodos de secado al aire los resultados obtenidos indican que se puede caracterizar estas muestras con una vida media promedio de 1765 (19) ps y una amplitud del orden de 10,6 (2) %. Para secados más prolongados los valores característicos son de τ_3 1864 (17) y amplitud 8,7 (1) %. Para los volúmenes libres, el modelo de Tao-Eldrup predice

radios promedio de los huecos de 2,8 Å y 2,7 Å para la muestra 1 para cortos y largos tiempos de secado respectivamente y para las muestras del interior del lóbulo hepático 2,6 Å y 2,7 Å.

A los fines de progresar en una descripción de la naturaleza de las cavidades donde se aniquila el *o*-*Ps*, resulta interesante continuar los estudios de muestras tisulares en función del secado estableciendo un criterio para determinar el grado de humedad de las muestras. En este sentido parece útil analizar qué diferencias en las cavidades podrían dar lugar a los distintos comportamientos observados con la pérdida de humedad. Todo esto podría agregar elementos para la caracterización de las muestras tisulares.

Capítulo 5

Discusión y conclusiones

Se estudió la factibilidad de aplicación de tres técnicas de la física nuclear, la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas, la Espectroscopía Mössbauer y la Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de medición de vidas medias, a sistemas de interés biológico. Se hizo una revisión crítica de la literatura existente y se trataron de identificar los puntos débiles de los estudios realizados, con el fin de establecer el alcance real de dichas técnicas para investigar materia blanda. En base a dicho análisis se seleccionaron distintos sistemas de interés biológico que fueron estudiados como paradigma de las aplicaciones de las técnicas a materia blanda. Muchos de ellos habían sido abordados infructuosamente en estudios previos mientras otros nunca habían sido estudiados mediante estas técnicas. Los resultados obtenidos aportaron en muchos casos a la caracterización de los sistemas estudiados mientras que otros casos no se obtuvieron resultados concluyentes a partir de las medidas realizadas. En todos los casos los resultados fueron utilizados como base para discutir sobre las virtudes, debilidades y limitaciones experimentales de estas técnicas nucleares cuando se aplican a sistemas de interés en biología.

La aplicación de la técnica de Correlaciones Angulares Perturbadas al área de la biología data de medio siglo y ha resultado en casi dos centenas de trabajos publicados, en la mayoría de los cuales el aporte que los estudios hacen al conocimiento de los sistemas es poco claro. No obstante la técnica aporta al conocimiento de selectos sistemas bioinorgánicos del tipo metaloproteínas. En dichos sistemas, donde los átomos

metálicos se encuentran coordinados en sitios específicos de las biomoléculas, los estudios PAC se realizan luego de reemplazar el ión nativo por el átomo sonda PAC adecuado. En general, y especialmente en el estudio de metaloproteínas, una salvedad se impone a la hora de interpretar los resultados obtenidos: la necesidad de corroborar, mediante una técnica complementaria, la correcta localización de la sonda PAC. Este punto, aunque básico y de sentido común, está ausente en la mayoría de los trabajos conduciendo a interpretaciones erróneas de los sistemas en estudio

Con el objetivo de investigar sistemas donde la sonda PAC se encuentre en entornos del tipo de los sitios de las metaloproteínas pero que no conlleven la dificultad de reemplazar el ión nativo por la sonda PAC, se decidió investigar sistemas orgánicos sencillos del tipo metal- quelato donde el átomo sonda PAC se encuentra coordinado por el agente quelante, que en esta tesis fue el ácido dietiléntriaminopentaacético. Las sondas PAC utilizadas fueron el ^{111}In y el ^{181}Hf . Se investigó una solución comercial de ^{111}In -DTPA. Las medidas PAC resultaron en las esperadas interacciones dinámicas debidas al movimiento browniano a partir de las cuales no fue posible extraer información sobre el gradiente de campo eléctrico en el sitio de la sonda, aún cuando se hizo uso de estrategias tendientes a disminuir el movimiento difusional mediante un aumento de la viscosidad de la solución. Se estableció la existencia de dos interacciones atribuyéndose una al ^{111}In ligado al DTPA y la otra a sondas ligadas a moléculas más pequeñas. El origen en la solución de estas especies de menor volumen queda como una cuestión abierta. El congelamiento, mediante enfriamiento de la solución a 77 K, si bien elimina el carácter dinámico de las interacciones, muestra que las sondas están sujetas a una distribución del gradiente de campo eléctrico estático sin que se pueda establecer un gradiente de campo eléctrico característico del InDTPA. La medida del residuo seco resultante de evaporar la solución de ^{111}In DTPA muestra un comportamiento dinámico

que se asocia con los procesos de variación del estado de carga en torno de la sonda luego de la captura electrónica (*after effects*) que tampoco permiten establecer una interacción hiperfina característica del compuesto. Las dos interacciones dinámicas observadas aparecen como independientes de la composición química del compuesto, como se establece por comparación con una medida realizada en cloruro de indio seco. Con respecto a la utilización de la sonda ^{181}Hf , se obtuvo el compuesto de coordinación $\text{KHfDTPA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (dietiléntriaminopentaacetato de hafnio y potasio trihidrato) por síntesis química, el cual fue caracterizado en su estado cristalino, mediante la técnica PAC arrojando resultados compatibles con la estructura cristalográfica derivada de estudios de difracción de rayos X. La evolución térmica de este complejo se estudió mediante técnicas calorimétricas paralelamente con medidas PAC. De esta manera se caracterizaron también las interacciones hiperfinas en el sitio del hafnio para el compuesto de coordinación anhidro. Finalmente, la realización de experimentos control permitió interpretar correctamente los resultados PAC obtenidos por otros investigadores en este tipo de compuestos.

Las aplicaciones de la Espectroscopía Mössbauer a sistemas biológicos son variadas y bien conocidas debido a la ubicuidad del más popular de sus isótopos, el ^{57}Fe , en los seres vivos. En este caso es claro el aporte que dichos estudios realizan al establecimiento de los entornos de coordinación del hierro en ferroproteínas y proteínas de hierro azufre, entre otras biomoléculas. Sin embargo, una importante restricción se impone a la hora de investigar materia blanda mediante esta técnica: es necesario que la muestra tenga una determinada rigidez para que los espectros Mössbauer puedan obtenerse. Es por eso que al estudiar materia blanda con Espectroscopía Mössbauer, los esfuerzos están puestos en lograr condiciones de medida que cubran las necesidades experimentales pero que sean compatibles con la muestra biológica.

En esta tesis la Espectroscopía Mössbauer se utilizó para investigar los estados de oxidación de los átomos de hierro en un complejo de Fe-S estabilizado por glutatión (GSH) de estequiometría $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$ de importancia en el metabolismo redox celular. Estudios previos habían logrado obtener dicha especie por síntesis química, la cual se adaptó en vistas de obtener el complejo enriquecido en ^{57}Fe , $^{57}\text{Fe}\text{-Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$, necesario para las medidas Mössbauer. El sólido así obtenido se caracterizó por Espectroscopía Mössbauer a temperatura ambiente, resultando en tres especies de hierro, una de las cuales mostró parámetros hiperfinos que no se correspondían para los esperados en clusters $2\text{Fe}2\text{S}$. Este hallazgo se explicó en términos de una reacción incompleta o de una posible degradación del compuesto, hecho consistente con el tiempo transcurrido entre la síntesis y la medida. La disolución del sólido en una solución acuosa conteniendo glutatión en concentración celular se estudió por Espectroscopía Mössbauer a baja temperatura resultando en un espectro con una sola contribución que está en excelente acuerdo con la existencia de átomos de hierro en sitios equivalentes y con valencia (III) en complejos totalmente oxidados $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4]^{+2}$. La observación experimental de que el compuesto sintetizado se humedecía fácilmente cuando estaba expuesto a la atmósfera y los reportes sobre la degradación del $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$ en ausencia de exceso de glutatión, fueron el puntapié inicial para abordar estudios de la evolución de los espectros Mössbauer con la humidificación y con el secado. Estos experimentos, realizados a temperatura ambiente, mostraron una completa reversibilidad de los espectros Mössbauer y no evidenciaron asociación entre la degradación del complejo $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4$ y el grado de humedad del sólido. Finalmente se verificó, mediante una medida Mössbauer a baja temperatura, que es posible recuperar el complejo de interés $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{GS})_4]^{+2}$ si se disuelve el sólido en solución conteniendo glutatión, independientemente de la degradación que dicho sólido haya sufrido.

La aplicación de la técnica de Aniquilación de Positrones en el modo Medición de Vidas Medias (PALS) a sistemas biológicos data de casi cuatro décadas. Sin embargo, pocos son los trabajos que existen en la literatura y pocos los campos en los que su impacto ha sido notorio. La alta complejidad física y química que revisten los sistemas biológicos hace difícil su caracterización absoluta mediante el estudio de las vidas medias de positrones y de allí de las dimensiones de las cavidades nanométricas en ellos presentes. Sin embargo, la dependencia que presentan las características de aniquilación de positrones con la presión y la temperatura hacen de este tipo de estudios un campo fértil de aplicación de la técnica en materia blanda.

En esta tesis se trató de determinar la factibilidad de aplicación de la técnica PALS para determinar características de los volúmenes libres en tejidos. Mediante estudios preliminares se determinó que la fijación de los tejidos en formol seguida de su secado al aire es un método adecuado de preparación de muestras y se verificó que es posible realizar estudios de tejidos utilizando una fuente de positrones contenida en kapton. Se analizaron muestras tumorales que arrojaron resultados que, aunque dispersos, permitieron caracterizar estas muestras ampliamente heterogéneas con cavidades de radio promedio de 2,5 Å. Los resultados con muestras de histología más regular, obtenidas de hígado, mostraron menor dispersión y pudieron caracterizarse con cavidades de radio promedio de 2,7 Å. En la mayoría de las muestras se observó un aumento de las vidas medias con el tiempo de secado. En todos los casos se obtuvieron parámetros de aniquilación del *o*-*Ps* en cavidades que no difieren significativamente de los observados en otras investigaciones involucrando otros tumores y tejidos normales [Eli 06, Jea 06, Liu 07, Yan 09]. La utilización del modelo de Tao- Eldrup para obtener el radio de las cavidades a partir de las vidas medias del *o*-*Ps* en las mismas conlleva una pérdida de resolución a la hora de diferenciar tejidos a partir de los parámetros de

aniquilación encontrados. La alta complejidad física y química de las muestras tisulares significa un escollo a la hora de realizar una caracterización absoluta de dichos sistemas a partir de los volúmenes libres obtenidos mediante PALS. No obstante, la caracterización de las muestras relativa a modificaciones que puedan experimentar ya sea por medios externos o causas internas (tal es el caso de lo reportado por Elias *et al*, que relacionan la cantidad y dimensiones de las cavidades con el tiempo de evolución del tumor) aparece como una posibilidad prometedora de aplicación de la técnica PALS a este tipo de sistemas. Desde un punto de vista de investigación básica se destaca como una tarea importante la de establecer la naturaleza de las cavidades donde se produce la aniquilación ya que en los trabajos reportados no existe acuerdo en la asignación de dichas cavidades (intercelular, intermolecular o intramolecular).

Por último se concluye que el impacto de la información obtenida a partir de estas tres técnicas nucleares cuando son aplicadas a sistemas de interés en biología depende no sólo de la técnica en cuestión sino de la elección cuidadosa de sistemas de estudio que sean compatibles con las limitaciones particulares de cada técnica. La realización de medidas de caracterización complementarias resulta indispensable para arribar a conclusiones valederas y para posicionar a las técnicas como uno más de los múltiples métodos disponibles para estudiar sistemas de interés en biología.

Bibliografía

Aki 07: Y. Akiyama, Y. Shibahara, S. Takeda, Y. Izumi, Y. Honda, S. Tagawa, S. Nishigima. Analysis of swelling process of Protein by Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics **45**, 2031- 2037 (2007).

Aks 95 : Z.Z. Akselrod, B.A. Komissarova, G.K. Ryasny, E.N. Shirani, L.G. Shpinkova, A.A. Sorokin, V.N. Kulakov, S.M. Nikitin, A.N. Shirokov, S.G. Ermolenko. Time- differential Perturbed Angular Correlation studies of In- complexes used in nuclear medicine. J. Radioanal. Nucl. Chem. Letters 199 (5) 357-364 (1995)

Ama 09: Amaral, A.A., dos Silva, S.A., Carbonari, A., Lapolli, A.L.: Study of dynamic behavior of EDTA molecule in solution using perturbed gamma-gamma angular correlation spectroscopy. Paper presented at the 2009 International Nuclear Atomic Conference, Rio de Janeiro, Brasil, September 27 to October 2 (2009)

Bar: Química Bioinorgánica. Enrique J. Baran. Mc Graw Hill.

Bau 74: Bauer, R., Limkilde, P. and Glomset, O. Metal site structure in a protein studied by Differential Perturbed Angular Correlations. Physical Review Letters, 32 340 (1974).

Bau 76: Bauer, R., Limkilde, P., Johansen, J.T.: Low and high pH form of cadmium carbonic anhydrase determined by nuclear quadrupole interaction. *Biochemistry* 15, 334–342 (1976)

Bau 85: Bauer, R.: Perturbed angular correlation spectroscopy and its application to metal sites in proteins: possibilities and limitations. *Q. Rev. Biophys.* 18, 1–64 (1985)

Bel 79: Belkacem Djermouni and Hans J. Ache. Effect of temperatura and counterion on the micelle formation process studied by Positron Annihilation Techniques. *J. Phys. Chem.* 83, 2476 (1979)

Boc 99 Quantitative determination of a sodium dodecyl sulfate micellar radius through positron annihilation lifetime spectroscopy. Bockstahl, F and Duplâtre, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1999, 1, 2767-2772

Bod 83: Concluding remarks. Bodenstedt, E. *Hyperfine Interact.* 16, 1061–1068 (1983)

Bru 87: De Bruin, M., Bode, P., Wolterbeek, H.: Studies of trace element transport in plants using high resolution γ -ray spectroscopy and perturbed directional correlation measurements. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **110**, 365–372 (1987)

Cam 10: R. Cammack and F. MacMillan. Electron Magnetic Resonance of Iron- Sulfur proteins in electron- transfer chains: resolving complexity. *En Metals in Biology, Applications of High-Resolution EPR to Metalloenzymes* editado por G. Hanson y L. Berliner (2010).

Cha 08: C. Y. Chain, M. Ceolin, A. F. Pasquevich. PAC research in biology. *Hyperfine Interactions*, 181 (1-3) 99 (2008).

Cha 09 Aplicaciones PAC y PAS en Biología y Oncología. C.Y.Chain, M.G. de Bravo, M.R.Ceolín y.A. F. Pasquevich. *ANALES AFA* 19, 248 (2009).

Cha 10: C. Y. Chain y A. F. Pasquevich. Radioactive isotopes of Indium and their applications. *Advances in Materials Science Research*, Volume 2, Capítulo 6. Nova Science Publishers Inc.

Chu 74: Y. Chuang and S. J. Tao. *The Journal of Physical Chemistry*, 78, No. 73, 1974

Coh 76: Iron in the whole bacterial cells. Exploratory investigations. E.R.Bauminger, S.G.Cohen, E.Giberman, I. Nowick and S. Ofer. *J. de Physique*, Colloque C6, supplément au n° 12, Tome 37, Page C6-237 (1976)

Dan 99: E. Danielsen, H. V. Scheller, R. Bauer, L. Hemmingsen, M, J, Bjerrum and O. Hansson. Plastocyanin binding to photosystem I as a function of the charge state of the metal ion. Effect of metal site conformation. *Biochemistry* 38, 11531- 11540 (1999).

Das 03: Das, S.K., Saha, S.K.: Study of hafnium complexes by time differential perturbed angular correlation technique. *Radiochim. Acta* 91, 769–772 (2003)

Das 90: Das, S.K., Tomar, B.S., Prakash, S.: Perturbed angular correlation studies of the Hf-EDTA complex. *Polyhedron* 9, 2705–2708 (1990)

Dav 92: R. L. Davidovich, V. B. Logvinova and L. V. Teplukhina, Soviet Journal of Coordination Chemistry, 18, 580 (1992).

Deb 88: J. t. Derksen, J. D. Baldeschwieler, G. L. Scherphof. In vivo stability of ester- and ether- linked phospholipid- containing liposomes as measured by perturbed angular correlation spectroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9768- 9772 (1988).

Die 86 D.P.E. Dickson. Mössbauer Spectroscopy applied to biological systems. Hyperfine Interact. 27, 35-46 (1986)

Die 79: Belkacem Djermouni and Hans J. Ache. The Journal of Physical Chemistry, Vol. 83, No. 19, (1979)

Dub 99: Magnetic properties of human liver and brain ferritin. S.M.Dubiel, B. Zablotna-Rypien, J.B.Mackey and J.M.Williams. Eur. Biophys. J. 28, 263-267 (1999)

Dul 01: T. L. Dull, W. E. Frieze, and D. W. Gidley, J. N. Sun and A. F. Yee. Determination of Pore Size in Mesoporous Thin Films from the Annihilation Lifetime of Positronium. J. Phys. Chem. B 2001, 105, 4657-4662

Dun 90: The initial characterization of the iron environment in lipoxygenase by Mössbauer spectroscopy. W.R.Dunham, R.T.Carroll, J.F.Thompson, R.H.Sands y M.O.Funk.Jr. Eur. J. Biochem. 190 611-617 (1990)

Eck 11: B. Eckhart. Iron-sulfur clusters—new features in enzymes and synthetic models. *Hyperfine Interactions* 205, 139 (2011).

Eld 71: M. Eldrup. Positron Lifetimes in Water and Ice, and in Frozen Aqueous Solutions. Danish Atomic Energy Commission Research Establishment Risø. Risø Report No. 254 (1971).

Eli 06: Monitoring of tumour growth via the positronium lifetime method. M. M. Elias, Z. T. Al-Shiebani and A.H. Al-Mashhadani. *Int. J. Sci. Res.*16, 201-204 (2006).

Fee 84: Fee , J. A. et al, *Journal of Biological Chemistry* 1984, 259, 124-33

Fra 65: Frauenfelder H., R. M. Steffen “Alfa-, Beta- and Gamma-ray Spectroscopy”, K. Siegbahn (Hrsg.), NHPC, N Y (1965) p 997.

Gen 04: *Histología* (4^o ed.). Geneser, Ed. Méd. Panam., 2004.

Gle 84: Glennas, A., Rugstad, H.E.: Cadmiun uptake and metabolism in cultured cells. *Environ. Health Perspect.* 54, 45–50 (1984)

Gon 86: *Microscopic Methods in Metals*, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg (1986)

Gre: Greenwood N. N. and T. C. Gibb, *Mössbauer Spectroscopy*, Chapman & Hall, London (1971)

Güt 78: P. Gütlich, R. Link, A. Trautwein, Mössbauer Spectroscopy and Transition Metal Chemistry (Springer Verlag, Berlin, 1978).

Güt 11: Gütlich, P., Bill, E., Trautwein, A.X.: Mössbauer spectroscopy and transition metal chemistry. Springer, Berlin Heidelberg (2011)

Ham 79: Quantitative studies of ferritinlike iron in erythrocytes of thalassemia, sickle-cell anemia, and hemoglobin Hammersmith with Mössbauer spectroscopy. E. R. Bauminger, S. G. Cohen S. Ofer and E.A. Rachnilewitz. Proc. Natl. Acad Sci. USA 76, 939, (1979)

Han 76: Edward D. Handel, G. Graf, James C. Glass. Journal of the American Chemical Society **98**, 2360- 2361 (1976).

Han 80: E. D. Handel, G. Graf. Biophysical Journal **32** 697 (1980).

Hau 95: P. Hautojarvi and C. Corbel, in “Positron Spectroscopy of Solids”, North Holland, Amsterdam, 491- 532 (1995)

Hei 09: Heinz, U., Hemmingsen, L., Kiefer, M., Adolph, H.-W.: Structural adaptability of zinc binding sites: different structures in partially, fully, and heavy-metal loaded states. Chem. Eur. J. 15, 7350–7358 (2009)

Hem 01: L. Hemmingsen, C. Damblou, J. Antony, M. Jensen, H. W. Adolph, S. Wommer, G. C. K. Roberts and R. Bauer. Dynamics of mononuclear cadmium β -

lactamase revealed by the combination of NMR and PAC spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10329- 10335 (2001)

Hem 04: Hemmingsen, L., Sas, K.N., Danielsen, E.: Biological applications of perturbed angular correlations of γ -ray spectroscopy. *Chem. Rev.* 104(9), 4027–4062 (2004)

Hem 95: L. Hemmingsen, R. Bauer, M. J. Bjerrum, M. Zeppezauer, H. W. Adolph, G. Formicka and E. Cedergren- Zepperzauer. Cd- substituted horse liver alcohol dehydrogenase: catalytic site metal coordination geometry and protein conformation. *Biochemistry* 34, 7145- 7153 (1995).

Her 05: Protein dynamics: hydration and cavities. K. Heremans. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38 (8), 1157-65 (2005)

IAE 99: International Atomic Energy Agency Technical Document- 1228 (1999)

Ily 00: B. Ilyukhin, R. L. Davidovich, I. N. Samsonova, and L. V. Teplukhina. Eightfold-Coordinated Diethylenetriaminepentaacetates:Crystal Structures of $K[M(Dtpa)] \times 3H_2O$ (M= Zr or Hf) and $NH_4[Sn(Dtpa)] \times H_2O$. *Crystallography Reports* 45, 39- 43 (2000).

Ito 08: Y. Itoh, A. Shimazu, Y. Sadzuka, T. Sonobe, S. Itai. Novel method for stratum corneum pore size determination using positron annihilation lifetime spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 358 (2008) 91–95.

Ito 99: K. Ito, H. Nakanishi and Y. Ujihira. Extension of the Equation for the Annihilation Lifetime of ortho-Positronium at a Cavity Larger than 1 nm in Radius. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 4555-4558

Jac 76: Temperature Dependence of Positron Lifetimes in Carbonic Anhydrase. *JACS* 98, (1976)

Jea 06: Y.C. Jean, Y Li, G. Liu, H. Chen, J. Zhang and J. E. Gadzia. Applications of slow positrons to cancer research: Search for selectivity of positron annihilation to skin cancer. *Appl. Surf. Sci.* 252 (2006) 3166-3171.

Jea 77: Y. C. Jean and H. J. Ache. Studies of Molecular Association in Biological Systems by Positron Annihilation Techniques. *JACS* 1623 (1977).

Jea 82: Y. C. Jean and A. J. Hancock. Positron lifetime studies on phase transitions of phospholipids. *J. Chem. Phys.* 77, 5236 (1982).

Jea 88: Y. C. Jean and D. M. Schrader, in "Positron and Positronium Chemistry", Elsevier, Amsterdam.

Kam 05: A. A. Kamnev. Application of emission (^{57}Co) Mössbauer spectroscopy in bioscience. *J. Mol. Struct.* 744-747 161-167 (2005)

Kam 06: A. A. Kamnev, A. V. Tugarova, L. P. Antonyuk, P. A. Tarantilis, L. A. Kulicov, Y. D. Perfiliev, M. G. Polissiou and P. H. E Gardiner. Instrumental analysis of

bacterial cells using vibrational and emission Mössbauer spectroscopic techniques.
Analytica Chimica Acta 573-574 445-452 (2006)

Kar 64: E. Karlsson, E. Matthias y K. Siegbahn. *Perturbed Angular Correlations*.
North- Holland Publishing Company, Amsterdam (1964).

Kon 90: M. S. Konings, W. Dow, D. B. Love, K. N. Raymond, S. C. Quay and S. M.
Rocklage, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 1488-1491

Lei 68: T. K. Leipter, J. D. Baldeschwieler, D. A. Shirley. Applications of gamma ray
angular correlations to the study of biological macromolecules in solution. *Nature* 220,
907–909 (1968)

Ler: Lerma, Marco Vinicio Félix. "¿Qué es la aniquilación del positronio y para qué
sirve?". Disponible en

<http://www.teclagos.edu.mx/investigacion/archivos/ANILACION%20DE%20POSITRONES.pdf>

Ler 87: A. Lerf and T. Butz, *Hyperfine Interact.* 36 (1987) 275-370

Liu 07: G. Liu, H. Chen, L. Chakka, J. E. Gadzia and Y. C. Jean. Applications of
positron annihilation to dermatology and skin cancer. *Phys. stat. sol. (c)* 4, No. 10,
3912–3915 (2007)

Liu 95: Liu, J., Y. C. Jean, and Hsinjin Yang. "Free-Volume Hole Properties of Polymer Blends Probed by Positron Annihilation Spectroscopy: Miscibility." *Macromolecules* **28**, 5774-5779 (1995).

Ma 93: W. Ma, K. J. Hwang, V. H. Lee. Use of the gamma ray perturbed angular correlation (PAC) technique for monitoring liposomal phospholipid bilayer integrity. *Pharm. Res.* 10, 252- 257 (1993)

Mac 79: P. L. McMahon, G. Graf, J. C. Glass. The phase transition in phospholipids vesicles probed by the Positron Annihilation Lifetime Technique. *Phys. Lett.* 72 A, 324 (1979)

Mae 89: The Molecular Structure of Indium-DTPA. H.R.Maecke, A. Riesen and W. Ritter. *J. Nucl. Med.* 30: 1235-1239, 1989

Mas 81: Mascharak, P.K., Papaefthymiou, G.C., Frankel, R.B., Holm, R.H.: Evidence for the localized iron(III)/iron(II) oxidation state configuration as an intrinsic property of $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{SR})_4]^{3-}$ clusters. *J. Am. Chem. Soc.* 103(20), 6110–6116 (1981).

Mau 79: M. R. Mauk and R. C. Gamble, "Stability of lipid vesicles in tissues of the mouse: a x-ray perturbed angular correlation study," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 765–769 (1979).

Mea 69: Meares, C. F., Bryant, R. G., Baldeschwieler, J. D. and Shirley, D. A. Study of carbonic anhydrase using Perturbed Angular Correlations of Gamma Radiation. Proc. N. A. S. 64 1155 (1969).

Mee 06: F. Meersman, L. Smeller, K. Heremans. Protein stability and dynamics in the pressure–temperature plane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764 346–354 (2006).

Mog 95: O. E. Mogenson, *Positron Annihilation in Chemistry*, Springer- Verlag, Berlin 1995.

Mon 09: Pedro Montes-Navajas, Laura C. Damonte, and Hermenegildo García. Positron Annihilation Lifetimes in Cucurbiturils: Evidence of Internal Inclusion of Gold in CB[7]. *ChemPhysChem* 10, 812 – 816 (2009)

Nie 79: Nieminen, R. M., & Manninen, M. J. Positrons in imperfect solids: theory. *Topics in Current Physics*, 12, 145-195 (1979)

Nuc 12: *Nucleus* n° 51 (2012). Publicación del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (Cuba). Disponible online en www.cubaenergia.cu/publicaciones/nucleus

Nup 01 www.nupecc.org/iai2001/report/introduction.pdf

Osh 96: M. I. Oshtrakh, E. A. Kopelyan and V. A. Semionkin. Mössbauer and Positron Annihilation study of oxyhemoglobin exposed to gamma- rays and electrons. *Radiat. Phys. Chem.* **47**, 399-403 (1996).

Osh 99: Mössbauer and positron life-time study of oxyhemoglobin solution irradiated by electrons. M.I.Oshtrakh, V.A. Semionkin, E.A.Kopelyan and O.B.Milder. *Radiat. Phys. Chem.* **55** 549-554 (1999)

Ran 09: M. N. Chandrashekara, C. Ranganathaiah. Diffusion of permanent liquid dye molecules in human hair investigated by positron lifetime spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **69** 129–134 (2009).

Ran 10: M. N. Chandrashekara, C. Ranganathaiah. Chemical and photochemical degradation of human hair: A free- volume microprobe study. *J Photochem Photobiol B.* **101**, 286-94 (2010).

Rei 99: D. E. Reichert, J. S. Lewis, C. J. Anderson, *Coord. Chem. Rev.* **184** (1999) 3-66.

Ric 74: Richer, L., Graf, G. and Glass, J. *The Journal of Chemical Physics*, **61**, 396 (1974).

Rin 79: Rinneberg, H.H.: Application of perturbed angular correlations to chemistry and related areas of solid state physics. *At. Energy Rev.* **17**(2), 477–595 (1979)

Rob 05: Robbins and Cotran *PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE.* 7th Edition (2005).

Ros 05: Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular (4° ed.). Ross, Kaye y Pawlina, Ed. Méd Panam., 2005.

San 09: P. Sane, E. Salonen, E. Falck, J. Repakova, F. Tuomisto, J. M. Holopainen, and I. Vattulainen. Probing Biomembranes with Positrons. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 1810 (2009).

San 10 P. Sane, F. Tuomisto, S. K. Wiedmer, T. Nyman, I. Vattulainen, J. M. Holopainen: Temperature-induced structural transition in-situ in porcine lens — Changes observed in void size distribution. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798 (2010) 958–965.

San 11: P. Sane, F. Tuomisto and J.M. Holopainen. Void volume variations in contact lens polymers. *Cont Lens Anterior Eye* **34**, 2-6 (2011).

Sas 006 Sas, K.N., Kovács, L., Zsíros, O., Gombos, Z., Garab, G., Hemmingsen, L., Danielsen, E.: Fast cadmium inhibition of photosynthesis in cyanobacteria in vivo and in vitro studies using perturbed angular correlation of γ -rays. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 725–734 (2006)

Sas 06: K. N. Sas, A. Haldrup, L. Hemmingsen, E. Danielsen and L. H. Øgdenal. pH-dependent structural change of reduced spinach plastocyanin studied by perturbed angular correlation of γ -rays and dynamic light scattering. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11 (4) 409 (2006).

Sch 71: M. Schumacher, I. Borschert, H. Lanhoff. Z. Physik 246 396 (1971)

Sch 96 G. Schatz, A. Weidinger, Nucl. Condens. Matter Phys., John Wiley & Sons, Chichester, 1996.

Sch 93: R. Schubert , M. Joosa, M. Deicherb, R. Magerleb and J. Lasche. Destabilization of egg lecithin liposomes on the skin after topical application measured by perturbed $\gamma\gamma$ angular correlation spectroscopy (PAC) with ^{111}In . Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes 1150 (2), 161 (1993).

See 09: M. Seemann, K. Janthawornpong, J. Schweizer, L. Bottger, A. Janoschka, A. Ahrens-Botzong, E. Ngouamegne Tambou, Ol. Rotthaus, A. X. Trautwein, M. Rohmer and V. Schunemann. Isoprenoid Biosynthesis via the MEP Pathway: In Vivo Mössbauer Spectroscopy Identifies a $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ Center with Unusual Coordination Sphere in the LytB Protein. J. Am. Chem. Soc. 131, 13184- 13185 (2009)

Shp 98: Shpinkova, L.G., Kulakov, V.N., Sorokin, A.A., Ryasny, G.K., Komissarova, B.A., Nikitin, S.M.: Stability of ^{111}In -ligand complexes studied by TDPAC. Z. Naturforsch. 53a, 630–635 (1998)

Sie 62: R. E. Sievers and J. C. Bailar, J. Inorg. Chem. 1 (1962) 174–182

Ste 75: Steffen, R. M., K. Adler “The Electromagnetic Interaction in Nuclear Spectroscopy”, W. D. Hamilton (Hrsg.), NHPC, N Y (1975) p 583.

Sun 74: Sundberg, M.W., Meares, C.F., Goodwin, D.A., Diamanti, C.I.: Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA. *J. Med. Chem.* 17, 1304–1307 (1974)

Tao 72: S. J. Tao. Positronium Annihilation in Molecular Substances. *The Journal of Chemical Physics* 56 (11) 5499 (1972)

Trö 02: W. Tröger, B. Ctordecka, P. Faller, H. Decker and the ISOLDE collaboration. Coordination studies of the metal center of hemocyanin by $^{199\text{m}}\text{Hg}$ nuclear quadrupole interaction. *Z. Naturforsch* 57, 623- 627 (2002).

Tso 01: . E. Tsoulou, C.A. Kalfas and E.G.Sideris. Probing the irradiated DNA with the Perturbed Angular Correlation Method *Radiat. Res.* 156, 181-185 (2001)

Tso 03: E. Tsoulou, C.A. Kalfas and E.G.Sideris. Changes in DNA flexibility after irradiation with γ - rays and neutrons studied with the Perturbed Angular Correlation Method. *Radiation Research* 159, 33-39 (2003).

Vei 11: Veiga, A. et al, *Hyperfine Interactions*, 2011, 202, 107-115.

Ven 04: P. Venkateswara Rao and R. H. Holm. Synthetic Analogues of the Active Sites of Iron-Sulfur Proteins. *Chem. Rev.*, 104, 527-559 (2004).

Vér 79: Mössbauer Spectroscopy, A. Vértes et al, Elsevier Scientific Publishing 1979 New York

Wen 12: Wenbin; Li, Jingwei; Chain, Cecilia; Pasquevich, G. A; Pasquevich, A. F.; Cowan, James. Glutathione Complexed Fe-S Centers. Journal of the American Chemical Society 2012, 134 , 10745-10748 (2012).

Yan 09: S. H. Yang, C. Ballmann, and C. A. Quarles. Positron Spectroscopy Investigation of Normal Brain Section and Brain Section with Glioma Derived from a Rat Glioma Model. AIP Conf. Proc. 1099, 948 (2009).

Zha 94 Xiufang Zhang. Mössbauer spectroscopy in biomedical physics research. Hyperfine Interact. 91, 917- 921 (1994).

Apéndice

La interacción eléctrica

La energía electrostática W debida a la interacción de la densidad de carga nuclear $\rho(\vec{r})$ y el potencial electrostático $V(\vec{r})$ generado por cargas extranucleares está dada por:

$$W = \int_{vol} \rho(\vec{r})V(\vec{r})d^3r \quad (1)$$

donde $d^3\vec{r}$ es el elemento de volumen y \vec{r} es el vector posición de dicho elemento con coordenadas espaciales (x_1, x_2, x_3) .

La integral es evaluada sobre el volumen del núcleo. Suponiendo que el potencial electrostático $V(\vec{r})$ es una función que varía lentamente en la región nuclear, es posible aproximar el potencial realizando un desarrollo en serie del mismo en torno del origen de coordenadas, que se toma en el centro de masa del núcleo. Entonces haciendo este desarrollo y llamando V_{ij} a las componentes del tensor gradiente de campo

eléctrico $\frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial x_j}$ calculadas en el origen, tenemos:

$$V(\vec{r}) = V(0) + \vec{r}(\vec{\nabla}V)_{r=0} + \frac{1}{2} \sum_{i,j} x_i x_j V_{ij} + \dots \quad (2)$$

Reemplazando (2) en (1) podemos establecer que:

$$W = V(0)q - \vec{E}(0)\vec{p} + \frac{1}{2} \int_{vol} \rho(\vec{r}) \sum_{i,j} x_i x_j V_{ij} d^3r + \dots$$

donde

q es carga del núcleo

\vec{p} es el momento dipolar del núcleo

$\vec{E}(0)$ es el campo eléctrico en el origen

El primer término, asociado con el momento monopolar nuclear q , corresponde a la energía electrostática total del núcleo como si fuera una carga puntual. Dicho término no será considerado de aquí en adelante ya que afecta por igual a todos los niveles nucleares. El segundo término, donde aparece el momento dipolar eléctrico nuclear, es nulo en los estados estacionarios ya que los estados nucleares tienen paridad definida.

Entonces la matriz simétrica V_{ij} de 3x3 puede ser diagonalizable por una elección adecuada de los ejes coordenados. Después de la diagonalización uno obtiene:

$$W = \frac{1}{2} \sum_i V_{ii} \int \rho(\vec{r}) x_i^2 d^3r$$

$$= \frac{1}{6} \sum_i V_{ii} \int \rho(\vec{r}) r^2 d^3r + \frac{1}{2} \sum_i V_{ii} \int \rho(\vec{r}) \left(x_i^2 - \frac{r^2}{3} \right) d^3r$$

donde se usó que $r^2 = x_1^2 + x_2^2 + x_3^2$.

La separación en dos términos se explica más abajo.

El potencial electrostático $V(\vec{r})$ obedece la ecuación de Poisson. En el núcleo se tiene que

$$\vec{\nabla}^2 V(0) = \sum_i V_{ii} = \frac{e}{\epsilon_0} |\Psi(0)|^2$$

donde $-e|\Psi(0)|^2$ es la densidad de carga y $|\Psi(0)|^2$ es la densidad de probabilidad de electrones (s) en el núcleo. Entonces obtenemos que:

$$W = E_C + E_Q$$

Donde

$$E_c = \frac{1}{6} \frac{e}{\epsilon_0} |\Psi(0)|^2 \int \rho(\vec{r}) r^2 d^3r$$

$$E_Q = \frac{1}{2} \sum_i V_{ii} \int \rho(\vec{r}) \left(x_i^2 - \frac{r^2}{3} \right) d^3r$$

a) El término monopolar E_c

Vemos que el término monopolar depende solamente del valor medio del radio nuclear al cuadrado $\langle r^2 \rangle$.

$$\langle r^2 \rangle = \frac{1}{Z.e} \int \rho(\vec{r}) r^2 d^3r$$

E_c produce un corrimiento distinto de la energía de cada nivel nuclear. Entonces este término monopolar describe la interacción electrostática de un *núcleo extendido* con los electrones en el sitio nuclear. El término puede ser escrito como:

$$E_c = \frac{1}{6} \frac{e^2}{\epsilon_0} |\Psi(0)|^2 Z \langle r^2 \rangle$$

Este término es responsable del corrimiento isomérico observado en el efecto Mössbauer.

En un experimento Mössbauer las diferencias en las energías monopulares causan un corrimiento en la resonancia. Para una fuente en movimiento S la energía del rayo gama debida a la transición desde el estado excitado e al estado fundamental g es:

$$\hbar\omega(S) = \hbar\omega_0 \left(1 + \frac{v}{c} \right) + \frac{1}{6} \frac{e^2}{\epsilon_0} |\Psi_S(0)|^2 Z \left(\langle r^2_e \rangle - \langle r^2_g \rangle \right)$$

El primer término es la energía de transición modificada por el corrimiento Doppler debido al movimiento de la fuente y el segundo término es la energía monopolar del núcleo en el estado excitado menos aquella en el estado fundamental.

Para un absorbente estacionario A la energía necesaria para excitar al núcleo desde su estado fundamental al estado Mössbauer es:

$$\hbar\omega(A) = \hbar\omega_0 + \frac{1}{6} \frac{e^2}{\epsilon_0} |\Psi_A(0)|^2 Z (\langle r_e^2 \rangle - \langle r_g^2 \rangle)$$

La absorción resonante ocurre si $\omega(S) = \omega(A)$. En tal caso la velocidad de la fuente es

$$v_{res} = \frac{Z}{6} \frac{e^2 c}{\epsilon_0 \hbar \omega_0} \left[|\Psi_A(0)|^2 - |\Psi_S(0)|^2 \right] (\langle r_e^2 \rangle - \langle r_g^2 \rangle)$$

v_{res} es llamado el corrimiento isomérico y es frecuentemente designada como δ en la literatura Mössbauer.

b) La interacción cuadrupolar eléctrica E_Q .

Considerando la expresión de la definición de las componentes Q_{ii} del tensor momento cuadrupolar nuclear:

$$eQ_{ii} = \int_{vol} \rho(\vec{r}) (3x_i^2 - r^2) d^3\vec{r}$$

La energía de interacción cuadrupolar E_Q puede ser expresada como

$$E_Q = \frac{1}{6} e \sum_i V_{ii} Q_{ii}$$

En lo siguiente discutiremos los términos V_{ii} que contribuyen a la traza:

$$\vec{\nabla}^2 V(0) = \sum_i V_{ii}$$

$$V_{ii} = V'_{ii} + \frac{1}{3} \vec{\nabla}^2 V(0)$$

La matriz V'_{ii} definida por esta ecuación tiene traza nula y representa la contribución al gradiente de campo eléctrico de las cargas externas al núcleo. El

segundo término representa la contribución al gradiente de campo eléctrico de los electrones en el núcleo. Si sustituimos esta última expresión en la de la energía E_Q vemos que la porción $\frac{1}{3}\vec{\nabla}^2 V(0)$ no contribuye a E_Q ya que la suma de las Q_{ii} es cero.

Nos queda:

$$E_Q = \frac{1}{6}e \sum_i V'_{ii} Q_{ii}$$

De esta manera, la interacción cuadrupolar incluye solamente la interacción del núcleo con el gradiente de campo eléctrico producido por las cargas externas a él (de aquí en más denotaremos V_{ii}).

Por otra parte como $\sum_i V_{ii} = 0$ el gradiente de campo eléctrico es completamente descrito por dos parámetros. Con una apropiada elección del sistema de ejes principales, uno puede tener $|V_{zz}| \geq |V_{yy}| \geq |V_{xx}|$.

Generalmente se elige describir el gradiente de campo eléctrico por la componente V_{zz} y el parámetro de asimetría η :

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}$$

De forma que η es siempre mayor o igual que 0 y menor o igual a 1.

Reemplazando el momento cuadrupolar clásico por el operador momento cuadrupolar en la expresión de la energía de interacción E_Q se obtiene el hamiltoniano:

$$\hat{H} = \frac{e}{6} \sum_i V_{ii} \hat{Q}_{ii}$$

El gradiente de campo eléctrico V_{ii} se tendrá en cuenta de forma clásica.

El hamiltoniano anterior se puede transformar, mediante el teorema de Wigner-Eckart [Sli 80] en:

$$\hat{H} = \frac{eV_{zz}Q}{4I(2I-1)} [3I_z^2 - I^2 + \eta(I_x^2 - I_y^2)] \quad (3)$$

donde I^2 , I_x , I_y y I_z son magnitudes de espín nuclear.

Para η distinto de cero, los componentes E_Q del hamiltoniano no pueden ser calculados analíticamente. Una solución analítica de (3) puede ser obtenida para el caso $I=3/2$ que es el caso del isótopo Mössbauer ^{57}Fe donde aparece la transición de $I=3/2$ a $I=1/2$. Las energías asociadas con los distintos subniveles magnéticos caracterizados por el número cuántico m son:

$$E_m = \frac{eV_{zz}Q}{4I(2I-1)} (3m^2 - I(I+1)) \sqrt{1 + \frac{\eta^2}{3}}$$

Así, el nivel de energía $I=3/2$ se divide en dos subniveles ($m = \pm 3/2$ y $m = \pm 1/2$).

Vemos que

$$E_{\pm 3/2} = \frac{eV_{zz}Q}{4} \sqrt{1 + \frac{\eta^2}{3}}$$

$$E_{\pm 1/2} = -\frac{eV_{zz}Q}{4} \sqrt{1 + \frac{\eta^2}{3}}$$

Esto lleva a una diferencia de energía para el doblete Mössbauer de

$$\Delta = \frac{eV_{zz}Q}{2} \sqrt{1 + \frac{\eta^2}{3}}$$

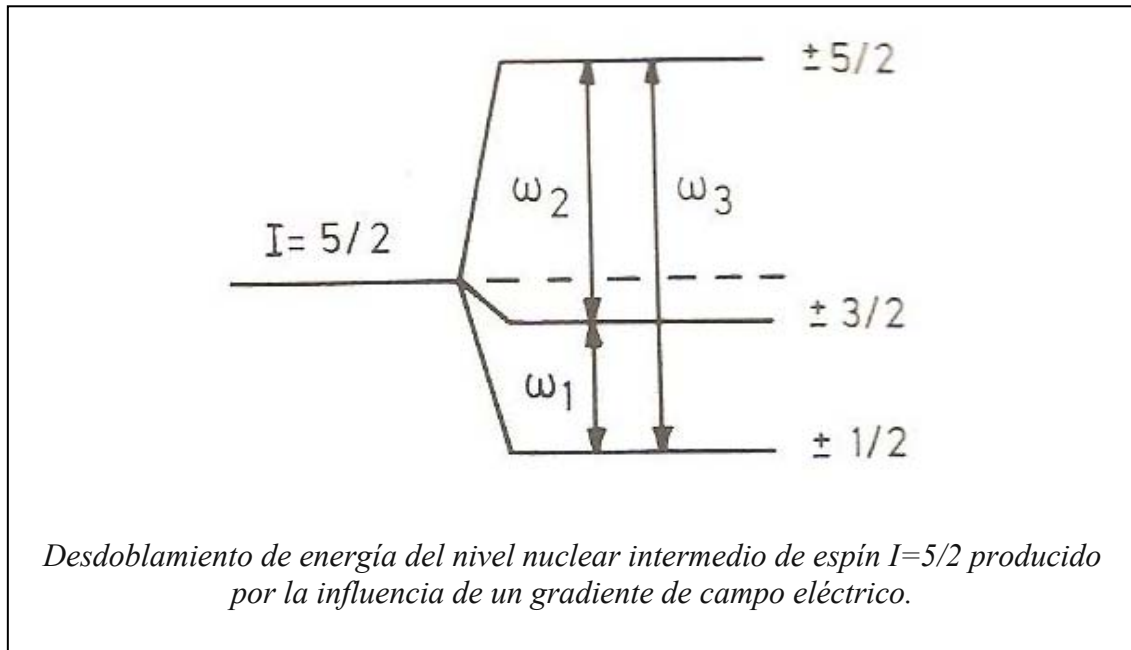
También podemos considerar el desdoblamiento de un estado nuclear de momento cuadrupolar Q y espín $I=5/2$ bajo la influencia de un gradiente de campo eléctrico axialmente simétrico. En este caso las energías de interacción de los subniveles asociados con números cuánticos m son:

$$E_m = \frac{eV_{zz}Q}{4I(2I-1)} (3m^2 - I(I+1))$$

definiendo la frecuencia cuadrupolar ω_Q como:

$$\omega_Q = \frac{eV_{zz}Q}{4I(2I-1)\hbar}$$

de donde



$$E_{\pm 5/2} = 10\hbar\omega_Q$$

$$E_{\pm 3/2} = -2\hbar\omega_Q$$

$$E_{\pm 1/2} = -8\hbar\omega_Q$$

Este desdoblamiento se muestra esquemáticamente en la figura. Así, las frecuencias de transición ω_1 , ω_2 y ω_3 son:

$$\omega_1 = \frac{E_{\pm 3/2} - E_{\pm 1/2}}{\hbar} = 6\omega_Q$$

$$\omega_2 = \frac{E_{\pm 5/2} - E_{\pm 3/2}}{\hbar} = 12\omega_Q$$

$$\omega_3 = \frac{E_{\pm 5/2} - E_{\pm 1/2}}{\hbar} = 18\omega_Q$$

Vemos que las frecuencias de transición $\omega_1 : \omega_2 : \omega_3$ están en una relación 1:2:3.

Sli 80: Principles of Magnetic Resonance. C. P. Slichter. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1980).