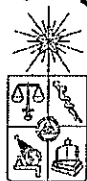


UCH-FC
MAG-Q
M 971
C 1



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Laboratorio de Físicoquímica Molecular

Distribución, orientación promedio y dinámica molecular del ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) disuelto en bicapas lipídicas

Daniel Esteban Muñoz Masson

Profesor: Boris E. Weiss López

Santiago, enero de 2014

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

Daniel Esteban Muñoz Mason

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Químicas con mención en Físicoquímica, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 3 de enero 2014

Director de Tesis:

Dr. Boris Weiss



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Paul Jara, Presidente



Dr. Eduardo Soto



Dr. Ramiro Araya



*Dedico este trabajo a todos quienes me han apoyado tanto directa como indirectamente,
V́ctor, Rodrigo, "Nano" y sobre todo a mi Profesor de Tesis, Boris.*

*A mis grandes amigos, Nicolás, Cristian, quienes me han acompañado en estos duros tiempos,
de crisis, de crecimiento. Y a todos aquellos que me han acompañado.*

*"Las investigaciones científicas son una especie de guerra, llevada a cabo en el armario o en
el diván frente a todos los contemporáneos y predecesores de cada uno. A menudo he ganado
una victoria sencilla, cuando estaba medio dormido, pero con mayor frecuencia encontré, al
estar totalmente despierto, que el enemigo todavía me llevaba ventaja cuando yo pensaba que lo
tenía arinconado- y todo esto, ya ve, lo mantiene a uno vivo"*

Thomas Young

1 Índice

1	ÍNDICE.....	5
2	RESUMEN.....	7
3	ABSTRACT.....	8
4	INTRODUCCIÓN.....	9
4.1	HERBICIDAS.....	9
4.1.1	<i>Antecedentes Históricos</i>	9
4.1.2	<i>Toxicidad</i>	10
4.2	CRISTALES LÍQUIDOS.....	13
4.2.1	<i>Cristales Líquidos Liótropos</i>	14
4.2.2	<i>Cristales Líquidos Liótropos Nemáticos</i>	17
4.3	ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	19
4.3.1	<i>Espines nucleares, momento angular de espín y niveles de energía</i>	19
4.3.2	<i>Interacción Escalar, Dipolar y Cuadrupolar</i>	23
4.3.3	<i>Procesos de Relajación</i>	29
4.3.4	<i>Medición de T_1: experimento "inversion recovery"</i>	33
4.3.5	<i>Parámetros de Orden</i>	35
4.4	DINÁMICA MOLECULAR (DM).....	37
4.4.1	<i>Mecánica Molecular y campo de fuerza</i>	37
4.4.2	<i>Análisis de Resultados</i>	40
5	HIPÓTESIS.....	43
6	OBJETIVOS.....	43
6.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	43
6.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	43

7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
7.1	SÍNTESIS DE 2,4-D-H ₃ Y 2,4-D-D ₃	44
7.2	PREPARACIÓN DE LAS MESOFASES.....	45
7.3	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	46
7.4	DINÁMICA MOLECULAR.....	47
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
8.1	SÍNTESIS DE 2,4-D-H ₃ Y 2,4-D-D ₃	50
8.2	ESPECTROSCOPIA RMN	54
8.3	DINÁMICA MOLECULAR.....	60
9	CONCLUSIONES	76
10	AGRADECIMIENTOS	77
11	APÉNDICE	78
11.1	PARÁMETROS USADOS PARA LA SIMULACIÓN.	78
11.2	SCRIPT.....	80
11.3	REPRODUCIBILIDAD	82
12	BIBLIOGRAFÍA.....	83

2 *Resumen*

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), es un potente herbicida utilizado en el control de malezas. Actualmente el 2,4-D es el herbicida más usado a nivel mundial. Además estudios recientes han demostrado que 2,4-D, es un potente carcinógeno. La difusión pasiva de moléculas biológicamente activas a través de las membranas presentes en los seres vivos, incluyendo la membrana celular, suele ser un factor gravitante en la efectividad de los procesos en que éstas participan. Un mejor conocimiento acerca de los efectos del herbicida en la estructura de la membrana, podría entregar importante información, tanto para una mejor comprensión de su mecanismo de acción, como para diseñar nuevas estructuras menos tóxicas. En esta tesis se investigó la distribución, dinámica, orientación promedio e interacciones del 2,4-D disuelto en un modelo simple de membrana biológica, en este caso cristales líquidos liótropos nemáticos (CLLN), que contienen una mezcla natural de fosfolípidos y ácidos grasos. Para este fin, se utilizaron herramientas tanto teóricas como experimentales. Experimentalmente, empleando resonancia magnética nuclear de deuterio (^2H -RMN), se midieron los desdoblamientos cuadrupolares y tiempos de relajación longitudinal de 2,4-D y otras especies deuteradas en la solución. Teóricamente, se realizaron simulaciones computacionales de la evolución del sistema en el tiempo, empleando Dinámica Molecular (DM). Se concluye que 2,4-D se incorpora al interior del agregado, y se distribuye fundamentalmente en la región interior de la interfase, orientado, en promedio, con la parte polar de la molécula en dirección del solvente, y con la parte apolar orientada hacia el interior de la zona hidrofóbica. Además de tener una gran afinidad por la interfase se encontró que 2,4-D aumenta el grado de alineamiento con el campo magnético. Esta observación sugiere que el método de acción como agente carcinógeno posiblemente no es por ingreso a la célula e interactuando con el material genético, sino que es por medio de la disminución de la plasticidad de la membrana.

3 Abstract

2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is a potent herbicide used for weed control. Currently, 2,4-D is the most widely used herbicide worldwide. Recent studies have shown that 2,4-D, is a potent carcinogen, which is possibly due to damage to the genetic material. Passive diffusion of biologically active molecules across membranes present in living organisms, including the cell membrane, is often a crucial factor in the effectiveness of the processes involving them. An increased knowledge about the effects of 2,4-D on the structure of cell membranes, may provide important information to understand their mechanism of action, as well as to design new less hazardous herbicides. In this thesis, an investigation about the distribution, average orientation, dynamics and interactions of 2,4-D dissolved in a simple model of biological membrane, a lyotropic nematic liquid crystals containing a natural mixture of phospholipids and fatty acids. To this end, we used both theoretical and experimental tools. Experimentally, deuterium quadrupole splittings and longitudinal relaxation times were measured in selectively deuterated derivatives, using deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy ($^2\text{H-NMR}$). Theoretically, computer simulations were performed on the evolution of the system over time, using Molecular Dynamics (DM). It was found that 2,4-D is strongly associated to the bilayer, distributed at the inner part of the interface, oriented, on average, with the polar side towards the aqueous phase and the non-polar part toward the interior of the hydrophobic region. Besides its great affinity for the membrane, 2,4-D has the ability to cross the bilayer, which is should be a condition to suggest a mechanism of action directly affecting the genetic material.

4 *Introducción*

4.1 *Herbicidas*

Los herbicidas son un tipo de pesticida utilizados para destruir las plantas no deseadas (terrestres o acuáticas), mal llamadas malas hierbas y/o *maleza*. Estos se clasifican en dos amplias categorías: inorgánicos (por ejemplo, sulfato de cobre, clorato de sodio y arsenito de sodio) y orgánicos (por ejemplo, compuestos que contengan grupos clorofenoxi, dinitrofenoles, bupiridilo, carbamatos, y amidas). Históricamente, los compuestos inorgánicos fueron los primeros utilizados. Han existido esfuerzos continuos para sintetizar herbicidas cada vez más selectivos, que afecten solo ciertas hierbas específicas (malas o *malezas*), y dejen intacto al resto de las plantas circundantes.

4.1.1 *Antecedentes Históricos*

En la década 1890-1900 se produjo la introducción de aerosoles para el control de malezas de hoja ancha en cultivos de cereales, y también se realizaron los primeros esfuerzos, por el Cuerpo de Ingenieros del Ejército de EE.UU., para controlar las plantas acuáticas en las vías fluviales, con arsenito sódico. En 1925 clorato de sodio (que se aplica directamente al suelo) se utilizó por primera vez para matar las *malas hierbas*. La primera importación (desde Francia) de nitrocresilato de sodio, como el primer herbicida selectivo, fue en 1934. El año 1945 fue testigo de la introducción de los herbicidas orgánicos y el advenimiento del 2,4-D (ácido 2,5-diclorofenoxiacético), el cual propicio el desarrollo del 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético). Durante los años 1965 a 1970, las fuerzas militares de Estados Unidos utilizaban el 2,4,5-T (Silvex) y materiales relacionados como defoliantes en Vietnam, sin saber que un subproducto de la síntesis de 2,4,5-T era el 2,3,7,8-tetraclorodibenzodioxina (dioxina), una sustancia sumamente tóxica. Todavía hay debate sobre el alcance de los efectos perjudiciales sufridos por los aviadores, soldados y civiles que fueron expuestos a este

material. La dioxina estuvo presente en concentraciones de 2 ppm (mg / kg de muestra) en algunas de las muestras seleccionadas de 2,4,5-T (llamado agente naranja), pero otras muestras contenían incluso más de 30 ppm del sub-producto. (Cox, 2005)

4.1.2 Toxicidad

Finalmente se demostró la toxicidad de las dioxinas en conejillos de indias, el valor para la DL₅₀ que en toxicología corresponde a los miligramos de una sustancia por kilogramo de peso del animal necesarios para matar al 50% de la población fue de 1 ppb o 1 µg, un valor de toxicidad extraordinariamente alto.

A continuación se muestra una tabla con las principales características de algunos herbicidas

Tabla 1 CARACTERÍSTICAS DE HERBICIDAS REPRESENTATIVOS DE LA INDUSTRIA (Cobb & Reade, 2010)

Herbicida (tipo)	Control / Propósito	Toxicidad aguda DL ₅₀ mg / kg
2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	Herbicida de uso sistemático	300-1000: ratas, conejillo de indias y conejos
Acetocloro	El control de hierbas anuales, más algunas malezas de hoja ancha. Cultivos tolerantes son el maíz, la soja, el maní, caña de azúcar.	2953: ratas
Amitrol (triazina)	Las malas hierbas de hojas anchas y gramíneas en zonas no cultivadas, presentan una baja toxicidad.	> 5000: ratas macho
Ácido arsénico (inorgánico)	Plantaciones de algodón	48: rata joven 100: ratas viejas
Atrazina	Ampliamente utilizado herbicida selectivo de hoja ancha y malezas gramíneas.	sin efectos negativos en ratas y perros con dieta de 25 ppm
Dinosep(dinitrofenol)	El control de las plantas de semillero, no afecta a malas hierbas perennes, excepto con tratamientos repetidos. Aplicable a una amplia variedad de cultivos, excepto crucíferas.	58: ratas

Dicuat (dipiridil)	Herbicida acuático	230: ratas
Diuron (carbamato)	Los mejores precios y latifoliadas y malas hierbas en el algodón, la caña de azúcar, etc.	3400: ratas
Glifosato	Herbicidas de amplio espectro utilizado en los cultivos, no cultivables, el control de malezas	> 5000 mg Conejos
Metolachlor	Herbicida selectivo utilizado para controlar gramíneas, chufa, maíz, algodón, maní y otros cultivos	2780: Rata
Paraquat (dipiridil)	El control de malezas durante para el establecimiento de los cultivos de semillas de pasto	138: ratas macho
Propanil (amida aromática)	Las gramíneas y malezas de hoja ancha en ciertos cultivos de trigo y el arroz	1870: las ratas

Dinitrofenoles (como sales de metales alcalinos o sales de amina alifáticos) han sido utilizados en el control de *malezas*. La exposición humana a estos compuestos produce diversos malestares como: náuseas, malestar gástrico, respiración rápida, taquicardia, cianosis, incluso la muerte.

El Paraquat y Dicuat son los ejemplos más conocidos de compuestos bipiridilo. Estos compuestos parecen actuar a través de un mecanismo de radicales libres, privando a las plantas de un agente reductor esencial. Estos compuestos son peligrosos para los seres humanos. Cerca de 200 muertes por envenenamiento accidental se produjeron en la década de 1960. Las autopsias desarrolladas en las víctimas mostraron daño al pulmón, el hígado y los riñones. Paraquat tiende a concentrarse en el riñón, la acumulación en el tiempo de cantidades tóxicas termina provocando un severo daño (Cobb & Reade, 2010).

Propanil es uno de un grupo de herbicidas que contienen grupos funcionales del tipo amidas (hecho de anilina tratada con ácidos orgánicos), y se utiliza ampliamente para controlar las malas hierbas en cultivos de arroz. El arroz contiene una enzima que hidroliza el Propanil a 3,4-dicloroanilina y ácido propiónico, lo cual la hace resistente al herbicida (Cobb & Reade, 2010). Malas hierbas, que carecen de esta enzima, se ven afectadas negativamente por

este. (Las células del hígado de mamíferos también tienen una enzima que cataliza ésta hidrólisis.)

Los efectos de las trazas de los herbicidas son una preocupación importante. Por ejemplo, el uso de Silvex fue cancelado por la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (EPA) en 1979 debido a que el herbicida contenía dioxinas, como se discutió anteriormente, un agente extraordinariamente tóxico. Sin embargo, el Cuerpo de Ingenieros del Ejército argumentó en contra de la cancelación, señalando los beneficios económicos de este. La suma total de los beneficios del control de malezas por Silvex fueron aproximadamente de 40 millones de dólares, y la relación beneficio-costos fue de aproximadamente 11 a 1. Estas cifras se ven opacadas al compararlas con los costos no evaluados de los daños producidos por la presencia de dioxina en el ambiente, cuyos efectos adversos aún están siendo evaluados (Cobb & Reade, 2010)

En el año 2000, el mercado mundial gastó unos 31 mil millones de dólares para la protección de cultivos, pero probablemente esta cifra no va a crecer en un futuro próximo. Los herbicidas se venden como formulaciones especiales, y su uso en Estados Unidos se produce sólo después de numerosas pruebas y la aprobación gubernamental. Aunque se están desarrollando nuevos productos químicos, el estancamiento del mercado de los herbicidas se ha traducido en una reducción en el número de empresas agroquímicas. El número de nuevos herbicidas que estará disponible en el futuro probablemente disminuirá a medida que se endurezcan los controles de calidad y salgan a la luz nuevos descubrimientos respecto de la toxicidad de estos. (Cobb & Reade, 2010)

El modo de acción de muchos herbicidas es por acción directa sobre la célula vegetal, por tanto el estudio de estas sustancias sobre miméticos de membrana, como son los cristales

líquidos, es una buena aproximación para entender los efectos del herbicida sobre la estructura de la membrana celular.

4.2 Cristales Líquidos

Los cristales líquidos corresponden a un estado de la materia intermedio entre los estados sólido y líquido. Estos presentan un mayor grado de orden que los líquidos ordinarios, pero en contraposición a sólidos presentan mayor movilidad. Como es una fase intermedia se les denomina mesofases. Estas mesofases se pueden clasificar en termótropas o liótropas según su origen. Los cristales líquidos termótropos se generan durante la transición de fase de compuestos puros desde el estado sólido al estado líquido al modificar la temperatura. Por otra parte los cristales líquidos liótropos se generan de la mezcla de dos o más sustancias, en la cual usualmente el compuesto principal lo constituye un anfifilo, una región hidrofílica unida a una o más cadenas hidrofóbicas, mientras que los otros compuestos que componen este tipo de cristales son por lo general agua, sales inorgánicas y alcoholes de cadena similar a la del anfifilo. Las estructuras de las diferentes fases líquido-cristalinas que forman este tipo de sustancias, depende de la naturaleza y concentraciones de los distintos componentes del sistema, de la temperatura y de las propiedades del solvente.

Además de la clasificación antes expuesta, los cristales líquidos también pueden catalogarse según el orden u orientación que presentan las moléculas o unidades que lo componen. De esta forma los cristales líquidos termótropos y liótropos pueden presentar a lo menos tres tipos de fases: esméctica, colestérica y nemática. Las mesofases esmécticas (Figura 4-1a) se caracterizan por presentar capas ordenadas paralelamente. En este tipo de fases, las moléculas pueden moverse dentro de su misma capa, pero por lo general no entre capas vecinas. La mesofase colestérica (Figura 4-1b), al igual que la fase esméctica, forma capas, pero debido a la existencia de un centro quiral en las moléculas constituyentes se tiene

que la orientación del eje director de una capa se ve desplazado con respecto al siguiente en las capas vecinas, lo que produce que los vectores directores de cada capa describan una trayectoria helicoidal. Finalmente, están las mesofases nemáticas (Figura 4-1c) que presentan solamente un cierto grado de orden orientacional, y carecen del ordenamiento en capas definidas como en las mesofases descritas anteriormente.

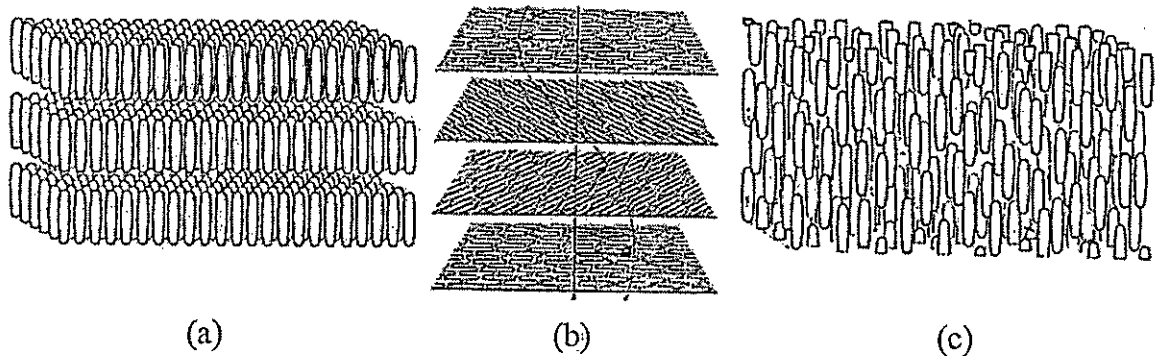


Figura 4-1. (a). Estructura de una fase esméctica, se puede apreciar el ordenamiento en capas. (b). representación del orden de las fases colestérica, la dirección del eje principal de las moléculas en cada capa se encuentra levemente desplazado respecto de las capas vecinas. (c). Representación de una fase nemática se observa que los componentes se encuentran alineados en una dirección pero no forman un orden en capas.

4.2.1 Cristales Líquidos Liótropos

En los diagramas de fases de las mesofases liótropas, se observa la generación de una serie de estructuras por el fenómeno de agregación de las moléculas. Esto ocurre debido principalmente al efecto hidrofóbico. Las estructuras que se forman dependen de las características y de la concentración de las especies en solución y la naturaleza del solvente. Cuando un anfifilo se disuelve en agua, las primeras estructuras que se generan, previo a las mesofases, son las micelas esféricas, las cuales se forman por sobre la concentración micelar crítica (*cmc*) del anfifilo. En estas estructuras, las cabezas polares de los anfifilos se

encuentran orientadas hacia el exterior de la micela, en contacto con el agua y los iones de la interfase, mientras que las cadenas hidrofóbicas se encuentran orientadas hacia el interior del agregado. Dichas estructuras, en promedio esféricas, no presentan anisotropía. Debido a que esta solución micro-heterogénea no presenta un comportamiento líquido-cristalino, se le llama "solución micelar isotrópica" (Figura 4-2). (Petrov, 1999)

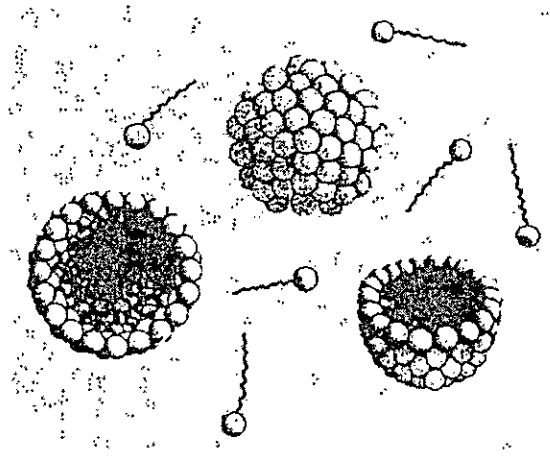


Figura 4-2 Representación de una solución micelar isotrópica

Si se incrementa la concentración del detergente, comienzan a aparecer distintas estructuras supramoleculares (mesofase liótropa), con un orden estructural en una o más dimensiones del espacio, es decir, estructuras anisótropas relativamente viscosas. Estas soluciones altamente concentradas son las que presentan características de cristal líquido. Los agregados moleculares contienen un gran número de anfifilos, donde el tamaño y forma del agregado dependen de las características del anfifilo, su concentración, la temperatura y las propiedades del solvente.

Para identificar las fases líquido-cristalinas, se han utilizado diversas técnicas, entre otras espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de neutrones de ángulo pequeño (SANS), difracción de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), y microscopia de luz polarizada. Estas técnicas permiten reconocer el tipo de fase del sistema como por ejemplo la

existencia de la fase lamelar (L), hexagonal (H), esméctica (Sm), colestérica (Ch), nemática discoidal (N_D) y nemática calamítica (N_C), todas las cuales presentan anisotropía.

En la fase lamelar las moléculas de anfifilo están formando láminas de bicapas cuasi-infinitas, las cuales están separadas por agua intersticial (Figura 4-3a). El espesor de cada lámina o bicapa es aproximadamente igual a la longitud de dos moléculas de anfifilo, con sus cabezas polares enfrentando las moléculas de agua. La estructura lamelar está ampliamente difundida en la naturaleza. Ejemplos de esto se encuentran en membranas celulares como la membrana nuclear, plasmática, cloroplastos, mitocondria y aparato de golgi. Dependiendo de las características y concentración del anfifilo, es posible formar agregados cilíndricos, los cuales se encuentran ordenados formando empaquetamientos hexagonales. Esta fase corresponde a la mesofase hexagonal (Figura 4-3b), donde cada cilindro se encuentra separado del siguiente por agua intersticial. (Tanford, 2003)

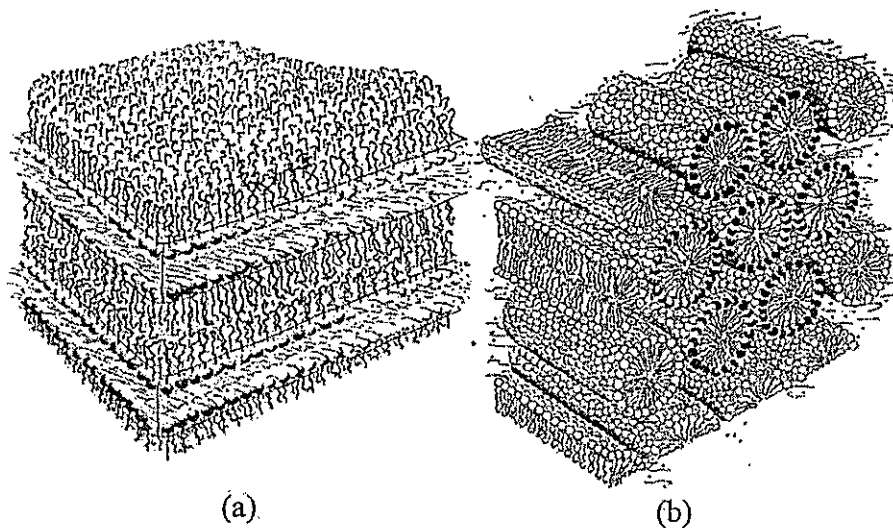


Figura 4-3 Representación esquemática de las fases anisotrópicas. (a). Fase lamelar, formada por bicapas cuasi-infinitas. y (b). Fase hexagonal, formada por el empaquetamiento de micelas cilíndricas.

4.2.2 Cristales Líquidos Liótropos Nemáticos

Cuando se agregan electrolitos y alcoholes alifáticos con largo de cadena similar al anfífilo, en la región del diagrama de fases en que existen las fases lamelar y hexagonal, es posible generar estructuras finitas no esféricas, de tamaño reducido. La adición de estos nuevos componentes induce una transición desde dichas fases hacia las mesofases nemáticas. Estas estructuras conservan muchas características de la fase de la cual provienen. Así los agregados provenientes de la mesofase hexagonal, forman un fase que se conoce como cristal líquido calamítico (Nc) donde sus agregados poseen simetría promedio prolato de tamaño finito (Figura 4-4b) (Petrov, 1999). Por otro lado, a partir de la mesofase lamelar se forma una fase conocida como cristal líquido nemático discoidal (Nd), donde el agregado posee una simetría promedio oblato, también de tamaño finito (Figura 4-4a). Dichas estructuras liquido-cristalinas poseen un ordenamiento del tipo nemático, pues solo conservan orden orientacional, la posición del centro de masas no está restringida en el espacio. Una propiedad interesante de los cristales líquidos es que poseen la capacidad de orientarse espontáneamente en presencia de un campo magnético externo. Esto ocurre debido a la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética de las cadenas alifáticas de los agregados, la cual se atribuye a los electrones de los anfífilos que forman el agregado, los que interactúan con el campo magnético externo. Para que ocurra la orientación frente al campo espontáneamente, el tamaño del agregado debe ser reducido. Esta propiedad resulta de gran utilidad para el estudio de estos sistemas, y de sustratos disueltos en ellos, por medio de la resonancia magnética nuclear (RMN), donde el campo magnético es provisto por el espectrómetro de RMN. De los estudios hechos (Petrov, 1999), se descubrió que los cristales

líquidos discoidales se orientan en el campo magnético externo con el vector director del cristal (eje de simetría del oblato) perpendicular a la dirección del campo magnético externo (Figura 4-4a), mientras que los cristales líquidos calamíticos lo hacen con el vector director (eje de simetría del prolato) paralelo al campo magnético externo (Figura 4-4b).

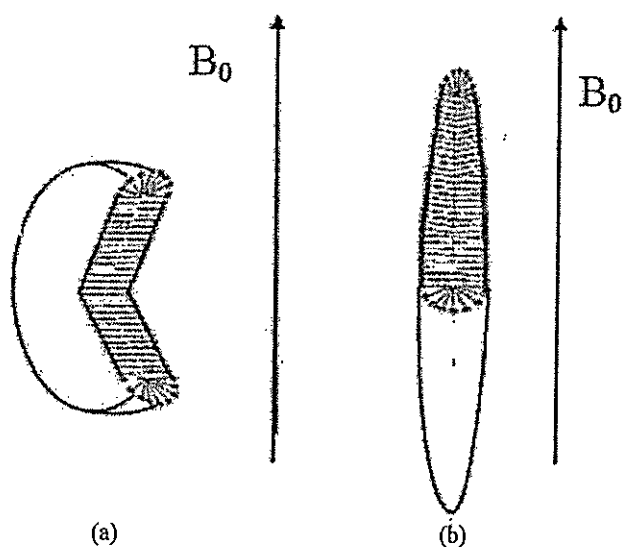


Figura 4-4(a). Agregado discoidal (b). Agregado calamítico. Ambos agregados se orientan espontáneamente en un campo magnético externo como se muestra en la figura

Los cristales líquidos liótropos han sido muy estudiados en recientes investigaciones; se han aplicado en la síntesis de nanopartículas metálicas de tamaño controlado, obtención de nanotubos de carbono orientados, portadores de fármacos y en estudios de liberación de droga prolongada en el tiempo. Además se puede considerar como un modelo simple de bicapa lipídica, presente en muchas de las estructuras líquido cristalinas encontradas en la naturaleza.

En este trabajo se estudió la estructura y propiedades de agregados de cristales líquidos liótropos nemáticos con un alto contenido de una mezcla natural de fosfolípidos y ácidos

grasos extraídos del poroto de soya. Para dicho estudio se utilizaron las espectroscopias de resonancia magnética nuclear y cálculos de dinámica molecular. A continuación se revisaran algunos conceptos de las técnicas mencionadas. (Montecinos, 2007)

4.3 *Espectroscopia de Resonancia magnética nuclear (RMN)*

La espectroscopía RMN estudia las relaciones energéticas que existen entre núcleos con espín distintos de cero y un campo magnético externo. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear, RMN, abarca transversalmente las distintas áreas de las ciencias básicas experimentales como Física, Química y Biología, y aplicaciones como en medicina y microscopía. Para entender de mejor manera el fenómeno RMN, se describirán los conceptos y fundamentos básicos de esta técnica.

4.3.1 *Espines nucleares, momento angular de espín y niveles de energía*

Los núcleos están formados por protones y neutrones llamados nucleones, cada una de estas partículas posee momento angular orbital y de espín. La combinación vectorial de estos forma el **momento angular de espín nuclear**, I . Este momento angular está caracterizado por los operadores de momento angular del espín nuclear, \hat{I}^2 y \hat{I}_z . Las funciones propias de espín nuclear, $|m_I\rangle$ satisfacen las siguientes ecuaciones de valores propios: (Requena, 2003)

$$\hat{I}^2|m_I\rangle = I(I + 1)\hbar^2|m_I\rangle \quad I = 0, \frac{1}{2}, 1, 1\frac{1}{2}, \dots$$

$$\hat{I}_z|m_I\rangle = m_I\hbar|m_I\rangle \quad m_I = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I$$

Ahora bien, si se visualiza el núcleo de una forma clásica, como una partícula cargada de simetría no esférica que rota sobre un eje, esta rotación genera un momento magnético. El

momento magnético, al igual que el momento angular, también es un vector que esta cuantizado, y se le asigna la letra μ . El vector $\vec{\mu}$, es directamente proporcional al momento angular de espín nuclear, I , y γ , la constante magnetogírica, la cual se define como el momento magnético dividido por el momento angular. Su valor es característico de cada isótopo nuclear:

$$\vec{\mu} = \hbar\gamma\vec{I}$$

Clásicamente la energía del momento magnético $\vec{\mu}$ sometido a un campo magnético \vec{B} es igual al negativo del producto escalar entre ambos vectores:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -|\mu B| \cos \theta$$

Como $\vec{B} = B_z$ entonces $E = -\mu_z B_z$ y además como $\mu_z = \gamma\hbar I_z$, entonces ahora se puede escribir el Hamiltoniano:

$$\hat{H} = -\gamma\hbar B_z \hat{I}_z$$

Se tiene que solamente una componente del momento angular conmuta con \hat{H} , por lo tanto solamente se puede conocer una, por convención z , las otras dos componentes se encuentran totalmente indeterminadas. Esto, hace que $\vec{\mu}$ precese en torno a B_z . A este movimiento de precesión se le llama *precesión de Larmor* (Figura 4-5)

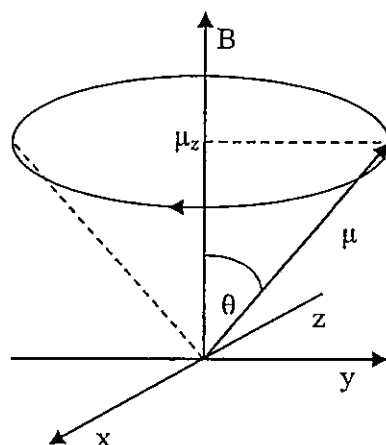


Figura 4-5. Interacción entre un dipolo magnético μ y un campo magnético B

Si se considera que $I_z = m_l \hbar$ entonces se puede expresar la energía en términos de m_l y B_z .

Por lo tanto la energía para cada estado es

$$E = -m_l \hbar \gamma B_z$$

En ausencia de campos externos los estados de espín nuclear se encuentran degenerados. Tomando como ejemplo núcleos con $I=1/2$ hay dos estados de energía disponibles, estos se encuentran caracterizados por la componente z del momento angular, que puede tomar los valores $m_l = +1/2$ y $-1/2$. Estos estados están descritos por dos funciones $|\alpha\rangle$ y $|\beta\rangle$, donde se designa a $|\alpha\rangle$ como el estado de menor energía, con μ en la misma dirección del campo magnético, y el estado $|\beta\rangle$, como el de mayor energía, con μ en dirección contraria al campo magnético externo. En ausencia de campos magnéticos $|\alpha\rangle$ y $|\beta\rangle$ se encuentran con igual energía. El desdoblamiento de los niveles de energía se produce por la presencia del campo magnético B_0 (Efecto Zeeman) (Figura 4-6), la diferencia de energía entre los estados es:

$$\Delta E = \hbar \gamma B_0$$

Por lo tanto, al ser mayor B_0 mayores son las diferencias de energía entre los estados.

Transiciones de los momentos magnéticos nucleares, entre los diferentes estados de energía, inducidas por radiación electromagnética, que se encuentra en la escala de las radiofrecuencias (Rf), dan origen a las señales en el espectro de RMN. Entonces como $\Delta E = h\nu = \hbar\gamma B_z$, la expresión para la frecuencia es:

$$\nu = \frac{\gamma B}{2\pi}$$

Como se observa la frecuencia aumenta linealmente con el campo magnético.

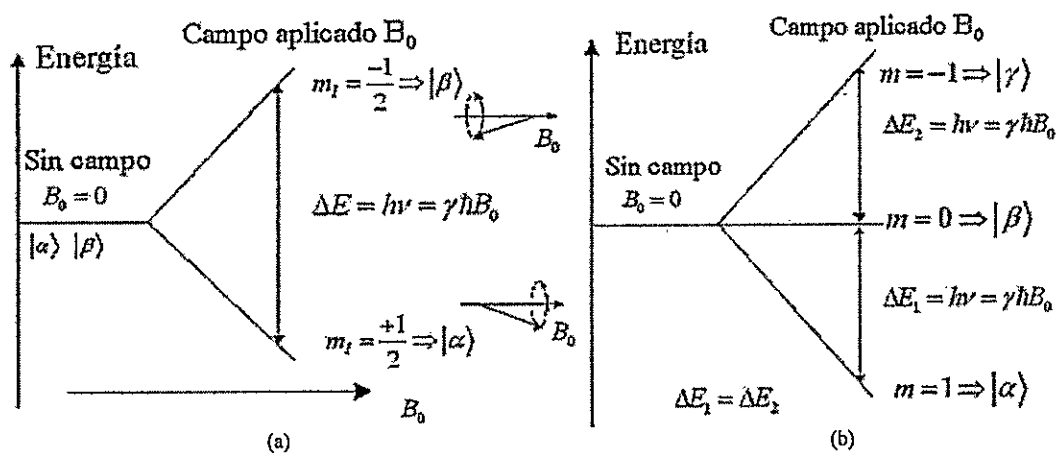


Figura 4-6(a). Representación de la situación de una partícula aislada con espín = 1/2. (b). representa la situación de una partícula aislada con espín = 1.

Debido a la existencia de electrones, se produce un fenómeno conocido como apantallamiento. Este es responsable del desplazamiento químico, y se introduce en la expresión de frecuencia como un campo magnético efectivo $B_{efectivo}$, descrito como

$$B_{efectivo} = B(1 - \sigma_i)$$

donde σ_i es la constante de apantallamiento, reemplazando en la ecuación de frecuencia se obtiene la expresión

$$\nu_i = \frac{\gamma B(1 - \sigma_i)}{2\pi}$$

4.3.2 Interacción Escalar, Dipolar y Cuadrupolar

4.3.2.1 Interacción Escalar

Cuando dos núcleos con espines nucleares I_1 e I_2 están mediados y rodeados por electrones aparece un tipo de interacción denominada interacción escalar. A través de la interacción magnética de contacto de Fermi entre un electrón y un núcleo, los electrones son polarizados en la dirección opuesta al espín del núcleo con el que está interactuando. Esta polarización tiene un efecto en los electrones vecinos, lo que afecta el entorno del núcleo. Es por esto que la interacción escalar se transmite a través del (los) enlace químico que separan ambos núcleos.

Escrito en términos del Hamiltoniano, la interacción escalar es

$$\hat{H}_J = \sum_k \sum_j 2\pi J_{kj} \vec{I}_k \cdot \vec{I}_j$$

donde $k < j$

A J_{kj} se le conoce como acoplamiento J y es fuertemente dependiente del número de enlaces que separa ambos núcleos interactuantes.

4.3.2.2 Interacción Dipolar y Cuadrupolar

Los núcleos atómicos suelen ser tratados más adecuadamente como multipolos eléctricos, en vez de una distribución de cargas puntuales. Estos son descritos por:

$$\sum_i \epsilon_i r_i^n$$

Donde r es la distancia a la carga ϵ_i desde el centro de gravedad eléctrico y n es el exponente que da cuenta del multipolo, por ejemplo, $n=1$ corresponde a un dipolo, $n=2$ corresponde a un cuadrupolo, $n=3$ corresponde a un octupolo, etc. Entre las interacciones nucleares más importantes en RMN, por su magnitud, están la interacción dipolar y la interacción cuadrupolar. Para entender el origen de estas interacciones debemos definir el *eje de interacción* (Figura 4-7). En la interacción dipolar, el eje de interacción corresponde a la recta que une los dos dipolos magnéticos acoplados dipolarmente. Este eje forma un ángulo θ con el vector del campo magnético externo, B_0 (Figura 4-7a). La interacción dipolar se observa en el espectro como un desdoblamiento de las señales de ambos núcleos en interacción directa. Por otro lado, la interacción cuadrupolar se manifiesta entre un núcleo con momento cuadrupolar eléctrico ($I \geq 1$) y la gradiente del campo eléctrico en su vecindad. Esta gradiente define el eje de interacción, donde θ corresponde al ángulo formado entre la gradiente de campo eléctrico y el vector del campo magnético externo (Figura 4-7b). Para átomos ^2H (espín-nuclear $I=1$) que forman parte de un enlace C-D en una molécula, la gradiente de campo eléctrico es provista por los electrones que forman el enlace. Ambos ejes de interacción se muestran en la Figura 4-7.

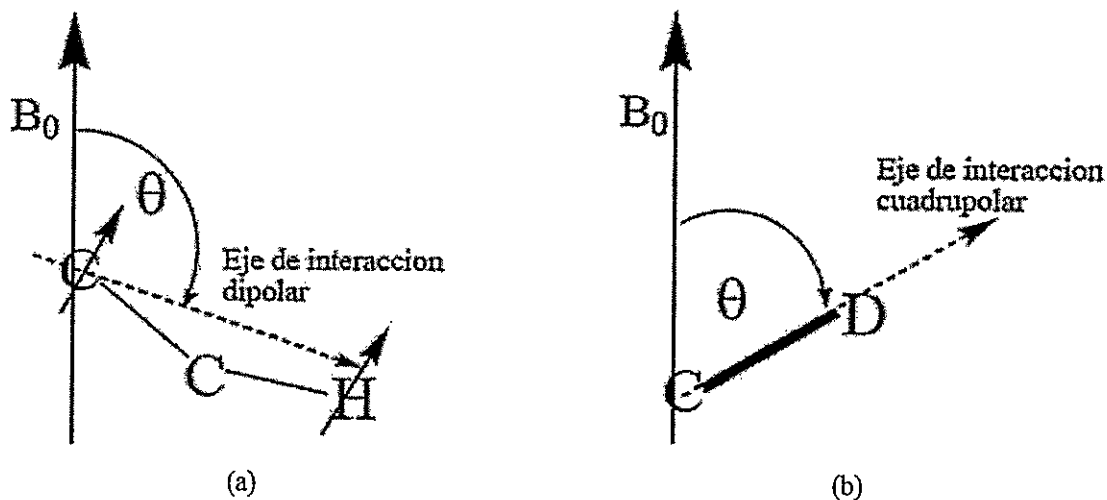


Figura 4-7 Representación de la interacción (a). dipolar, que involucra el desplazamiento del eje de interacción entre 2 núcleos dipolares ($I = \frac{1}{2}$) con respecto al vector B_0 y (b). cuadrupolar, que involucra la dirección del gradiente de campo eléctrico con respecto a B_0 para un enlace C-D

Si el enlace C-D se encuentra fijo en la molécula, este resulta de gran utilidad para el estudio de la orientación promedio de la molécula respecto a la dirección del campo magnético externo. La interacción cuadrupolar se manifiesta en el espectro RMN, como un desdoblamiento ($\Delta\nu$) de la señal del núcleo observado. La magnitud de esta interacción depende de la libertad de movimiento y orientación promedio que tengan los núcleos en el medio, para el caso en que los espines se encuentren en un medio uniaxialmente orientados, como es el caso de los cristales líquidos liótropos nemáticos el desdoblamiento esta descrito por la siguiente expresión.

$$\Delta\nu = \frac{3 e^2 Q q_{zz}}{8 h} \frac{(2m - 1)}{I(2I - 1)} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

Donde el término $e^2 Q q_{zz}/h$ corresponde a la constante de acoplamiento cuadrupolar nuclear, con el momento cuadrupolar (eQ) dado por e , la carga del protón y Q el momento cuadrupolar eléctrico del núcleo, el término $(3 \cos^2 \theta - 1)$ representa el promedio sobre todas.

las orientaciones posibles del eje de interacción con respecto al campo magnético externo. En soluciones isotrópicas, el ángulo θ puede tomar todos los valores posibles con igual probabilidad, de modo que el valor promedio de $\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle$ es igual a cero.

$$\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle = \int_0^\pi \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \sin \theta d\theta = \frac{1}{2} [\cos^3 \theta]_0^\pi + \frac{1}{2} [\cos \theta]_0^\pi = 0$$

Por lo tanto estas interacciones no aparecen en el espectro de este tipo de soluciones.

Desde el punto de vista del análisis estructural, esto resulta ser de gran ventaja, ya que de no ser así se perdería toda la estructura hiperfina del espectro, y con esto toda la información estructural de las moléculas estudiadas. En el caso de que una molécula esté disuelta en una solución anisotrópica, ésta no podrá moverse con igual probabilidad en todas las direcciones del espacio y el valor promedio $\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle$ sobre todas las orientaciones posibles será distinto de cero. De esta forma, los desdoblamientos dipolares y cuadrupolares, darán una medida de la orientación promedio y del grado de libertad de movimiento de la molécula. La energía de cada uno de los diferentes estados de espín, para núcleos con $I \geq 1$ en presencia de un campo magnético está dada por la siguiente expresión.

$$E = \gamma B_0 \hbar m_i + h\nu_q (3 \cos^2 \theta - 1) \left(m_i^2 - \frac{1}{3} (I(I+1)) (8\pi) \right)^{-1}$$

El primer término en la ecuación corresponde a la energía de interacción Zeeman y el segundo término corresponde a la energía de interacción cuadrupolar.

Como se observó, en soluciones isotrópicas las interacciones dipolar y cuadrupolar promedian cero, lo que tiene como consecuencia que la diferencia de energía promedio entre los diferentes estados de espín de un núcleo con $I \geq 1$ sea la misma. Esto produce que en el espectro se observe una única señal. En soluciones anisótropas las diferencias de energía

entre los estados de espín no son iguales, lo que produce un desdoblamiento de la señal observada debido a las diferencias en las energías de transición entre los distintos estados (Figura 4-8). El desdoblamiento de las señales recibe el nombre de desdoblamiento cuadrupolar y su magnitud es función del ángulo promedio y del grado de alineación del eje de interacción cuadrupolar y el vector de campo magnético. Es decir, la disminución de la movilidad de la especie estudiada incrementara el valor del desdoblamiento cuadrupolar. Este fenómeno es utilizado para el estudio de la dinámica re-orientacional de los agregados líquido-cristalinos, particularmente su interfase. Para ello se han utilizado como sondas, las moléculas deuteradas ($I = 1$) dodecilsulfato de sodio- d_{25} (SDS- d_{25}) y HDO. Todas estas especies deuteradas se encuentran de una u otra forma asociadas a la interfase del agregado líquido-cristalino.

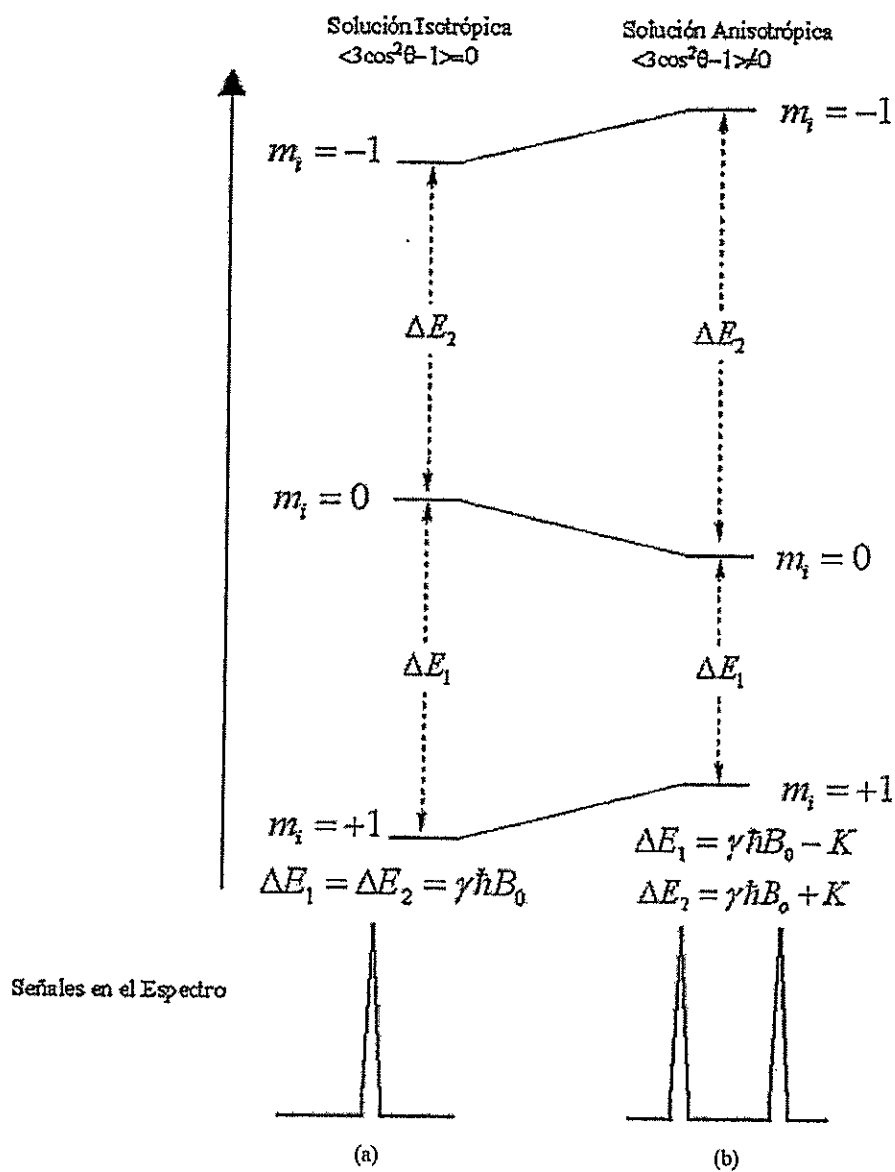


Figura 4-8(a). La diferencia entre niveles de energía para un núcleo de deuterio ($I=1$) en un medio isotrópico en presencia de un campo magnético externo B_0 . (b). En una solución anisotrópica la energía de los niveles $m_i = -1$, 0 , $+1$, varía haciendo diferente ΔE_1 de ΔE_2 .

4.3.3 Procesos de Relajación

En usencia de un campo magnético externo, B_0 , todos los estados nucleares de espín se encuentran degenerados, por tanto, cada estado está con igual probabilidad de población. Cuando, se aplica un campo magnético externo sobre un sistema de espines los estados de espín pierden la degeneración, y se restablece una nueva distribución de equilibrio (distribución de Boltzmann) con un leve exceso de población en el estado de menor energía. Pero este proceso ocurre en un tiempo finito, y el tiempo que tarda el sistema en restablecer el equilibrio es llamado *tiempo de relajación longitudinal o espín-red*, T_1

La relación que gobierna el proceso de relajación longitudinal, en términos de las poblaciones de un determinado estado (por ejemplo, para el estado $m=+1/2$) se expresa como una *recuperación exponencial* de primer orden

$$\frac{P_{eq} - P_t}{P_{eq} - P_0} = \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)$$

T_1 depende del tipo de núcleos, la localización de los núcleos dentro de la molécula, el tamaño de la molécula, el estado físico de la muestra, y de la temperatura. Para líquidos o soluciones, los valores típicos oscilan entre 10^{-2} y 10^2 s, algunos núcleos con presencia de cuadrupolos poseen tiempos de relajación mucho más cortos, del orden de 10^{-4} - 10^{-3} s. Para sólidos cristalinos los valores de T_1 son mucho más largos.

En núcleos con cuádruplo eléctrico la relajación ocurre principalmente por interacción del cuadrupolo eléctrico nuclear con el gradiente del campo eléctrico entorno al núcleo, usualmente generada por la densidad electrónica. En el caso particular de moléculas que

poseen átomos de deuterio, es posible relacionar el tiempo de relajación longitudinal, T_1 , con el tiempo de correlación re-orientacional del enlace C-D (τ_c), de acuerdo con la ecuación

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{3}{80}\right) \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \left(\frac{2\pi e Q}{h} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial z^2}\right)\right) (J(\omega_0) + 4J(2\omega_0))$$

$$J(\omega_0) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2}$$

$$J(2\omega_0) = \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2}$$

Aquí η es el parámetro de asimetría de la gradiente de campo eléctrico en torno al núcleo, igual a 0,05 en el caso del enlace C-D de un anillo aromático, e igual a 0 en el caso del enlace C-D de cadenas alifáticas y del enlace O-D del agua deuterada. El término $\left(\frac{2\pi e Q}{h} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial z^2}\right)\right)$ es la constante de acoplamiento cuadrupolar en unidades de frecuencia angular. Valores informados para dicha constante son 185 kHz para el enlace C-D de un anillo aromático, 167kHz para el enlace de cadenas alifáticas y 308 kHz para el enlace O-D del agua. $J(\omega_0)$ y $J(2\omega_0)$ son las densidades espectrales a la frecuencia de Larmor y al doble de esta frecuencia respectivamente. Las densidades espectrales corresponden al campo de radiación electromagnética generada por el movimiento Browniano de las partículas que componen el sistema, y se introducen como un factor de probabilidad de emisión inducida para un sistema que contenga interacciones fluctuantes con componentes de frecuencia a la frecuencia de Larmor. Esto se aplica particularmente en espectroscopías de baja frecuencia. La densidad espectral se obtiene de la transformada de Fourier de la función de auto correlación orientacional del enlace C-D. En "extreme narrowing" $1 \gg \omega_0^2 \tau_c^2$ y T_1 resulta ser proporcional a τ_c^{-1} , es decir en estas condiciones T_1 es proporcional a la movilidad.

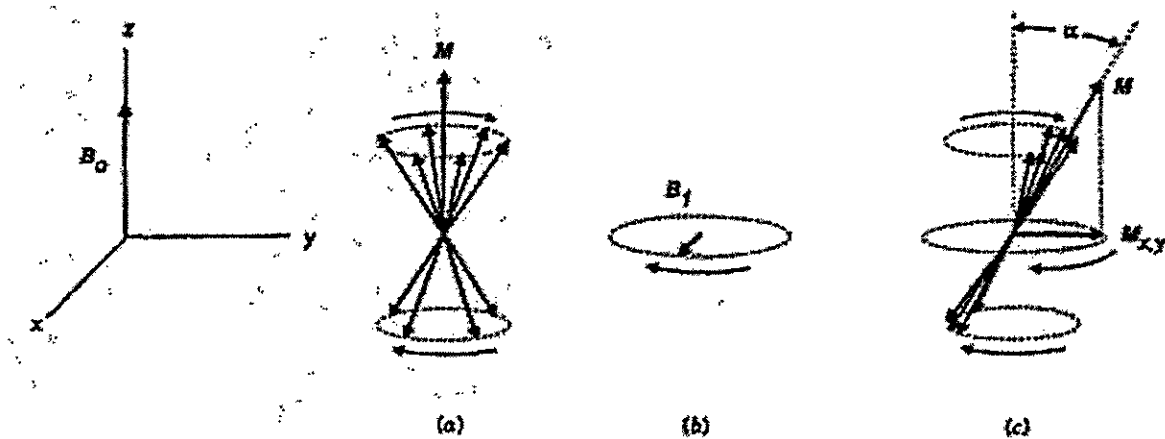


Figura 4-9 Efectos de la aplicación de un campo magnético externo sobre un grupo de momentos magnéticos de espín a) magnetización macroscópica de un grupo de espines, b) Aplicación de un campo magnético oscilante c) resultado de la aplicación de un campo magnético externo constante y de un campo magnético oscilante

Al momento de colocar la muestra frente a un campo magnético, B_0 , el cual, por definición, está en el eje z , produce que todos los momentos magnéticos de espín precesen alrededor del eje z . Si sumamos todos los momentos magnéticos de espín, tendremos un vector suma, M , el cual se denomina magnetización macroscópica, correspondiente a la suma vectorial de los espines en el estado de menor energía. Este vector no se encuentra precesando pero sus componentes si lo hacen (Figura 4-9a). Para medir en RMN es necesario irradiar la muestra con fotones de la frecuencia necesaria para generar transiciones de espines del estado de menor energía hacia el estado de mayor energía, pero la medición se acaba cuando la migración a hecho que ambos estados posean la misma población,, entonces la muestra se habrá saturado y no será posible seguir midiendo. Una forma más eficiente de obtener el espectro consiste en irradiar la muestra con un pulso de radio frecuencia (B_1), perpendicular a B_0 , a la frecuencia de Larmor característica y que rote en el plano xy (circularmente polarizada en el plano xy , ver Figura 4-9b, esto con el objeto que todos los espines entren en fase, otorgándole así componentes transversales M_{xy} a M (Figura 4-9c)

El ángulo de inclinación, α , que forma M en el eje z , hace posible controlar la magnitud de $M_{x,y}$ con la relación

$$M_{x,y} = M \sin \alpha$$

El ángulo de inclinación α , está determinado por la energía y la duración de la irradiación de B_1 , es decir la intensidad y duración del pulso.

Cuando el proceso de irradiación se detiene, no solo la distribución regresa a las poblaciones de equilibrio (distribución de Boltzmann), sino que además los momentos magnéticos nucleares individuales empiezan a perder la coherencia de fase y regresan a un arreglo aleatorio precesando alrededor del eje z (Figura 4-9a). El tiempo que demora en perder totalmente la coherencia de fase transversal, es decir decaer $M_{x,y}$ a cero, se denomina *tiempo de relajación transversal o espín-espín*, T_2 . En condiciones de "extreme narrowing" antes mencionado, T_2 es igual que T_1 , y por tanto la relajación transversal (de-coherencia) y la relajación longitudinal (restauración de la distribución de Boltzmann) ocurren simultáneamente. (Macomber, 1998)

4.3.4 Medición de T_1 : experimento "inversion recovery"

Para determinar el tiempo de relajación transversal, T_1 , se emplea el experimento "inversión recovery" (TIR) el cual consiste en el empleo de una secuencia de pulsos determinada variando un tiempo τ entre cada pulso y registrando la intensidad.

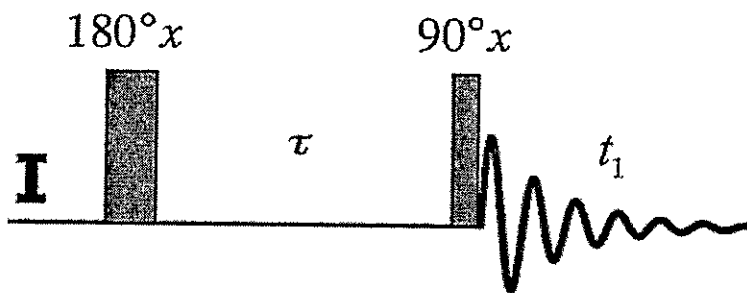


Figura 4-10 Secuencia de pulsos en el experimento inversion recovery. Primero se da un pulso de 180° se espera un tiempo τ y luego se da un pulso de 90° para posteriormente registrar el decaimiento de $M_{x,y}$.

La secuencia de pulsos empleada en el experimento se resume en el siguiente listado:

1. Se da un pulso de radio frecuencia, B_1 (sección IV.B.3), de 180°
2. Se espera un tiempo τ
3. Se da un pulso, B_1 , de 90°
4. Se abre el detector y se registra $M_{x,y}$ en el tiempo
5. Se repiten los pasos anteriores variando τ .

El resumen de la secuencia anterior se encuentra en la Figura 4-10. Una vez finalizado el experimento lo que se obtiene es una secuencia de espectros de diversas intensidades (Figura 4-11)

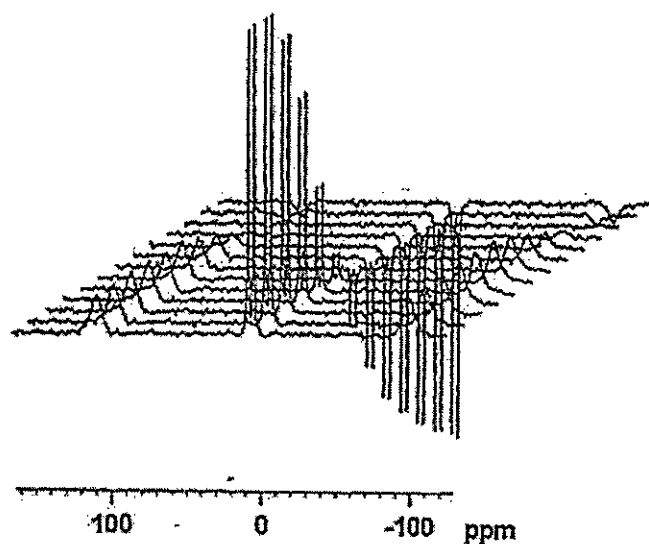


Figura 4-11 Serie de espectros obtenidos con el experimento T1IR

En el primero pulso de 180° M_0 se invierte dejándola en el eje $-z$, durante la magnetización experimenta una relajación espín-red parcial para dar un vector $M_z(\tau)$, finalmente se da un pulso de 90° rotando $M_z(\tau)$ al plano x-y para inmediatamente registrar la intensidad, esto se resume en la Figura 4-12. Finalmente ajustando a la gráfica de intensidad vs tiempo a una curva de recuperación mono exponencial se puede encontrar T_1 .

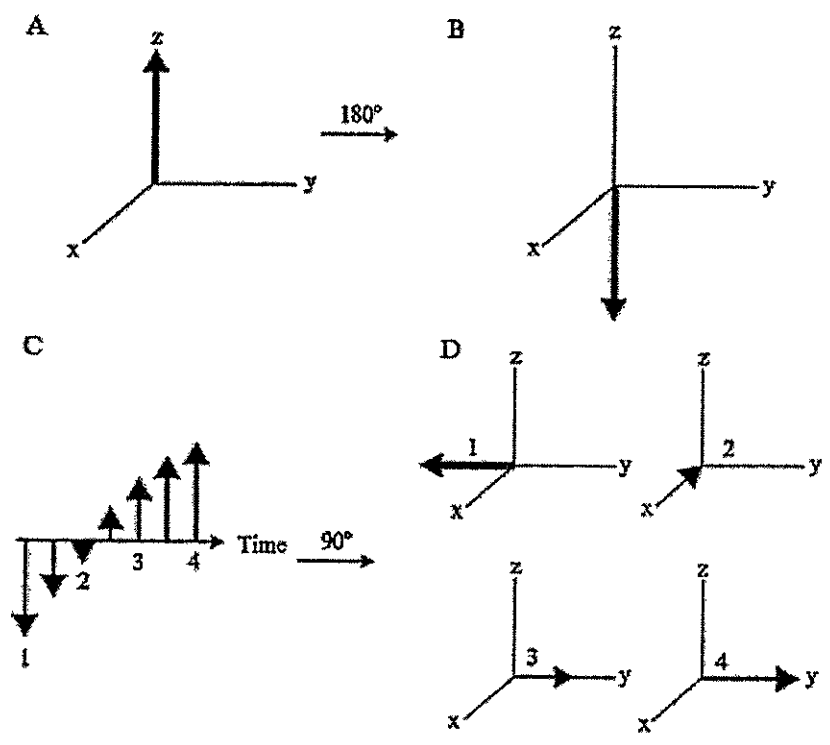


Figura 4-12 Diagrama que muestra los cambios que sufre la magnetización durante el experimento TIIR

4.3.5 Parámetros de Orden

El parámetro de orden del enlace C-D (S_{CD}), es igual a $\frac{1}{2}(3 \cos^2 \theta - 1)$, donde θ es el ángulo entre el enlace C-D y el campo magnético, y el promedio es tomado sobre todas las posibles orientaciones del enlace.

El parámetro de orden puede tomar valores entre -0,5 y 1. Cuando el eje de interacción cuadrupolar es paralelo a la dirección del campo magnético, el valor de S_{CD} es 1, y para un eje perpendicular a la dirección del campo es -0,5. El valor 0,0 es posible tanto para un eje que rota libremente con igual probabilidad en todas las direcciones del espacio, como para un eje que esté orientado con un ángulo promedio θ de $54,7^\circ$ (ángulo mágico) respecto del campo magnético.

El parámetro de orden es proporcional al desdoblamiento cuadrupolar y se define como:

$$|\Delta\nu_Q| = \frac{3}{2}A \left| \frac{1}{2}(3 \cos^2 \theta - 1) \right|$$

El desdoblamiento cuadrupolar también se puede expresar en función de dos ángulos: uno el ángulo que se forma entre el campo magnético y el eje normal del agregado y el otro ángulo es el que se forma entre la normal del agregado y el eje de interacción cuadrupolar.

$$|\Delta\nu_Q| = \frac{3}{2}A \left| S_{CD}^{(t)} \right| |P_2(\cos \theta)|$$

Aquí A es la constante de acoplamiento cuadrupolar y $P_2(\cos \theta) = 0,5(3 \cos^2 \theta - 1)$ es el polinomio de Legendre de segundo orden. Cuando $\theta = 0^\circ$, $P_2(\cos \theta)$ es igual a 1 y si $\theta = 90^\circ$ $P_2(\cos \theta) = -0,5$

Entonces, como el agregado se orienta con su eje director perpendicular a la dirección del campo magnético, el ángulo θ promedio es 90° , por lo tanto, el valor de $\Delta\nu_Q$ resulta ser:

$$|\Delta\nu_Q| = -\frac{3}{4}A \left| S_{CD}^{(t)} \right|$$

Con el valor de $\Delta\nu_Q$ es posible calcular directamente el valor del parámetro de orden del enlace, S_{CD} con respecto al eje de simetría del agregado. Por lo tanto la obtención de los parámetros de orden nos puede dar una medida de la dinámica re-orientacional de la molécula con respecto al campo magnético.

Entonces, empleando la espectroscopia de ^2H -RMN se puede obtener información acerca de la distribución, orientación promedio y dinámica reorientacional de sustratos deuterados disueltos en sistemas moleculares anisotrópicos, a través de los desdoblamientos cuadrupolares y los tiempos de relajación longitudinal T_1 . (Ahumada, 2007)

4.4 Dinámica Molecular (DM)

4.4.1 Mecánica Molecular y campo de fuerza

La DM es una simulación mecano-clásica la cual nos permite modelar sistemas constituidos por cientos de miles de átomos. Esta se basa en la existencia de un campo potencial, (Allen & Tildesley, 1989)

$$\begin{aligned} V(r^N) = & \sum_{\text{estiramientos}} \frac{k_i}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{impropios}} k(\varepsilon_i - \varepsilon_{i,0})^2 \\ & + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \\ & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 4\varepsilon_i \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \end{aligned}$$

que gobierna todas las interacciones del sistema, tanto las enlazantes como las no enlazantes (Figura 4-13)

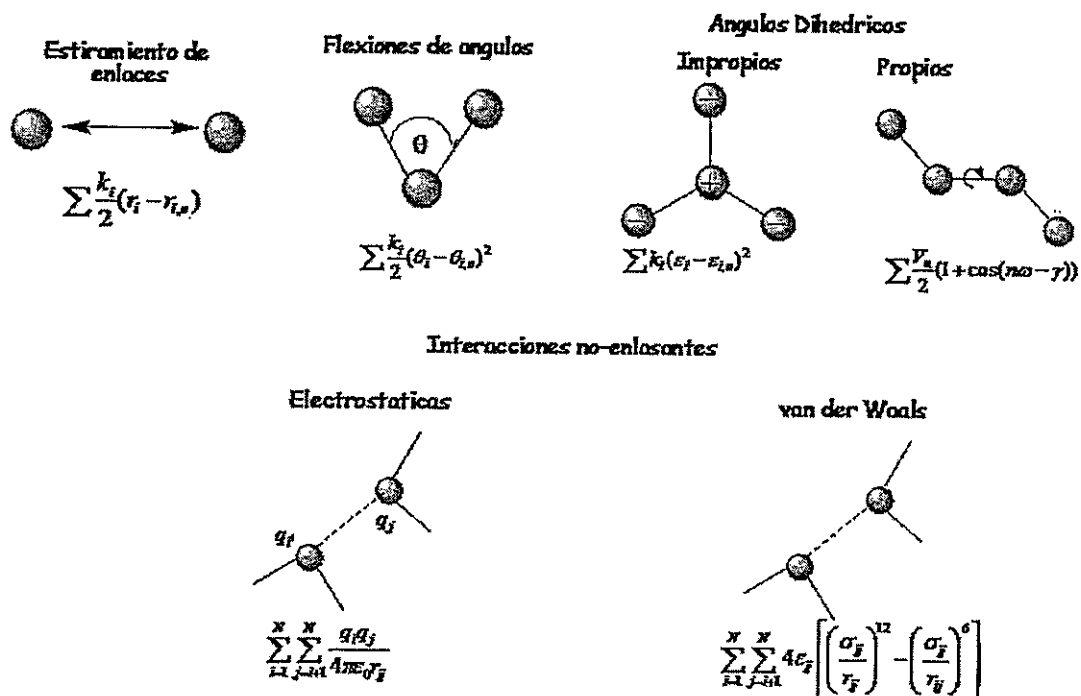


Figura 4-13 Tipos de interacciones contenidas en el campo de fuerza

En la DM se van generando consecutivas configuraciones del sistema en el tiempo. Estas configuraciones se obtienen integrando la segunda ley de movimiento de Newton con respecto al tiempo. El resultado de esta simulación se denomina trayectoria, y contiene toda la información del sistema. La trayectoria se obtiene a través de la resolución de la ecuación diferencial presente en la segunda ley de Newton

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = \frac{F_i}{m_i}$$

Esta ecuación describe el movimiento de una partícula de masa m en el tiempo, a lo largo del eje de coordenadas (r_i) con una fuerza inicial F_i . Como el sistema es conservativo la fuerza es el gradiente negativo de la función potencial $V(r^N)$.

$$F_i = -\nabla V(r^N) = -\left(i \frac{\partial V}{\partial x} + j \frac{\partial V}{\partial y} + k \frac{\partial V}{\partial z}\right)$$

Si se conocen las coordenadas y momentos iniciales del sistema, podemos calcular fuerzas iniciales. Integrando dicha ecuación diferencial dos veces con respecto al tiempo se calculan nuevas posiciones y con esto se obtienen las nuevas fuerzas. Integrando nuevamente se obtienen nuevas velocidades y así sucesivamente se obtiene la trayectoria del sistema. (Hess & David van der Spoel, 2010)

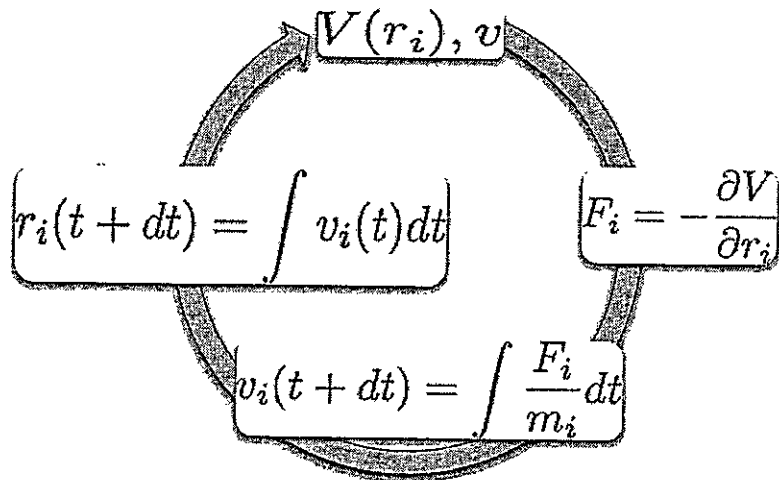


Figura 4-14 Algoritmo global para el cálculo de DM

4.4.2 Análisis de Resultados

4.4.2.1 Función de distribución radial

La función de distribución radial o función de correlación de pares, $g_{AB}(r)$ es el camino más usado para describir la estructura microscópica de un sistema, especialmente en el caso de líquidos. Esta función permite calcular la probabilidad de encontrar una partícula B, en el entorno de una partícula A, a una distancia r .

$$g_{AB} = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle}$$
$$g_{AB} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle} \frac{1}{N_A} \sum_{i=A}^{N_A} \sum_{j=B}^{N_B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2}$$

$\langle \rho_B(r) \rangle$ corresponde a la densidad de partículas B a una distancia r alrededor de las partículas A y $\langle \rho_B \rangle$ la densidad de partículas B promediadas sobre todas las esferas alrededor de la partícula A. N_A corresponde al número de partículas A, $\delta(r_{ij} - r) = 1$ cuando $r_{ij} = r$ y 0 para todo el resto. En la práctica GROMACS calcula g_{AB} dividiendo el sistema en capas esféricas y gráfica $g_{AB}(r)$ en función de r . En la Figura 4-15 se observa un gráfico representativo de la función de distribución radial.

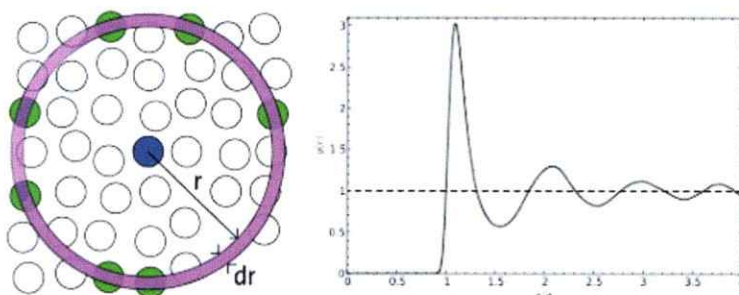


Figura 4-15 Esferas de integración. Función de distribución radial

4.4.2.2 Función de auto-correlación rotacional

La función de auto correlación, llamada también función memoria, permite expresar la persistencia en el tiempo de una cierta propiedad, la cual es función del movimiento Browniano de los componentes del sistema. Por lo tanto esta función es independiente del origen del tiempo. La función de auto-correlación rotacional se calcula como el promedio del producto punto del vector cuya dinámica re-orientacional se quiere calcular, a tiempo cero y a distintos tiempos t :

$$G(t) = \langle f(t) \cdot f(t + \tau) \rangle$$

El valor de la función de correlación es 1 cuando $\tau = 0$ (100% correlación) y 0 cuando τ tiende a infinito (total pérdida de correlación). En la Figura 4-16 se observa el gráfico de la función de auto-correlación orientacional.

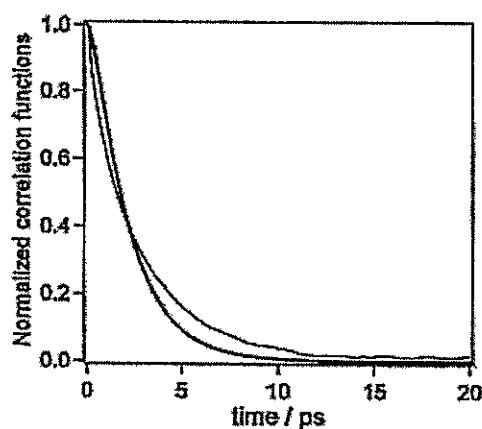


Figura 4-16 Función de auto-correlación rotacional

La rotación de una molécula es influenciada por las moléculas vecinas. Si suponemos el ajuste de la función de auto-correlación a un decaimiento mono-exponencial obtenemos el

tiempo de correlación τ_c el cual es una medida de la movilidad y este se puede obtener experimentalmente a través de RMN.

$$G(\tau) = \exp\left(-\frac{|\tau|}{\tau_c}\right)$$

5 *Hipótesis*

El modo de acción del 2,4-D debería depender, entre otras variables, de la facilidad de cruce del herbicida a través de la membrana y del efecto que éste tiene sobre los componentes de la misma. La distribución, orientación promedio, dinámica e interacciones de 2,4-D con la membrana, son variables importantes en el proceso de difusión pasiva.

6 *Objetivos*

6.1 *Objetivo Principal*

Caracterizar la distribución, orientación promedio y dinámica del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) disuelto en bicapas lipídicas

6.2 *Objetivos Secundarios*

- Sintetizar el ácido 2,4-diclorofenoxiacético tanto protonado (2,4-D-h₃) como deuterado (2,4-D-d₃)
- Preparar los Cristales Líquidos Liótrofos Nemáticos (CLLN) con el 2,4-D en estos sistemas
- Realizar las mediciones de ²H-RMN de estos sistemas, desdoblamiento cuadrupolares y tiempos de relajación longitudinal
- Calcular trayectorias de Dinámica Molecular (DM) de estos sistemas
- Interpretar y analizar los datos experimentales (²H-RMN) y teóricos (DM)

7 Materiales y Métodos

7.1 Síntesis de 2,4-D- h_3 y 2,4-D- d_3

La síntesis del 2,4-D- h_3 y 2,4-D- d_3 siguen caminos idénticos, las cuales se inician con la desprotonación del fenol- h_5 (o fenol- d_5) y del grupo carboxílico del ácido 1-cloroacético con una solución saturada de hidróxido de sodio. Acto seguido, ambos compuestos, el 1-cloroacetato y el fenóxido, en proporción 1:1, se refluxan por 45 minutos (para 2 gramos de ácido 1-cloroacético y fenol), obteniendo el ácido fenoxiacético (R.Q., A., & Mc. Ewen), el ácido es separado del fenol que no reacciona, con éter etílico, a pH levemente básico (pH \approx 8), en un embudo de separación.

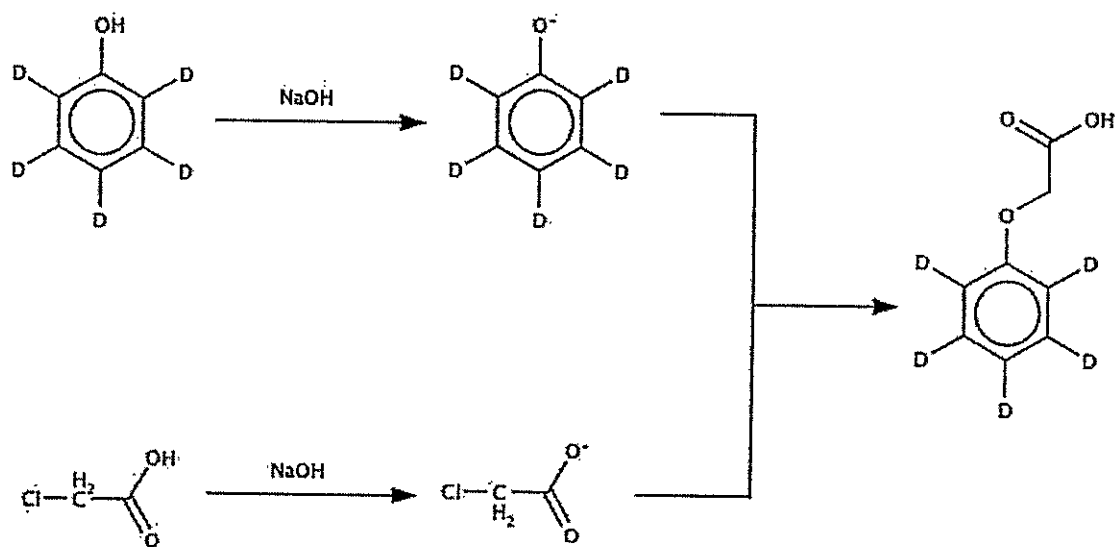


Figura 7-1 Esquema de la síntesis del ácido fenoxiacético deuterado a partir de fenol- d_5 y ácido 1-cloroacético

Una vez obtenido del ácido fenoxiacético deuterado se prosigue con la reacción reportada por Abruzzese (Abruzzese, 1992), de acuerdo a la Figura 7-2.

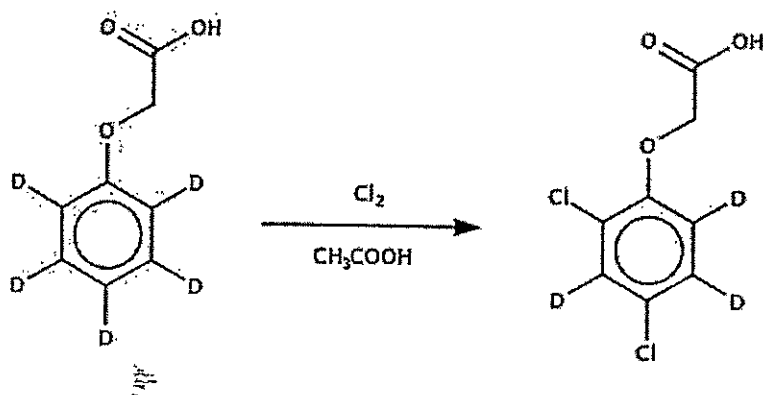


Figura 7-2. Reacción de Abruzeze en la síntesis del 2,4-D-d₃ a partir del ácido fenoxiacético deuterado

Esta reacción consiste en burbujear cloro gaseoso al ácido fenoxiacético en presencia de ácido acético (3 horas de burbujeo para 30g de ácido fenoxiacético con 50g de ácido acético), una vez realizado el burbujeo con cloro, la mezcla se enfría con agitación hasta llegar a 15°C donde ocurre la precipitación el ácido 2,4-D. Finalmente el 2,4-D se extrae de la mezcla por filtración al vacío lavando el sólido con pequeñas cantidades de solución de ácido acético y agua.

7.2 Preparación de las Mesofases

Las muestras de CL se prepararon, en 2 etapas: la primera etapa consistió en preparar una única muestra de CL que contenía cloruro de tetradeciltrimetilamonio (TTAC)/ NaCl/Extracto de poroto de soja (Phl)/decanol(DeOH)/H₂O (0,1% D₂O en H₂O), una vez finalizada la preparación del CL, constatando que la muestra no presente material no disuelto y asegurándose que desvíe la luz polarizada, se procede a la segunda etapa la cual consiste en separar esta muestra en 3 tubos de ensayo equitativamente en masa (2g c/u), donde el primer tubo contenía un 10% en masa de SDS-d₂₅ y 4% en masa de 2,4-D-h₃ (Tabla 2-tubo 1), el segundo tubo contenía solo un 10% en masa de SDS-d₂₅(Tabla 2-tubo 2) y finalmente el tercer tubo contenía un 10% en masa de SDS-h₂₅ y 4% en masa de 2,4-D-d₃ (Tabla 2-tubo 3)

Tabla 2 Composición de las muestras de CL

Tubo	NaCl (g)	Phi (g)	TTAC (g)	DeOH (μL)	0,1%D ₂ O (mL)	2,4-D- <i>h</i> ₃ (g)	SDS- <i>d</i> ₂₅ (g)	2,4-D- <i>d</i> ₃ (g)	SDS- <i>h</i> ₂₅ (g)
1	0,1770	0,2092	0,4489	117	2	0,007	0,0173	-	-
2	0,1770	0,2092	0,4489	117	2	-	0,0105	-	-
3	0,1770	0,2092	0,4489	117	2	-	-	0,042	0,102

7.3 Resonancia Magnética Nuclear

Las 3 muestras se dejaron estabilizar por 24 h. a 27°C, donde posteriormente se traspasaron a tubos de RMN de 5mm. Los espectros de RMN fueron tomados a 300K en un espectrómetro Bruke Avance 400. Los espectros ²H-RMN fueron obtenidos sintonizando el equipo a la frecuencia de Larmor del deuterio (61,4 MHz). La secuencia de pulsos para medir T₁ de acuerdo al experimento T1R se encuentra en la .

Tabla 3 y el pulso de 90° medido para deuterio fue de 20μs. Para asegurar la reproducibilidad del sistema se realizó una segunda medición con muestras distintas de idénticas concentraciones en 2 equipos RMN Bruker Avance 400 (ver Apéndice 11.3).

Tabla 3 Secuencia valores de τ utilizados en el experimento T1IR

Pulso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
τ (s)	5	3	2	1	0.5	0.3	0.2	0.1	0.08	0.06	0.04	0.02	0.01	0.005	0.002	0.00001

7.4 Dinámica Molecular

Para el cálculo de las dinámicas moleculares se construyeron 2 cajas idénticas, de dimensiones X, Y, Z nm, donde, solo una de ellas presenta la molécula huésped (2,4-D). El número de especies presentes fue calculado a partir de las concentraciones experimentales (Tabla 4). El extracto de poroto de soja es una mezcla de 75% de fosfolípidos y 25% de ácidos grasos; todos reportados por Sigma-Aldrich en forma de composición porcentual en masa del producto.

Tabla 4 Composición de las cajas con especies para los cálculos de DM

Nombre	Abreviatura	Celda 1 Número	Celda 2 Número
Agua	SOL	15255	15255
Catión sodio	Na	425	425
Anión cloro	Cl	636	636
Ácido esteárico	AES	1	1
Ácido linoléico	ALI	16	16
Ácido linolénico	ALN	2	2
Ácido oléico	AOL	3	3
Ácido palmítico	APA	4	4
Decanol	DOH	84	84
Dioloilfosfatidilcolina	DOP	20	20
Palmitoil-oleil-fosfatidiletanolamina	POP	8	8
Anión dodecilsulfato	SDS	9	9
Catión tetradeciltrimetilamonio	TTA	220	220
Ácido 2,4-diclorofenol (2,4-D)	24D	2	0

La topología de las especies se obtuvieron a partir de diversas fuentes, pero todas calculadas y construidas para el campo de fuerzas GROMOS53a6 ya que se ha validado como un buen campo de fuerzas para la simulación de biomoléculas y membranas (Oostenbrink, Soares, Vegt, & Gunsteren, 2005); los ácido grasos (APA, AES, AOL, ALI y ALN) se modelaron con el programa Avogadro (Hanwell, Curtis, Lonie, Vandermeersch, Zurek, & Hutchison, 2012)

y posteriormente se obtuvieron las topologías y las cargas con el programa Dundee (Schüttelkopf & Aalten, 2004). Para la especie 2,4-D se siguió el mismo procedimiento, pero se calcularon las cargas con el programa Gaussian03rev2 (Frisch, et al., 2004). A través de una optimización de geometría ab-initio base 6-31G**(d,p) seguido por un cálculo para las cargas del tipo Merz-Kollman (MK), para el decanol y el catión tetradeciltrimetilamonio se utilizaron topologías empleadas en investigaciones anteriores (Bahamonde, 2013). Para los fosfolípidos dioleoilfosfatidilcolina y palmitoil-oleil-fosfatidiletanolamina se utilizaron topologías de la base de datos ATB (Malde, et al., 2011). Para el agua se utilizó el modelo SPC (Chaplin, 2013) incorporado en el paquete de programas GROMACS v4.5.5 (Spoel, Lindahl, Hess, Groenhof, Mark, & Berendsen, 2005), al igual que las especies Na⁺ y Cl⁻.

Como sistema de partida en ambas cajas se construyó una bicapa con condiciones de borde periódicas, utilizando una distribución aleatoria de las especies en cada monocapa, y posteriormente estas ordenadas en forma de bicapa (Figura 7-3),

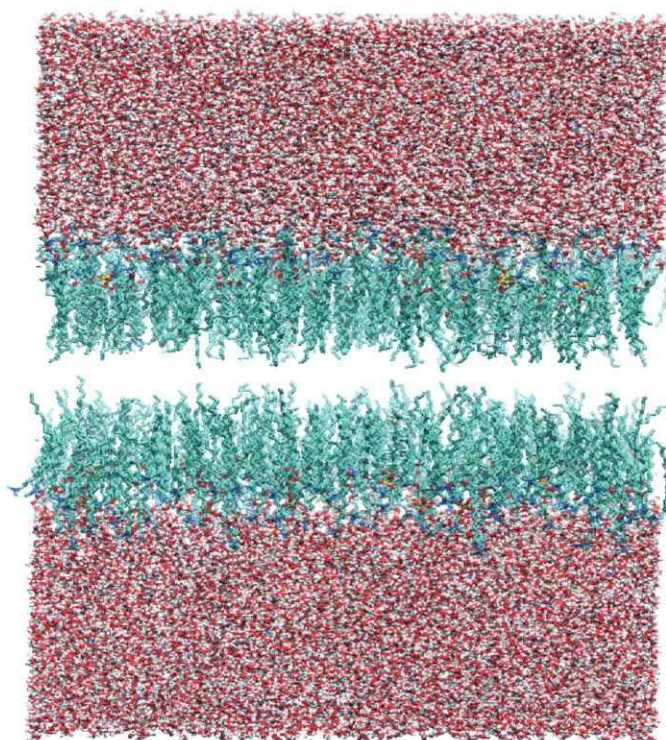


Figura 7-3 Distribución aleatoria en forma de bicapa seleccionada para los sistemas con y sin molécula huésped.

El cálculo de trayectorias y análisis de estas fueron llevadas a cabo utilizando el paquete de programas GROMACS v4.5.5 desarrollado por Berk Hess, David van der Spoel, Erik Lindahl y col. El tiempo de duración de las trayectorias fue de 50ns y el tiempo de integración de las simulaciones fue de 2fs (para más detalles de los parámetros de simulación utilizados consultar el Apéndice 11.1). Los cálculos de DM se realizaron en un clúster IBM iDataplex con 536 procesadores dedicados, llamado *Levque*, del Centro Nacional de Computación de Alto Rendimiento (NLHPC)/Centro de Modelamiento Matemático (CMM), Universidad de Chile. Para el análisis de la DM se utilizaron los programas de análisis incorporados en el paquete de programas GROMACS v4.5.5.

8 Resultados y Discusión

8.1 Síntesis de 2,4-D- h_3 y 2,4-D- d_3

Una vez realizada la síntesis del 2,4-D- h_3 se procedió a tomarle un espectro infrarrojo (IR) y compararlo con un espectro IR de la literatura (Figura 8-1)

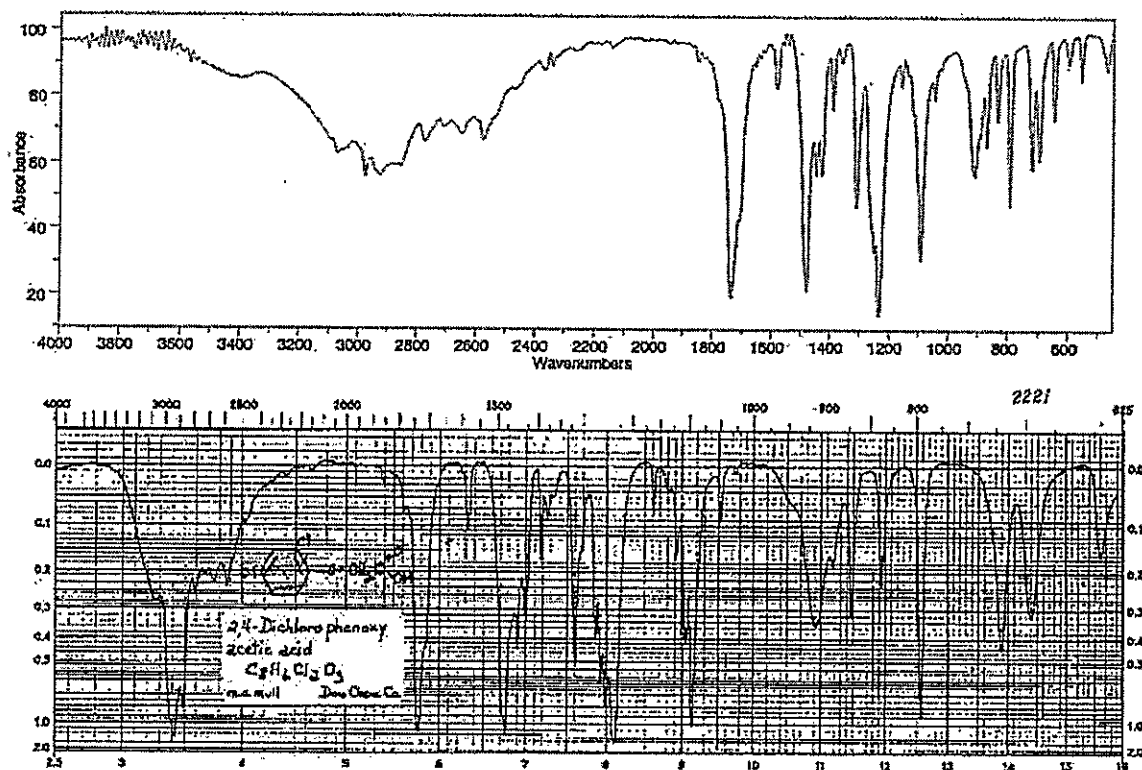


Figura 8-1 Comparación espectro IR obtenido (arriba) y de la literatura (abajo) para el ácido 2,4-diclorofenol, la diferencia de escalas (horizontal) es producto que el espectro superior posee una escala lineal, y el inferior posee una escala logarítmica.

Como se puede apreciar las señales del espectro superior concuerdan perfectamente con las señales del espectro de literatura (NIST) comprobando la obtención de un producto de alta pureza. Las diferencias apreciadas a simple vista son atribuibles a las diferentes escalas en el eje de la frecuencia.

Por el contrario cuando se sintetiza el 2,4-D- d_3 deuterado en el anillo aromático, la comparación de ambos espectros tiene ciertas dificultades (Figura 8-2), ya que se observa un desplazamiento general de los peaks y una disminución de la intensidad de estos atribuible a 2 factores, el primero es que la frecuencia de los modos vibracionales fundamentales para deuterios, por ejemplo el estiramiento C-D, son iguales a $(1/2)^{1/2}$ la frecuencia correspondiente para hidrógenos, produciéndose un corrimiento de las bandas; el segundo factor es que al cambiar hidrógenos estables, como son los del anillo aromático por deuterios se pierde la llamada resonancia de Fermi lo cual genera un estrechamiento de las bandas además de una disminución de las intensidades. (Billes, Endrédi, & Várady, 2001)

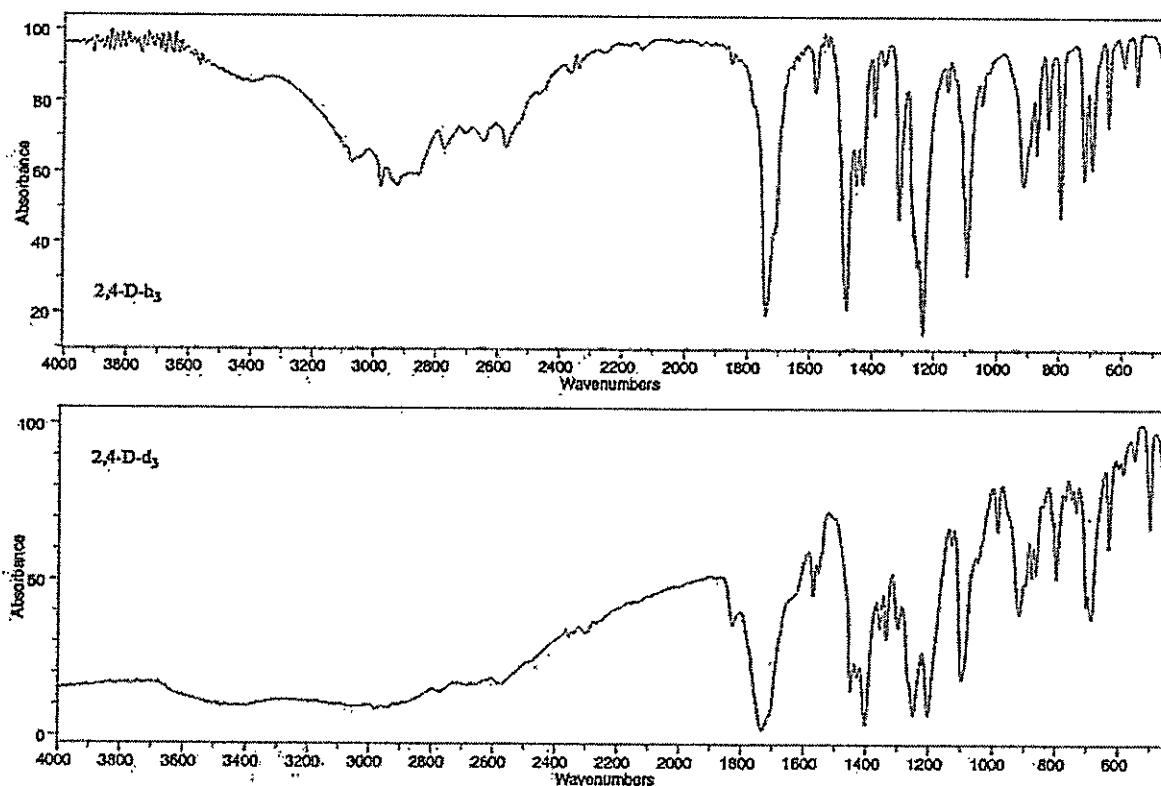


Figura 8-2 Comparación 2,4- h_3 (arriba) y 2,4- d_3 (abajo)

Para corroborar la presencia de 3 deuterios en el anillo aromático y así asegurarse que el proceso de cloración del anillo fue exitoso se tomó un espectro de deuterio del 2,4-D- d_3

dentro del agregado de CL (Figura 8-3). Además esto sirve para comprobar la incorporación de la molécula al CL.

Debido a que las señales de deuterio fueron débiles no se pudo realizar la integración directa de las señales del espectro, por lo que para obtener la razón de señales y así determinar el número relativo de deuterios presentes en el anillo aromático se utilizó un ajuste Lorentziano del espectro, omitiendo la señal del D_2O , ya que no es de interés (Figura 8-3). Los resultados de la integración y las razones entre señales se resumen en la Tabla 5. El área bajo la curva para ambas señales (a la izquierda de la señal de D_2O y a la derecha de la señal de D_2O) dan la misma razón 1,5:1 (aproximadamente 2:1), resultado coherente con un anillo aromático con 3 átomos de deuterio.

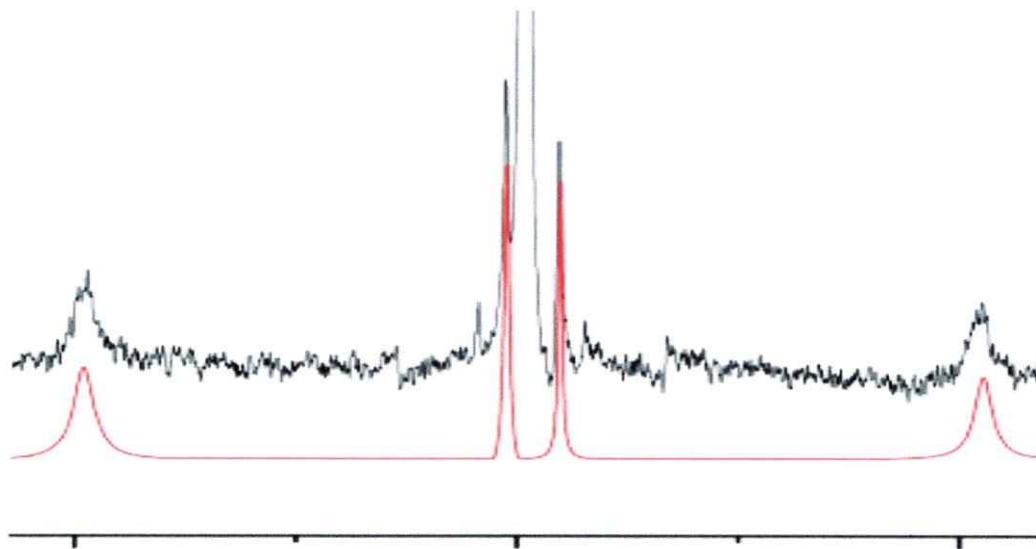


Figura 8-3 Espectro del $2,4-D-d_3$ (línea negra) y espectro ajustado a una lorentziana (línea roja), en el espectro del $2,4-D-d_3$ se pueden distinguir 5 peaks, el peak central (tercer peak) más grande corresponde a la señal de deuterio del D_2O , las señales a la izquierda del peak del agua y a la derecha, son equivalentes ya que corresponden a las señales de deuterio desdobladas cuadrupolarmente.

Tabla 5 Integrales de los peak del 2,4-D-*d*₃ y su razón

Peak*	Área bajo la curva	Razón
1	47301,4323	
2	31813,0259	1,4868:1 \approx 1,5:1
3	38575,8143	
4	57221,9785	1:1,4833 \approx 1:1,5

*de izquierda a derecha, omitiendo la señal de DHO.

8.2 Espectroscopia RMN

Se midieron los desdoblamientos cuadrupolares de deuterio para el SDS- d_{25} en las muestras sin huésped y con 2,4-D- h_3 (Figura 8-4), así como también para la muestra con 2,4-D- d_3 y SDS- h_{25} (Figura 8-3).

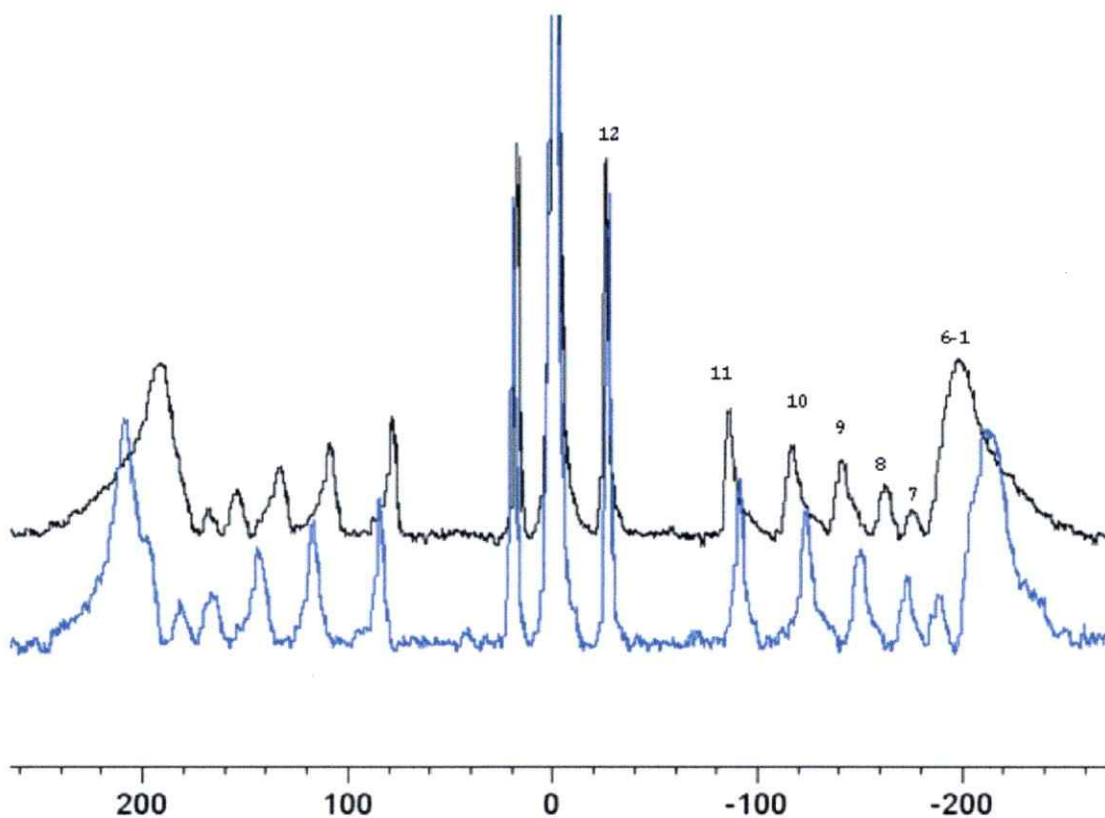


Figura 8-4 Espectros RMN de las muestras sin huésped (negro) y con huésped (azul), se puede observar que existe un aumento de los desdoblamientos cuadrupolares cuando se agrega 2,4-D, el cual se hace más importante para las señales de deuterio de los primeros carbonos del SDS- d_{25}

Se puede observar en la Figura 8-4 que existen siete señales de deuterio desdobladas y una señal muy intensa central, la cual pertenece al H₂O. Los siete desdoblamientos mayores están asociados a los distintos carbonos de la molécula sonda.

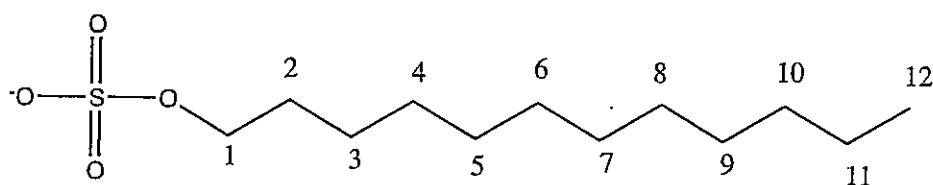


Figura 8-5 Numeración utilizada para la molécula sonda, SDS

El peak más próximo a la señal del agua debe integrar para 3 átomos de deuterio pues corresponde al carbono 12 (ver Figura 8-5), las señales que siguen hacia el extremo del espectro corresponden a los carbonos 11, 10, 9, 8 y 7 respectivamente, la última señal, la más grande, integra para 12 átomos de deuterio por tanto corresponde a los carbonos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Las señales de los deuterios de la molécula de 2,4-D- d_3 (Figura 8-3) muestran altos valores de desdoblamiento cuadrupolares, revelando que la molécula huésped se encuentra presente al interior del agregado y/o fuertemente asociada a éste.

Se midieron los desdoblamientos cuadrupolares de deuterio para cada señal, provenientes del SDS- d_{25} , los cuales corresponden a la distancia, en Hertz, de cada par de señales del espectro, para la muestra con y sin huésped (ver Tabla 6), junto con su error respectivo. El error estimado corresponde a la mitad de la distancia donde es incierta la posición del máximo del peak. De esta tabla es posible concluir que la incorporación de 2,4-D induce una disminución en la movilidad general del sistema, excepto para el DHO, para el cual el desdoblamiento cuadrupolar disminuye.

Tabla 6 $\Delta\nu_Q$ para las muestras sin y con huésped

Nº Carbono	$\Delta\nu_Q$ sin huésped (Hz)	\pm error	$\Delta\nu_Q$ con huésped (Hz)	\pm error
12	2805	2	2852	1
11	10633	8	10781	2
10	14601	10	14784	3
9	17689	13	18020	4
8	20423	14	20825	5
7	22192	16	22742	5
6	25030	18	25751	6
5	25030	18	25751	6
4	25030	18	25751	6
3	25030	18	25751	6
2	25030	18	25751	6
1	25030	18	25751	6
HDO	18	0,03	9	0,01

Al graficar la diferencia $\Delta\nu_Q$ entre las muestras con y sin huésped (Figura 8-6) se encuentra que el mayor efecto al agregar 2,4-D, se localiza en los primeros carbonos de la sonda (SDS), lo que sugiere que la región que está ocupando la molécula en el agregado es preferentemente la región interna de la interfase.

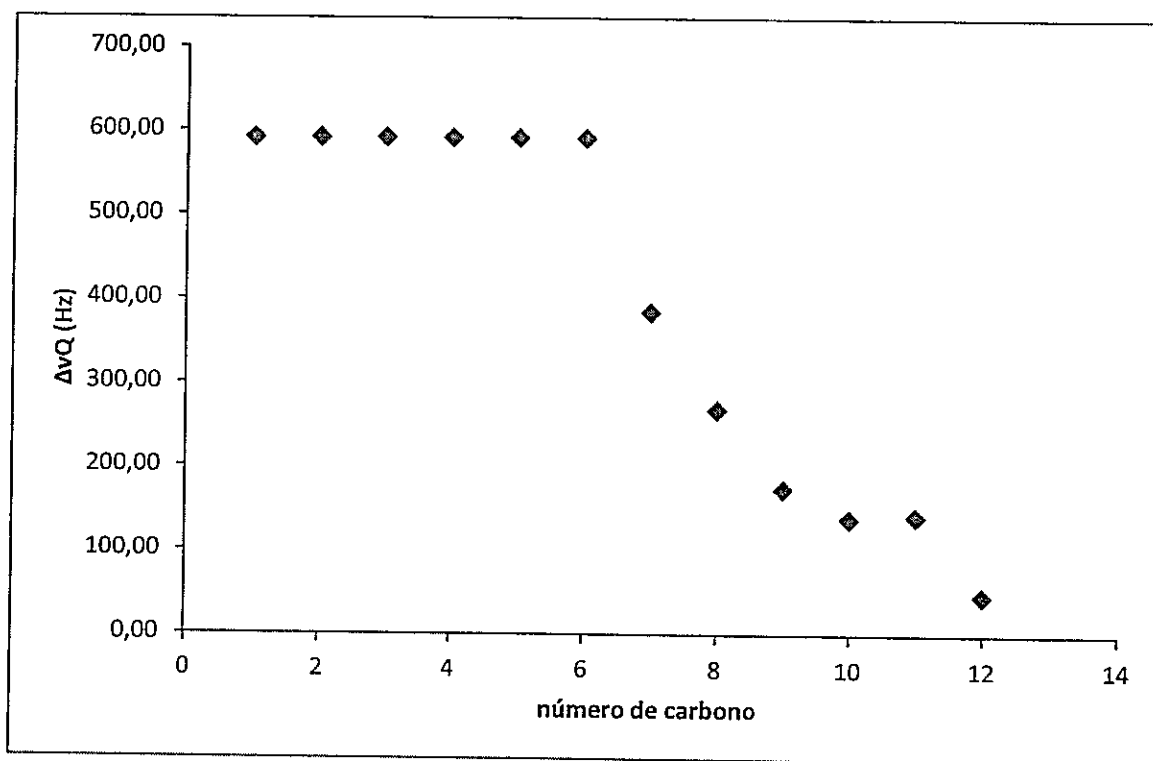


Figura 8-6 Diferencia entre los desdoblamientos cuadrupolares del sistema con huésped y el sistema sin huésped (con huésped menos sin huésped).

También se midieron los desdoblamientos cuadrupolares para el HDO los cuales dieron $8,4 \pm 0,01$ Hz para el sistema con molécula y $17,6 \pm 0,03$ Hz para el sistema sin molécula. Esta diferencia se puede atribuir a 3 causas: (1) la presencia del 2,4-D disminuye el número total de moléculas de HDO en la interfase, desplazándolas a la fase acuosa isotrópica, (2) la presencia de 2,4-D disminuye el grosor de la interfase, (poco probable considerando la baja concentración del herbicida), y (3) 2,4-D altera la dinámica del agua en la interfase, disminuyendo el grado de alineamiento con el campo magnético. Las causas (1) y (3) parecen lo más probable.

Por otra parte se midieron tiempos de relajación longitudinal, T_1 para cada señal de cada muestra (con y sin huésped) (Tabla 7) a partir del conjunto de espectros obtenidos del experimento T1IR (Figura 8-7)

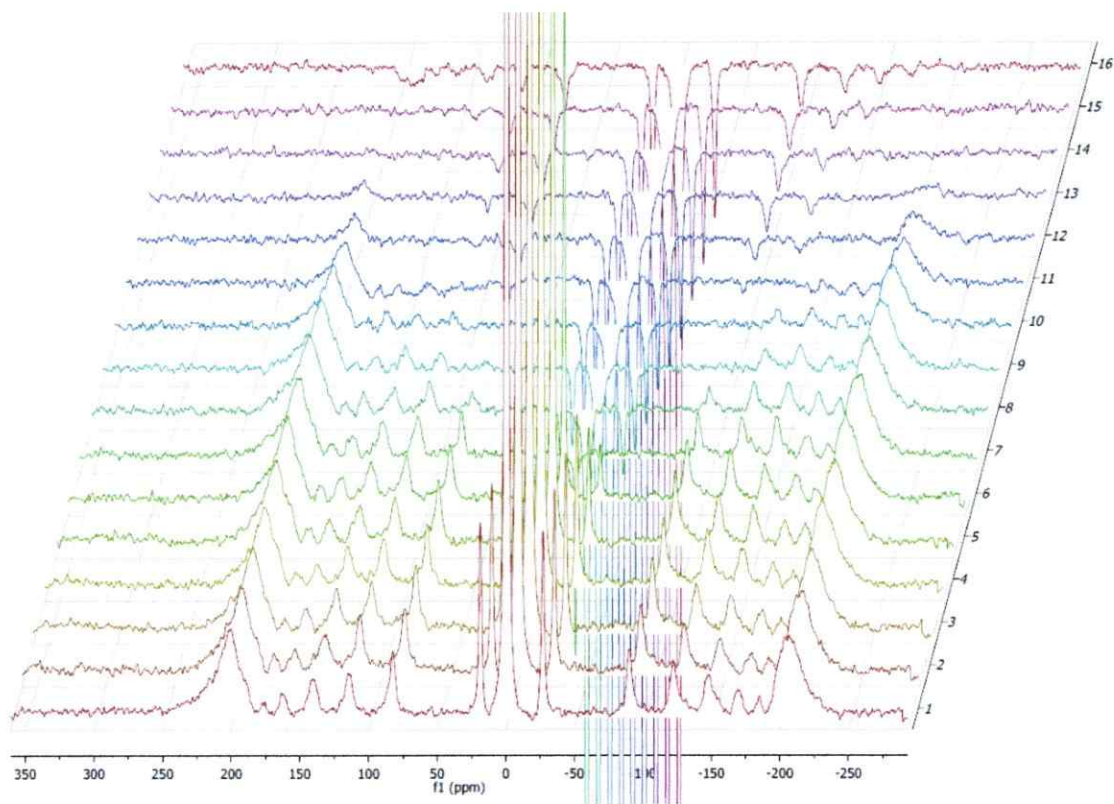


Figura 8-7 Set de espectros obtenidos a partir del experimento T1IR, se puede observar claramente el cambio de intensidad de la señal de HDO (peak central, el más intenso)

Tabla 7. Valores de T_1 para las muestras con y sin huésped y el HDO

Nº Carbono	T_1 (ms) sin 2,4-D	±error	T_1 (ms) con 2,4-D	±error
1	31	3	31	3
2	31	3	31	3
3	31	3	31	3
4	31	3	31	3
5	31	3	36	3
6	31	3	36	3
7	29	29	33	2466
8	39	44	32	61
9	74	19	65	12
10	84	13	83	5
11	116	6	109	6
12	324	3	300	9
HDO	334	7	389	28

Cuando se grafican Figura 8-8 se observa que en ambos existe un incremento de T_1 a medida que nos alejamos de la cabeza polar del SDS hacia el extremo apolar, esta aumento de movilidad se explica en términos de la disminución de la restricción rotacional que posee la cadena alifática del SDS a medida que se introduce en la región hidrofóbica del agregado.

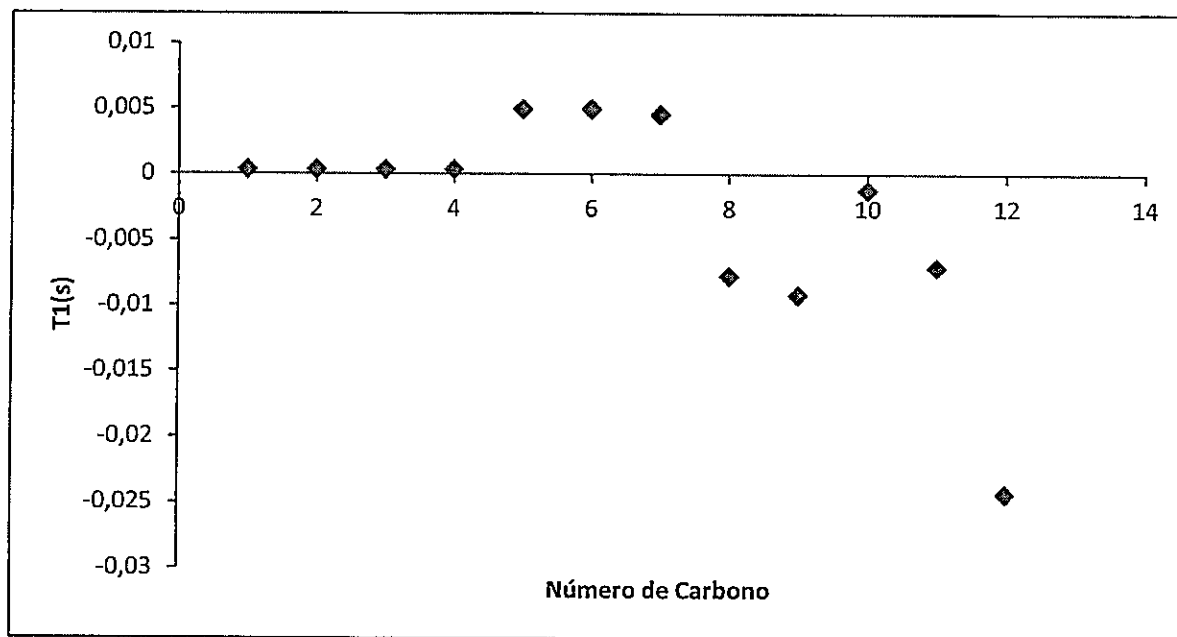


Figura 8-8 Gráfico de las diferencias de T1 experimentales para los sistemas con menos sin huésped

De la Tabla 10 y la figura 7-8 se aprecia una disminución en los T1 al incorporarse 2,4-D a la bicapa. Considerando que, como se discute en la sección 4.3.3, T1 es proporcional a la movilidad, este resultado es consistente con un aumento en el grado de alineamiento de las cadenas alifáticas al incorporar 2,4-D.

8.3 Dinámica Molecular

Para validar los valores de propiedades no medibles calculadas a partir de las simulaciones, se calcularon los desdoblamientos cuadrupolares para los sistemas con y sin huésped a 300K, empleando una dinámica de 120ns de duración (Figura 8-10) una vez alcanzado el equilibrio. Los resultados obtenidos del cálculo son graficados en la Figura 8-9, junto a los valores medidos experimentalmente.

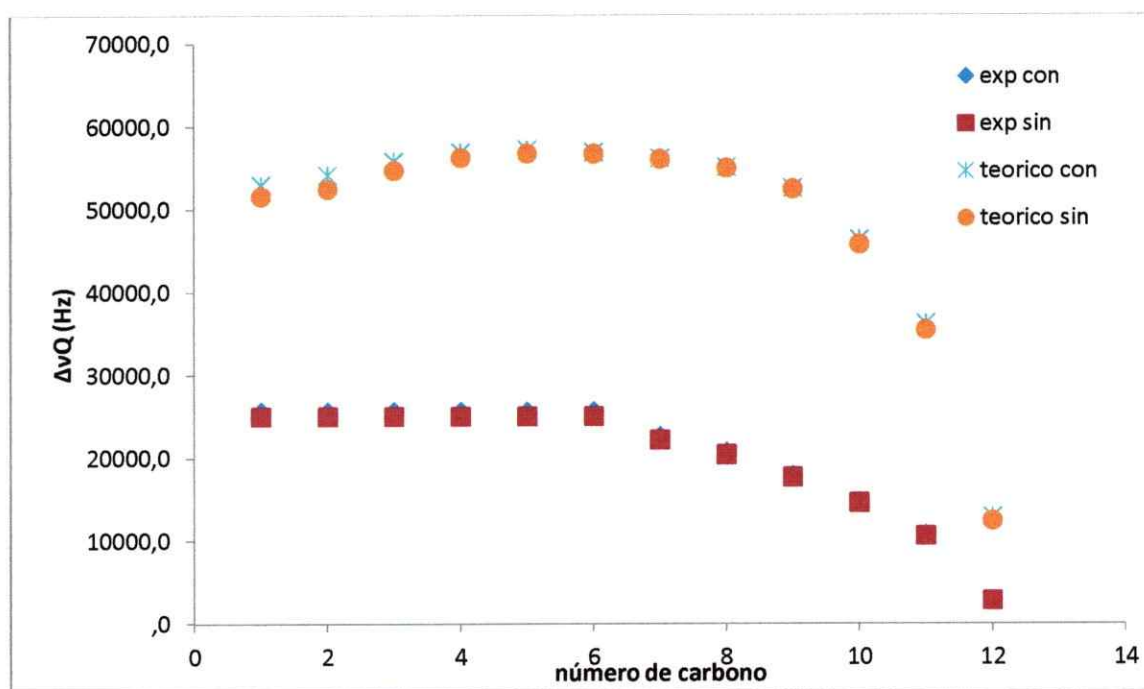


Figura 8-9 Desdoblamientos cuadrupolares con y sin molécula tanto experimentales como teóricos

Considerando las importantes desviaciones observadas en la Figura 8-9 y con el propósito de mejorar estos resultados, se aumentó gradualmente la temperatura durante 80ns hasta llegar a 338K, (0,475 °C/ns) lo cual mejoró notablemente el acuerdo entre los desdoblamientos cuadrupolares calculados y los experimentales, sin embargo se destruye el ordenamiento de bicapa del sistema formando un agregado que se muestra en la Figura 8-11.

De ahora en adelante todos los cálculos fueron realizados a partir de la dinámica de 80ns a 338K.

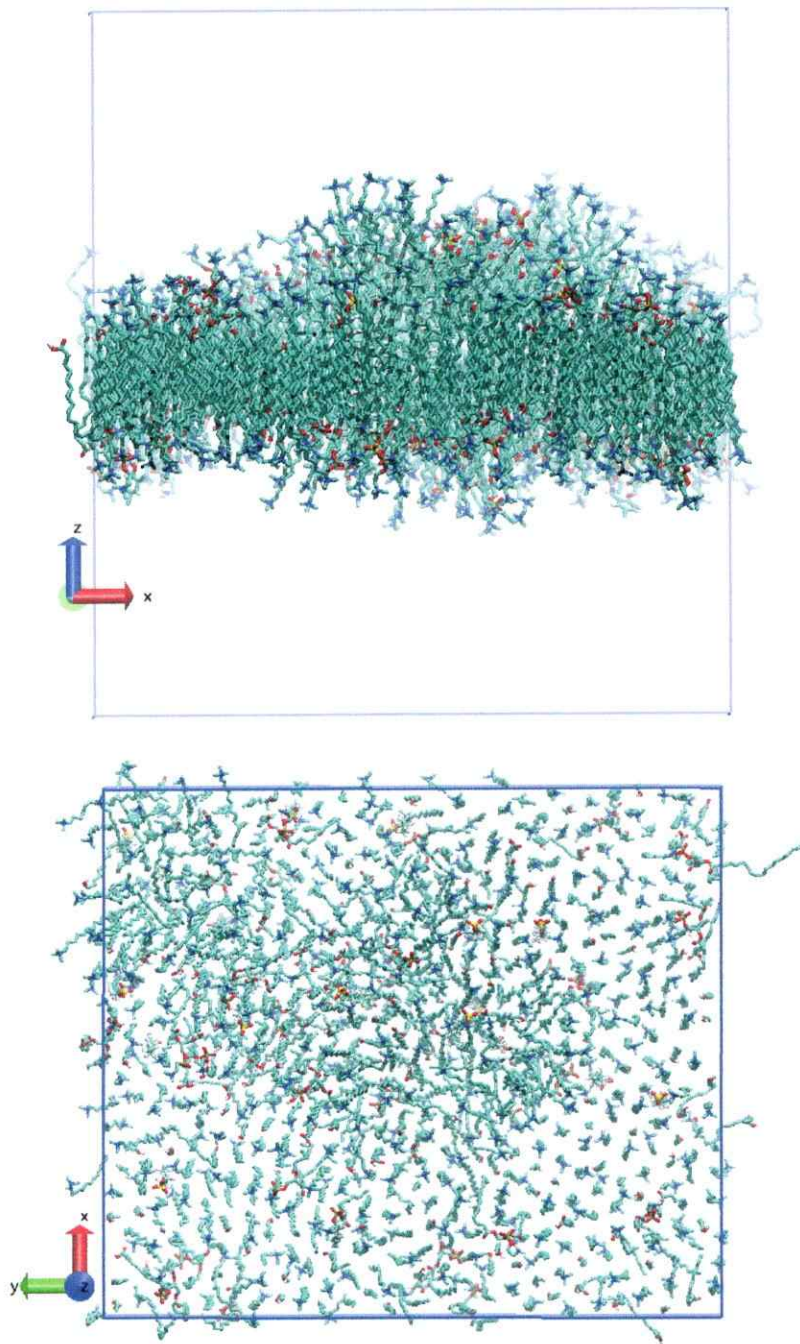


Figura 8-10 Estructura de bicapa después de 102ns de dinámica a 300K, imagen superior corresponde al perfil de la bicapa, y la imagen inferior corresponde a una vista superior.

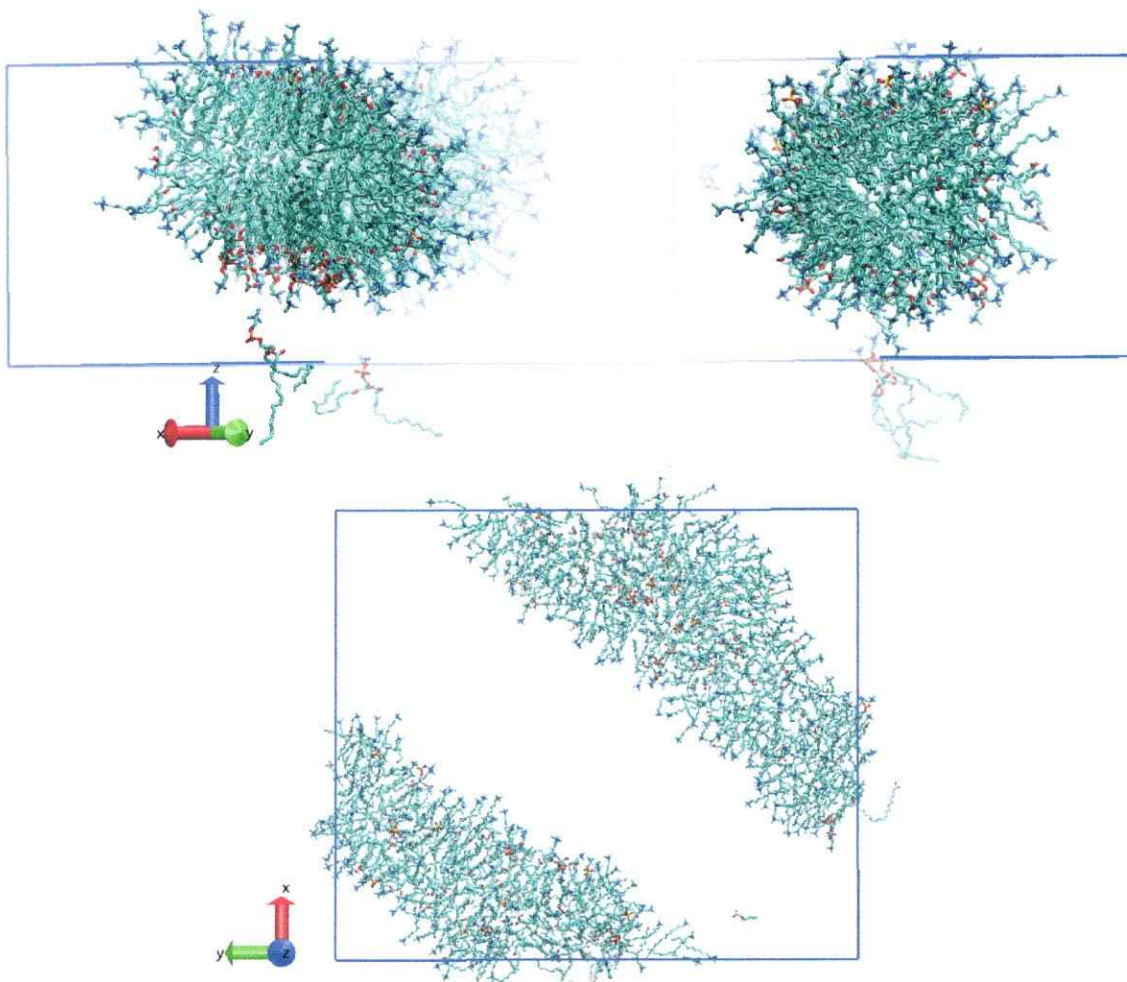


Figura 8-11 Estructura formada después de continuar la simulación por 80ns a 338K, la imagen superior corresponde a una vista desde una diagonal de la caja y la imagen inferior corresponde a una vista superior la cual hace notar la forma del agregado.

Los desdoblamientos cuadrupolares obtenidos de la nueva estructura se compararon con los desdoblamientos cuadrupolares experimentales, como una medida de la correcta descripción del sistema.

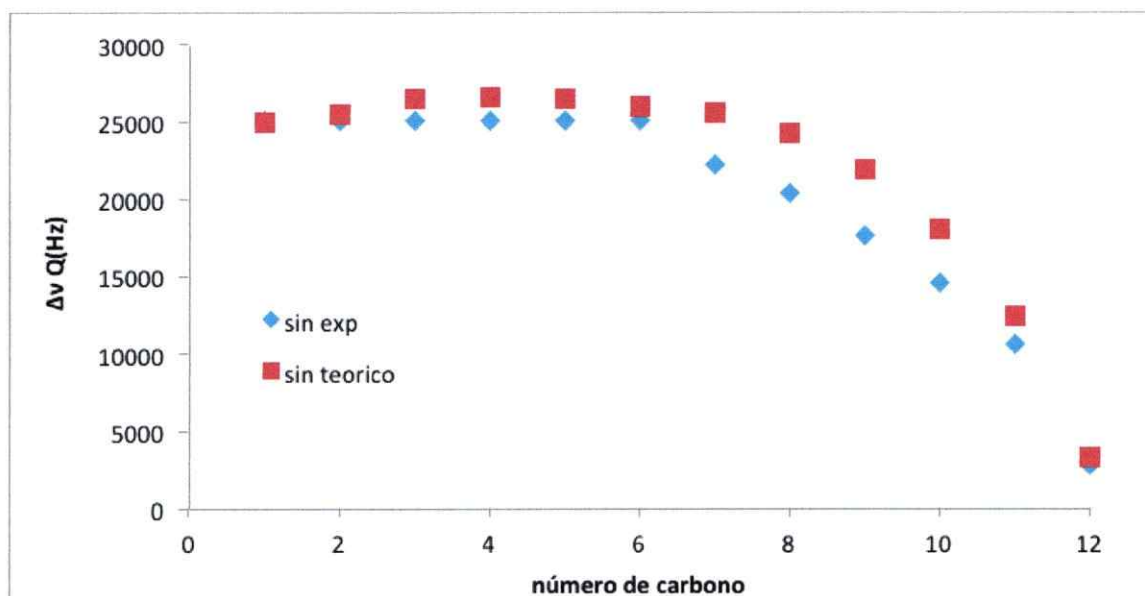


Figura 8-12 Gráfico de desdoblamiento cuadrupolar teórico (rojo) y experimental (azul) para el sistema sin huésped

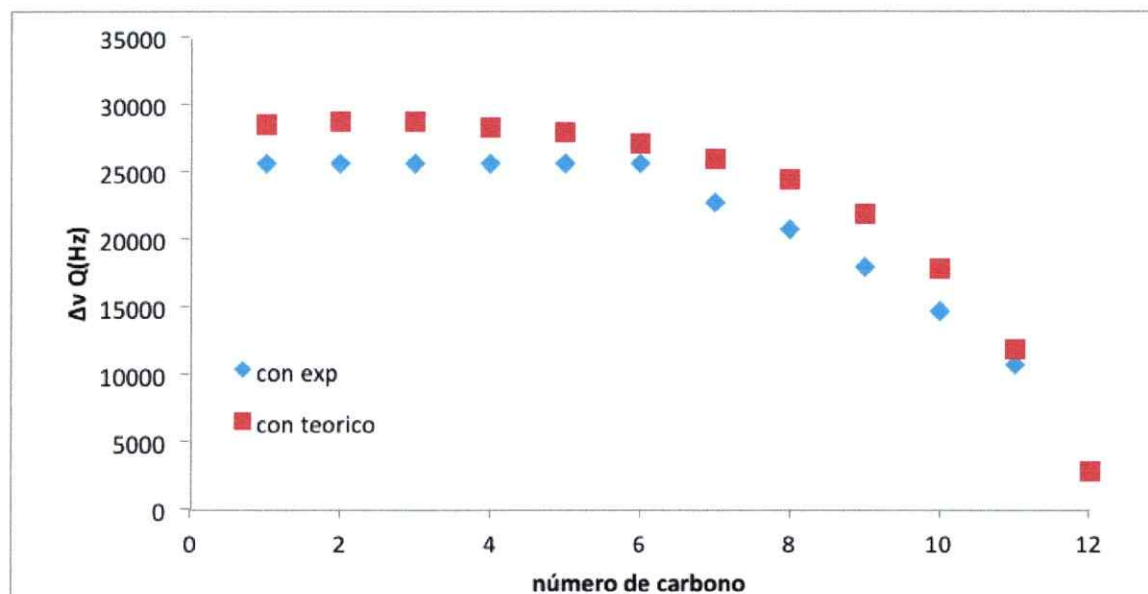


Figura 8-13 Gráfico de desdoblamiento cuadrupolar teórico (rojo) y experimental (azul) para el sistema con huésped

Como se observa en ambos gráficos existe un notable mejoramiento de los datos calculados respecto de sus homónimo a 300K. Además a esta temperatura (338K) se

calcularon los $\Delta\nu_Q$ para el agua en los sistemas con y sin huésped los cuales dieron valores que al compararlos con sus homónimos experimentales son coherentes en magnitud y diferencia (ver Tabla 8).

Tabla 8 Comparación $\Delta\nu_Q$ del HDO para los sistemas con y sin huésped experimentales y teóricos

	Con 2,4-D	Sin 2,4-D
Teórico	9,41 Hz	16,38 Hz
Experimental	8,4 Hz	17,6 Hz

Las diferencias observables más importantes en los $\Delta\nu_Q$ entre el sistema sin huésped y con huésped (Figura 8-6) inician en el carbono 1 y terminan en el carbono 6, estas diferencias pueden ser atribuida a que en dichos carbonos tiene la molécula de 2,4-D su ubicación promedio preferencial. Para corroborar esta suposición, se graficó la distancia del centro de masas del huésped respecto de cada grupo CD_2 de la molécula sonda y posteriormente se realizó un histograma, para obtener la frecuencia de dichas distancias (Figura 8-14).

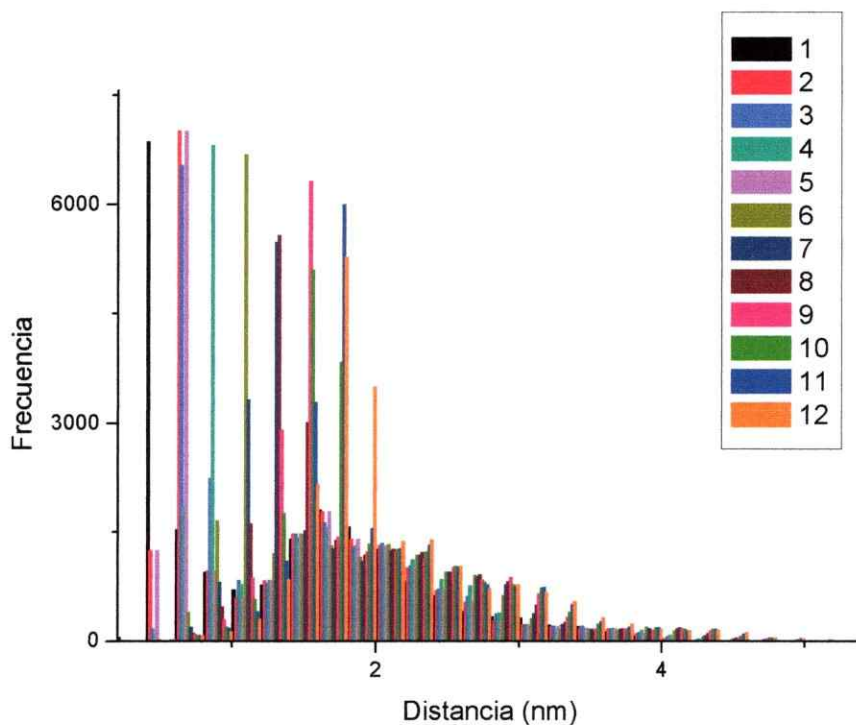


Figura 8-14 Histograma de distancia entre los carbonos del SDS (1, 2, 3, etc.) y el centro de masa del 2,4-D.

Como se observa la distancias más frecuentes corresponden a los carbonos 1 al 7, demostrando claramente que 2,4-D se distribuye en la región interior de la interfase, desapareciendo gradualmente a medida que nos distanciamos de la cabeza polar del SDS. Este resultado es coherente con los datos experimentales.

También estas diferencias se debe a que la presencia del 2,4-D produce cambios en el entorno del SDS, para comprobar esto, se calcularon funciones de distribución radial entre el centro de masa del SDS y el resto de las especies para los sistemas con (Figura 8-15) y sin (Figura 8-16) huésped a 338K.

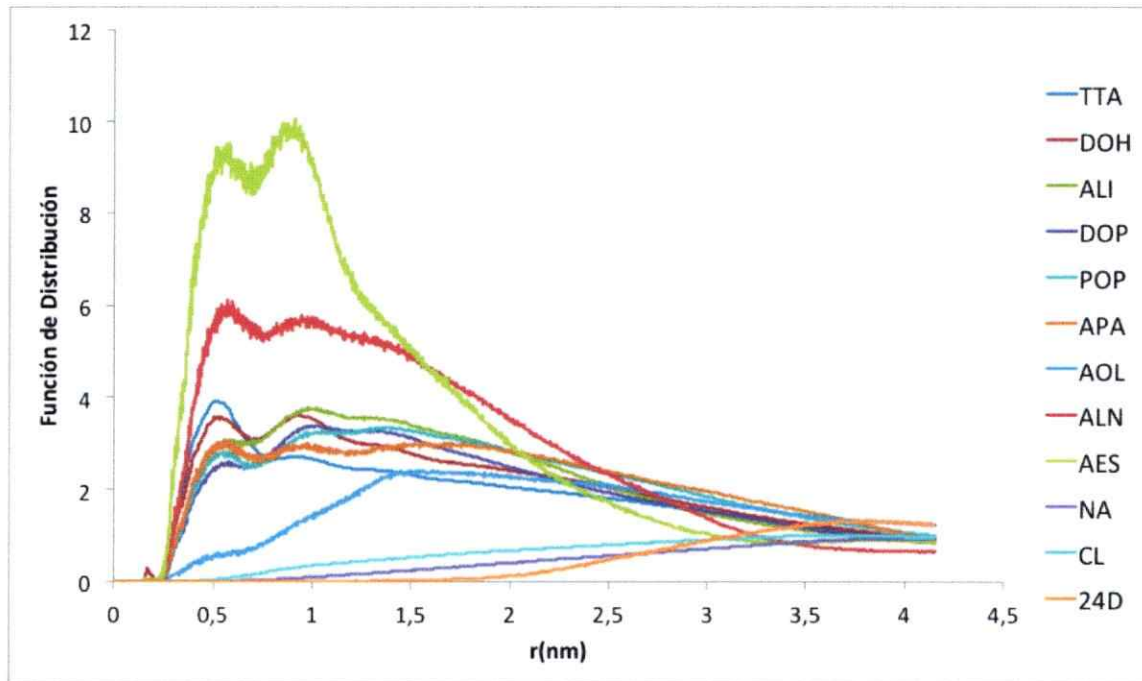


Figura 8-15 Función de distribución radial del SDS vs el resto de las especies para el sistema con molécula.

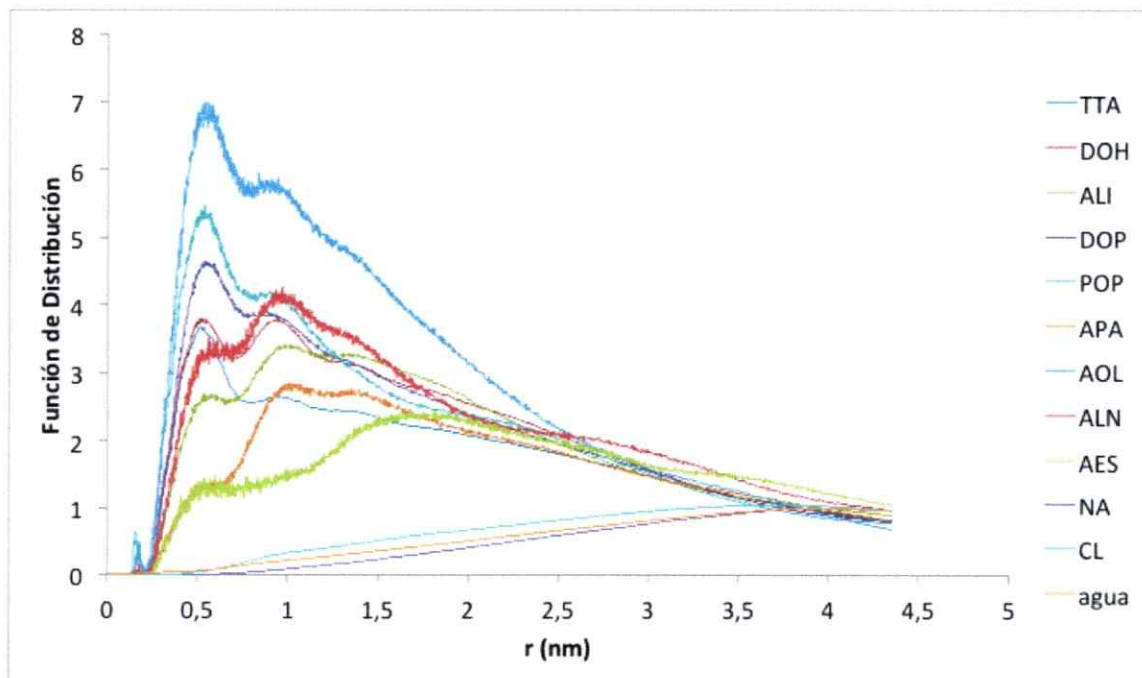


Figura 8-16 Función de distribución radial del SDS vs. El resto de las especies para el sistema sin molécula.

Como se puede notar la presencia del 2,4-D sí altera el entorno del SDS, se puede observar que para el sistema con huésped el ácido estearico (AES) y el ácido linoleico (ALN) son las únicas especies que superan un valor de 4 en la función de distribución radial, por el contrario para el sistema sin huésped las especies que superan un valor de 4 en la función de distribución radial son 3: los fosfolípidos (DOP y POP) y el ácido oleico (AOL). Estos cambios en el entorno del SDS pueden ser atribuibles a la presencia del 2,4-D como grupo polar que altera la distribución de especies y cargas propia del agregado sin huésped. Para observar esto, se estudió el entorno del 2,4-D mediante el uso de funciones de distribución radial.

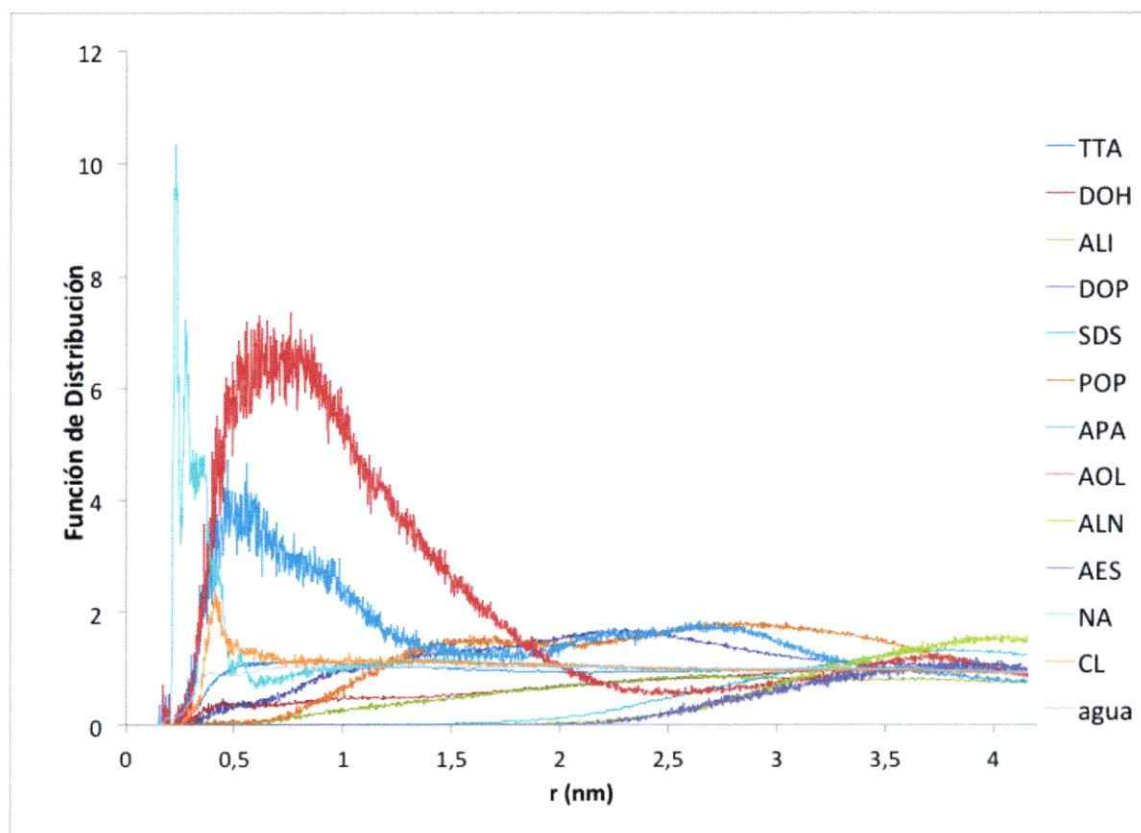


Figura 8-17 Función de distribución radial del 2,4-D vs el resto de las especies.

Como se observa en la Figura 8-17 el 2,4-D claramente altera el entorno eléctrico del agregado al arrastrar hasta si un gran número de cationes sodio los que a su vez arrastran una gran cantidad de aniones cloro.

Se calcularon tiempos de correlacion rotacional de los carbonos del SDS para obtener los T_1 teoricos y compararlos con los T_1 experimentales, para comprobar si la dinámica rotacional calculada es coherente con los resultados experimentales. Estos cálculos se muestran en las Figuras 7-18 y 7-19 para los sistemas sin y con molécula respectivamente.

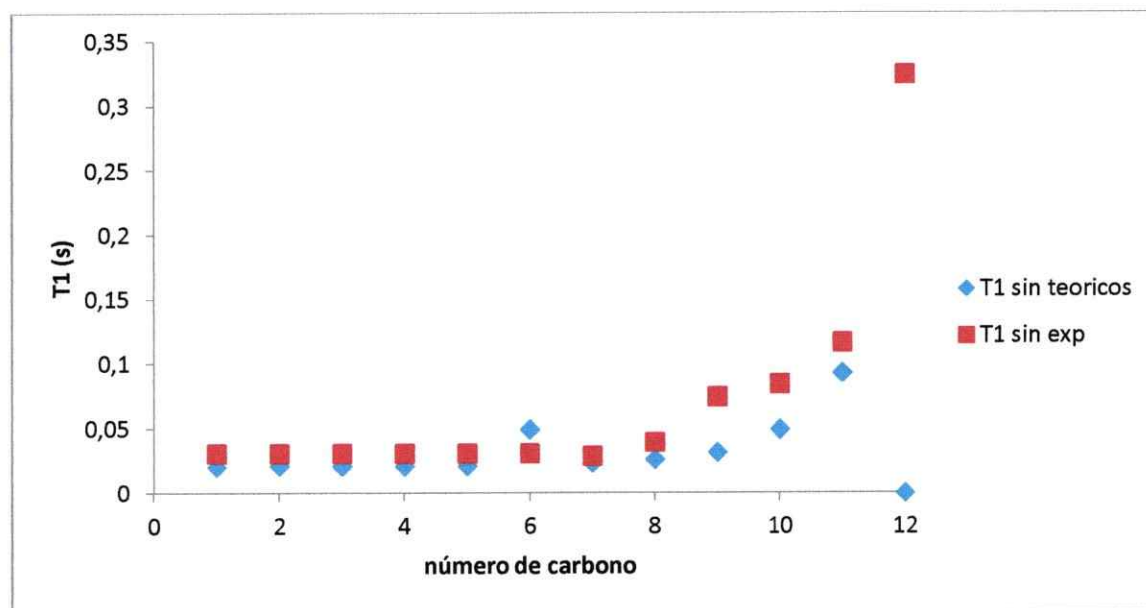


Figura 8-18 Gráfico de los valores de T_1 teóricos vs los T_1 experimentales para el sistema sin molécula.

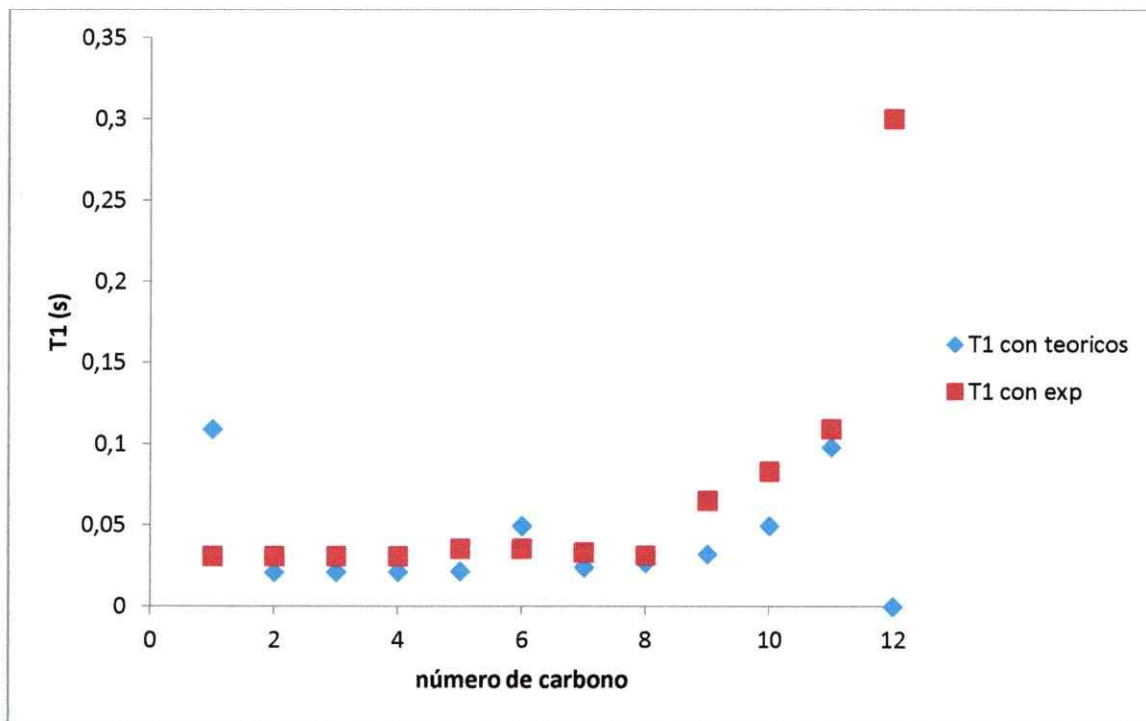


Figura 8-19 Gráfico de los valores de T_1 teóricos y experimentales para el sistema con huésped.

En ambos gráficos el T_1 teorico para el carbono 12 no se considera producto que sus valores calculados son 1,61s para el sistema sin molécula y 1,62s para el sistema con molécula, valores que se diferencian de los medidos en 395% y 441% por sobre el valor experimental. Este error puede ser atribuido a que el grupo CD_3 el cual corresponde al extremo de la cadena del SDS, presenta una dinámica distinta del resto de los grupos CD_2 , lo cual obliga a tener consideraciones de tipo traslacional para el calculo de T_1 .

Ademas tambien se calcularon los T_1 del agua para los sistemas con y sin huesped. los que se pueden observar en la Tabla 9

Tabla 9 Comparación T1 para HDO para los sistemas con y sin huésped, teóricos y experimentales

	Con 2,4-D	Sin 2,4-D
teóricos	4145ms	4116ms
experimentales	389ms	334ms

El excelente acuerdo entre teoría y experimento nos permite decir que la simulación esta siendo un buen descriptor de la dinámica del agregado.

Para esclarecer la naturaleza de las diferencias de los Δv_Q para el HDO se calculó el número total de puentes de hidrógeno que forma el agregado con 2,4-D con las moléculas de H₂O y ese valor se comparo con el número de puentes de hidrógeno que realiza el agregado sin 2,4-D, en un lapso de tiempo de 1000ps. Como resultado se obtuvo que el sistema con huesped realiza un total de 374 puentes de hidrógeno, mientras que el sistema sin huesped realiza un total de 395 puentes de hidrógeno. Considerando que el desdoblamiento del HDO disminuye a la mitad al incorporar 2,4-D, este no parece ser el motivo de la diferencia observada.

Para notar si la molécula de 2,4-D penetra el agregado se gráfico la cordenanda Z de las 2 moléculas de 2,4-D que incorporadas, una de ellas, la molécula 2,4-Di se inserto en la zona de la interfase del sistema, mientras que la otra, la 2,4-Db se inserto en la zona acuosa (bulk) próxima al agregado, ademas se gráficaron los centros de masas de la mitad superior e inferior de la bicapa inicial (antes que se formara el agregado), se puede notar que la distancia entre ambas mitades, a pesar de romperse la estructura de bicapa la distancia de ambos centros de masas es constate a lo largo del eje Z. Como se puede notar en la Figura 7-17 las moléculas de 2,4-D no cruzan el agregado, solamente saltan de un lugar a otro dentro de una ubicación preferencial la cual es en las proximidades a la interfase, siendo esta situación similar para ambas moléculas. Se puede notar que las moléculas saltan hacia extremos de la

caja en el eje Z, esto es producto de las condiciones de borde periodicas, ya que al descender una molécula más allá de los limites de la caja, está aparece en la parte superior de la misma.

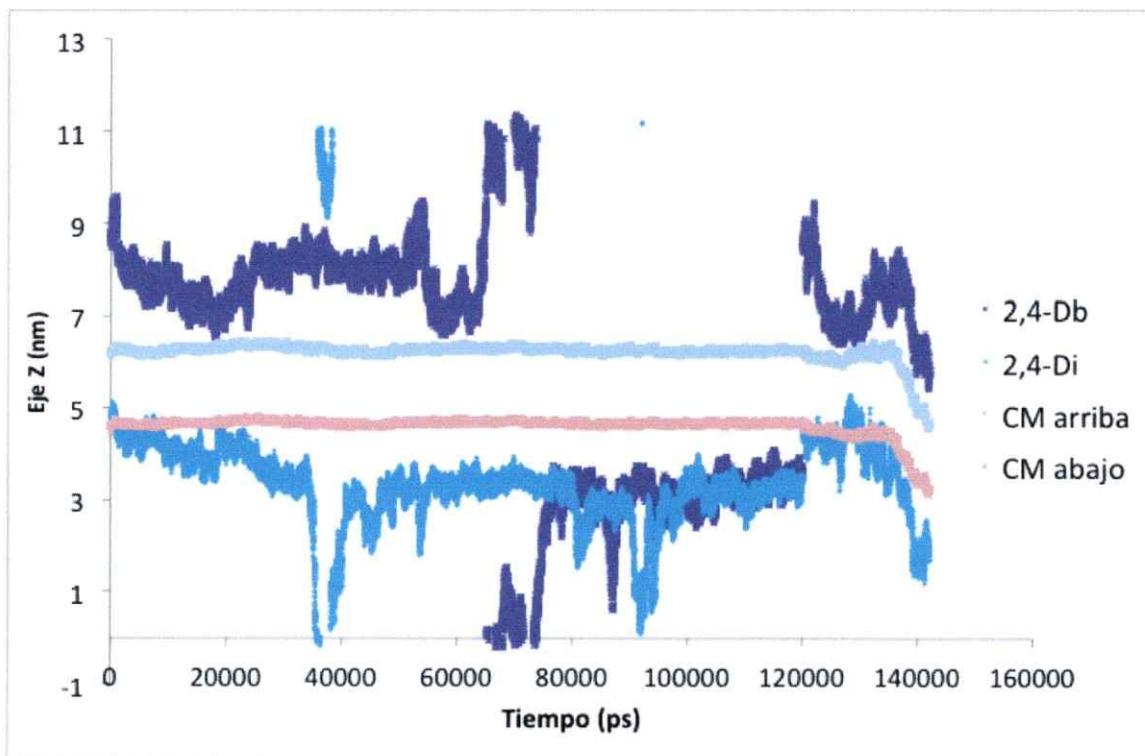


Figura 8-20 Gráfico de la coordenada Z vs el tiempo de las moléculas de 2,4-Di (línea morada) y 2,4-Db (línea azul). El 2,4-Di fue ubicado inicialmente en la región de la interface y el 2,4-Db fue ubicado inicialmente en la región acuosa (2,4-Db). Las líneas gris y café corresponden a los centros de masas de la parte superior e inferior del agregado respectivamente.

Se calcularon las interacciones por puentes de hidrogeno que realiza la parte polar del 2,4-D y la parte apolar con la parte acuosa (Figura 8-21) en un lapso de tiempo de 1000ps.

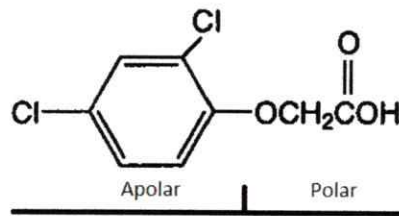


Figura 8-21 2,4-D dividido en 2 partes, una apolar y otra polar

Como se puede apreciar en la Figura 8-22 que la parte apolar no genera interacciones por puentes de hidrógeno en la fase acuosa en comparación con la parte polar que genera en promedio 3,7 puentes de hidrógeno en 1000ps. Esta evidencia explica la posición preferencial del 2,4-D en las inmediaciones de la interface sugiriendo que la orientación del 2,4-D sería con la parte apolar orientada hacia la fase acuosa y la parte polar orientada hacia el interior hidrofóbico del agregado.

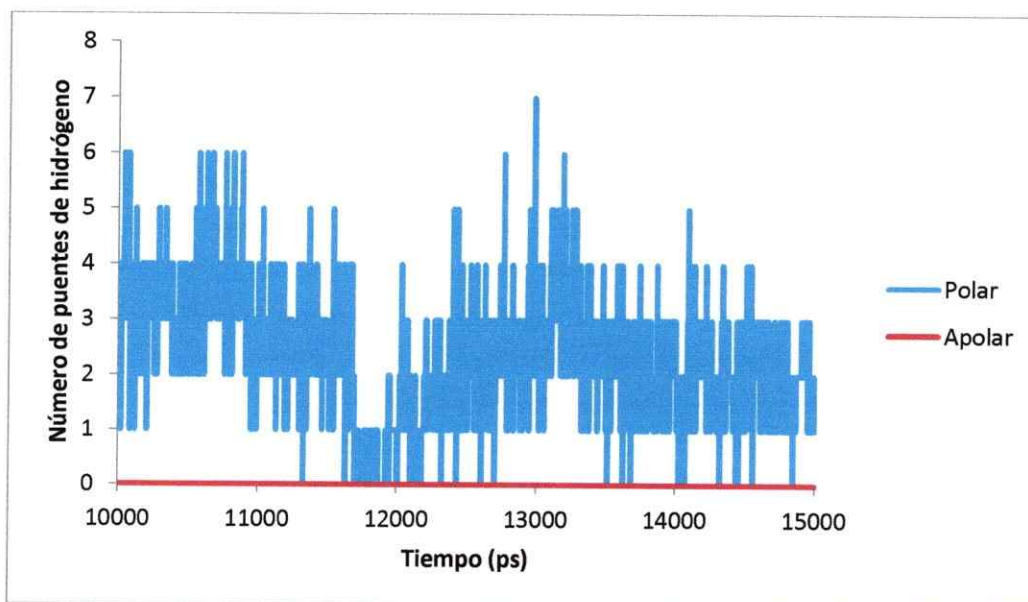


Figura 8-22 Número de puentes de hidrógeno de la molécula de 2,4-D vs tiempo.

Por otro lado se examinó la orientación promedio de las moléculas de 2,4-D en el sistema a través del tiempo, tomando los histogramas del ángulo que forman con un vector seleccionado dentro de la molécula Figura 8-23 contra el eje Z como referencia.

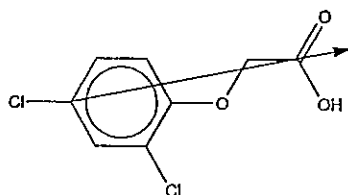


Figura 8-23 Vector seleccionado dentro de la molécula de 2,4-D.

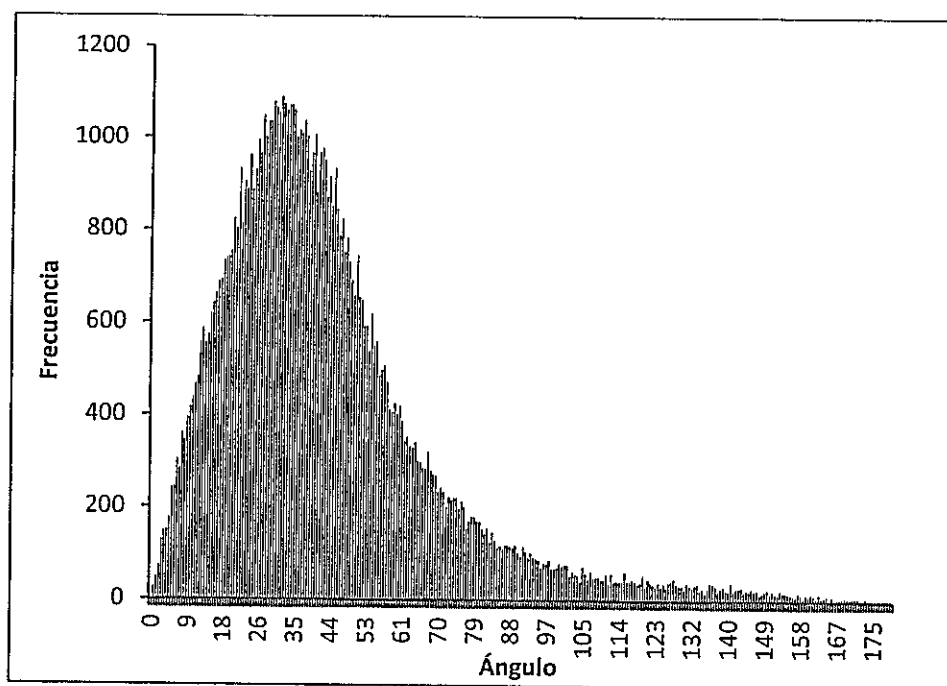


Figura 8-24 Histograma de ángulos para la molécula de 2,4-D inicialmente ubicada en la interface

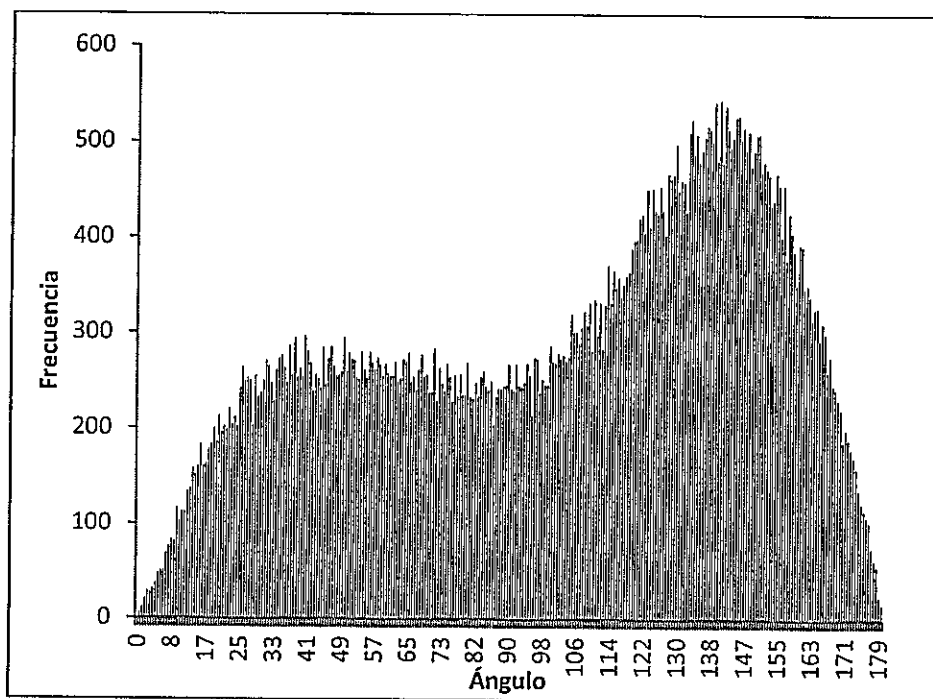


Figura 8-25 Histograma de ángulos para la molécula de 2,4-D inicialmente ubicada en la fase acuosa

Como se observa de las Figuras 7-24 y 7-25 la molécula de 2,4-Di posee una orientación preferencial entorno a los 30° , y la molécula 2,4-Db posee un ángulo preferencial en torno a las 140° pero otro menos definido en torno a los 30° respecto del eje Z del sistema.

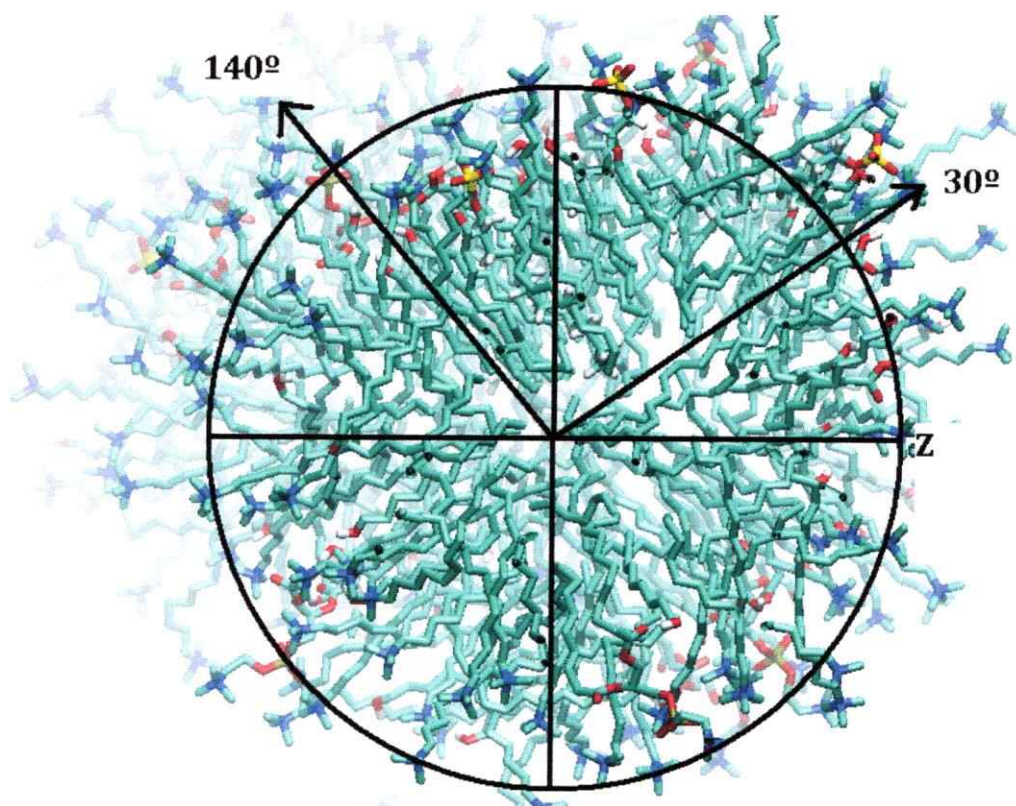


Figura 8-26 Corte transversal del agregado y la orientación de las moléculas de 2,4-D representada por 2 vectores, la cabeza del vector (punta de la flecha) representa el lado polar de la molécula, mientras que el otro extremo representa la parte apolar.

Esto significa que la parte polar de la molécula se encuentra orientada hacia el bulk, mientras que la parte apolar (anillo aromático) se encuentra orientada hacia la región hidrofóbica, como se muestra en la Figura 7-26.

9 Conclusiones

- Los datos experimentales permiten concluir que el 2,4-D se incorpora al agregado. (desdoblamientos en 2,4-D-d₃).
- La ubicación preferencial del 2,4-D en el agregado es la interfase.
- La orientación preferencial es con la parte polar hacia el solvente y la apolar hacia la región hidrofóbica (interior de la bicapa).
- El 2,4-D NO cruza el agregado lo que hace suponer que su toxicidad podría no ser consecuencia de su ingreso al interior de la célula.
- La incorporación del 2,4-D a la membrana aumenta los desdoblamientos cuadrupolares lo que significa que aumenta la rigidización del sistema. (de acuerdo con su modo de acción en vegetales)
- La toxicidad del 2,4-D puede ser atribuida a que produce una disminución de la plasticidad mecánica de la membrana plasmática.

10 *Agradecimientos*

- Al profesor Ramiro Araya por facilitarme MnO_2 necesario para la síntesis del ácido 2,4-D
- Al centro de supercómputo del NLHPC (ECM-02) por facilitarme la infraestructura computacional para el cálculo de las dinámicas de esta investigación.
- A los candidatos a doctor Víctor Bahamonde y Rodrigo Ruiz por las interminables ayudas, comentarios y conversaciones las cuales fueron de inmensa utilidad para el desarrollo de ésta investigación.
- Al doctor Hernán Ahumada por ayudarme en los momentos más críticos de la investigación y además por ayudarme en la construcción de esta tesis.
- Al doctor Rodrigo Montecinos por conseguir la posibilidad de medir espectros RMN utilizando la infraestructura facilitada por la PUC.
- Al profesor Boris Weiss por sus interminables recomendaciones para mejorar y perfeccionar este trabajo, sin su orientación esto no habría sido posible.
- Al Profesor Juan Guerrero de la facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile por facilitarnos el equipo RMN para las mediciones.

11 Apéndice

11.1 Parámetros usados para la simulación.

En Gromacs para iniciar la simulación se debe definir todos los parámetros los cuales establecen las condiciones de simulación que se desean, estos parámetros se ingresan en un archivo de extensión .mdp el cual contiene toda esa información.

A continuación se adjuntan la información contenida en los mdp utilizados, tanto para el sistema con molécula como sin molécula.

```
; Run parameters
integrator      = md                ; leap-frog integrator
nsteps         = 44750000          ; 0.002 * 44750000 = 89500 ps (89.5 ns)
dt             = 0.002             ; 2 fs
; Output control
nstxout        = 2000              ; save coordinates every 4 ps
nstvout        = 2000              ; save velocities every 4 ps
;nstxtcout     = 1000              ; xtc compressed trajectory output every 2
ps
nstenergy      = 2000              ; save energies every 4 ps
nstlog         = 2000              ; update log file every 4 ps
energygrps     = TTA DOH DOP POP SDS ALI ALN AES AOL APA 24D

; Bond parameters
continuation    = yes              ; Restarting after NPT
constraint_algorithm = lincs       ; holonomic constraints
constraints     = all-bonds        ; all bonds (even heavy atom-H bonds)
constrained
lincs_iter     = 1                 ; accuracy of LINCS
lincs_order    = 4                 ; also related to accuracy
; Neighborsearching
ns_type        = grid              ; search neighboring grid cels
nstlist        = 5                 ; 10 fs
rlist          = 1.2               ; short-range neighborlist cutoff (in nm)
rcoulomb       = 1.2               ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw           = 1.2               ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
```

```

coulombtype = PME                ; Particle Mesh Ewald for long-range
electrostatics
pme_order   = 4                  ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16          ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl      = Nose-Hoover       ; More accurate thermostat
tc-grps     = system            ; three coupling groups - more
accurate
tau_t       = 0.5                ; time constant, in ps
ref_t       = 338                ; reference temperature, one for each
group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl      = Parrinello-Rahman ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype  = semiisotropic      ; uniform scaling of x-y box vectors,
independent z
tau_p       = 2.0                ; time constant, in ps
ref_p       = 1.0 1.0 1.0        ; reference pressure, x-y, z (in bar)
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 ; isothermal compressibility, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc         = xyz                ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr    = EnerPres           ; account for cut-off vdW scheme
; Velocity generation
gen_vel     = no                 ; Velocity generation is off
; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing   = single
; Number of time points to use for specifying annealing in each group†
annealing_npoints = 4
; List of times at the annealing points for each group
annealing_time = 0 7500 47500 49500
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing_temp = 300 330 330 338

```

11.2 Script

Un script es un pequeño programa (respecto de líneas de código) el cual hace tareas relativamente sencillas. En esta investigación se crearon scripts para pesquisar la evolución de los desdoblamientos cuadrupolares a partir de los parámetros de orden cuando se hacían cambios de temperatura, el código de dicho script se adjunta a continuación:

```
#!/bin/bash
while getopts "a:b:c:d:e:f:i:j::h" opt
do
case $opt in
a ) var=$OPTARG;; #nombre de su trr con molecula
b ) var1=$OPTARG;; #nombre de su tpr con molecula
c ) var2=$OPTARG;; #nombre de su trr sin molecula
d ) var3=$OPTARG;; #nombre de su tpr sin molecula
e ) t1=$OPTARG;; #tiempo inicial con molecula en ps
f ) t2=$OPTARG;; #tiempo final con molecula en ps
i ) t1_s=$OPTARG;; #tiempo inicial sin molecula en ps
j ) t2_s=$OPTARG;; #tiempo final sin molecula en ps
h ) echo -e "opciones:\n -a = trr con molecula\n -b = tpr con molecula\n
-c = trr sin molecula\n -d = tpr sin molecula\n -e = tiempo inicial
(ps)\n -f = tiempo final (ps)\n -i = tiempo inicial sin molecula en ps\n
-j = tiempo final sin molecula en ps"
exit 1;;
esac
done

#limpiar espacio de backups
rm *#
#g_order con molecula
g_order -f $var -n SDS_C1_sm.ndx -s $var1 -od cam.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C2_sm.ndx -s $var1 -od cal.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C3_sm.ndx -s $var1 -od cak.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C4_sm.ndx -s $var1 -od caj.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C5_sm.ndx -s $var1 -od cai.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C6_sm.ndx -s $var1 -od cah.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C7_sm.ndx -s $var1 -od cag.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C8_sm.ndx -s $var1 -od caf.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C9_sm.ndx -s $var1 -od cae.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C10_sm.ndx -s $var1 -od cad.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C11_sm.ndx -s $var1 -od cac.xvg -b $t1 -e $t2
g_order -f $var -n SDS_C12_sm.ndx -s $var1 -od cab.xvg -b $t1 -e $t2
#g_order sin molecula
g_order -f $var2 -n SDS_C1_sm.ndx -s $var3 -od cam1.xvg -b $t1_s -e $t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C2_sm.ndx -s $var3 -od call.xvg -b $t1_s -e $t2_s
```

```

g_order -f $var2 -n SDS_C3_sm.ndx -s $var3 -od cakl.xvg -b $t1_s -e $t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C4_sm.ndx -s $var3 -od cajl.xvg -b $t1_s -e $t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C5_sm.ndx -s $var3 -od cail.xvg -b $t1_s -e $t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C6_sm.ndx -s $var3 -od cah1.xvg -b $t1_s -e $t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C7_sm.ndx -s $var3 -od cagl.xvg -b $t1_s -e $t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C8_sm.ndx -s $var3 -od caf1.xvg -b $t1_s -e $t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C9_sm.ndx -s $var3 -od cael.xvg -b $t1_s -e $t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C10_sm.ndx -s $var3 -od cadl.xvg -b $t1_s -e
$t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C11_sm.ndx -s $var3 -od cac1.xvg -b $t1_s -e
$t2_s
g_order -f $var2 -n SDS_C12_sm.ndx -s $var3 -od cabl.xvg -b $t1_s -e
$t2_s
#tail con molecula
tail -l cam.xvg > cam
tail -l cal.xvg > cal
tail -l cak.xvg > cak
tail -l caj.xvg > caj
tail -l cai.xvg > cai
tail -l cah.xvg > cah
tail -l cag.xvg > cag
tail -l caf.xvg > caf
tail -l cae.xvg > cae
tail -l cad.xvg > cad
tail -l cac.xvg > cac
tail -l cab.xvg > cab
#tail sin molecula
tail -l cam1.xvg > cam1
tail -l call.xvg > call
tail -l cak1.xvg > cak1
tail -l caj1.xvg > caj1
tail -l cail.xvg > cail
tail -l cah1.xvg > cah1
tail -l cagl.xvg > cagl
tail -l caf1.xvg > caf1
tail -l cael.xvg > cael
tail -l cadl.xvg > cadl
tail -l cac1.xvg > cac1
tail -l cabl.xvg > cabl
#cat con molecula
cat cam cal cak caj cai cah cag caf cae cad cac cab > order0
#cat sin molecula
cat cam1 call cak1 caj1 cail cah1 cagl caf1 cael cadl cac1 cabl > order01
#borrar temporales
rm ca*

#export LC_NUMERIC="en_US.UTF-8"
#convertir parametros en desdoblamientos con molecula
gawk '{print $2*-127500}' order0 >> order1
#convertir parametros en desdoblamientos sin molecula
gawk '{print $2*-127500}' order01 >> order11
#pegar todos los datos teoricos
paste -d " " ordertail order1 order11 >> order2
#pegar todos los datos, teoricos y experimentales
cat orderhead order2 >> orderparameter_$(echo $var)_$(date
+"%d_%m_%y").xvg
#borrar temporales

```



```
rm order0 order01 order1 order11 order2
```

```
echo "el nombre del archivo es: orderparameter_$(echo $var)"_$(date +%d_%m_%y)".xvg"
```

11.3 Reproducibilidad

Se midieron espectros RMN para los sistemas en los equipos RMN de la Universidad de Santiago, USACH, tanto como de la Pontificia Universidad Católica, PUC, los cuales se compararon para tener una noción de la reproducibilidad del experimento en cuestión, los cuales demuestran que el experimento es reproducible. Se utilizaron como datos los desdoblamientos cuadrupolares.

Tabla 10 Datos de reproducibilidad del experimento.

Nº Carbono	PUC_sin	USACH_sin	Desviación Estándar	%diferencias	PUC_con	USACH_con	%diferencias
12	3048.013	2804.451	172.2243418	8.68%	2980.613	2851.967	4.51%
11	11435.667	10632.089	568.215453	7.56%	11278.398	10781.234	4.61%
10	15599.537	14601.093	706.006523	6.84%	15446.013	14783.987	4.48%
9	18913.409	17687.829	866.6159289	6.93%	18797.33	18020.054	4.31%
8	21714.287	20422.611	913.3528587	6.32%	21624.419	20825.259	3.84%
7	23650.4	22191.798	1031.387365	6.57%	23626.7	22742.075	3.89%
6	25306.2	25030.261	195.1183381	1.10%	26115.2	25750.973	1.41%
5	25306.2	25030.261	195.1183381	1.10%	26115.2	25750.973	1.41%
4	25306.2	25030.261	195.1183381	1.10%	26115.2	25750.973	1.41%
3	25306.2	25030.261	195.1183381	1.10%	26115.2	25750.973	1.41%
2	25306.2	25030.261	195.1183381	1.10%	26115.2	25750.973	1.41%
1	25306.2	25030.261	195.1183381	1.10%	26115.2	25750.973	1.41%
Promedio				4.13%	Promedio		2.84%

12 Bibliografía

Montecinos, R. (2007). *Caracterización de Cristales Líquidos Liotrópicos Nemáticos, Espectroscopia RMN, Fluorescencia y Dinámica Molecular*. Tesis doctoral, Universidad de Chile - Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Santiago.

Allen, M., & Tildesley, D. (1989). *Computer Simulation of liquids*. New York, Estados Unidos de América: Oxford Science Publication.

Tanford, C. (2003). *The Hydrophobic Effect* (2ª edición ed.). New York: John Wiley & Sons Inc.

Requena, A. (2003). *Espectroscopia*. Madrid: Pearson Prentice Hall.

Macomber, R. S. (1998). *A complete introduction to modern NMR spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Hess, B., & David van der Spoel, E. L. (2010). *Gromacs: User Manual Version 4.5.4*. Manual de usuario, University de Groningen, Biophysical Chemistry, Groningen.

Petrov, A. (1999). *The lyotropic state of matter: molecular physics and living matter physics*. Godon and Breach Science Publishers.

NIST. (n.d.). *National Institute of Standards and Technology*. Retrieved 10 de 10 de 2012 from Libro del Web de Química del NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Malde, A., Zuo, L., Breeze, M., Stroet, M., Poger, D., Nair, P. C., et al. (2011). An Automated Topology Builder (ATB) and repository: version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computational*, 7 (12), 4026-2037.

Schüttelkopf, A. W., & Aalten, D. M. (2004). PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallography Section D*, 1355-1363.

Bahamonde, V. (2013). *Distribución, Orientación y Dinámica de Quinonas e Hidroquinonas Biológicamente Activas, Disueltas en Miméticos de Membrana Orientadas en un Campo Magnético. Un estudio en base a 2H-RMN y Dinámica Molecular*. Avance de Tesis doctoral, Universidad de Chile - Facultad de Ciencias, Química, Santiago.

Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4 (17).

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., et al. (2004). Gaussian 03 Revision C.02. Wallingford, CT.

Spoel, D. v., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. (2005). GROMACS: Fast, Flexible and Free. *Journal Comp. Chem.*, 26, 1701-1718.

Ahumada, H. R. (2007). *Orientación y dinámica de sustratos disueltos en cristales líquidos liotropicos nematicos*. Tesis doctoral, Universidad de Chile - Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Santiago.

Chaplin, M. (27 de Agosto de 2013). *Water Structure and Science*. From Water Models: <http://www.lsbu.ac.uk/water/models.html>

Oostenbrink, C., Soares, T. A., Vegt, N. F., & Gunsteren, W. F. (2005). Validation of the 53a6 GROMOS force field. *European Biophysics Journal*, 34, 273-284.

R.Q., B., A., V. C., & Mc. Ewen, W. E. Curso Práctico de Química Orgánica. España: Alambra.

Sigma-Aldrich. (2012 йил 20-12). *Product Information: L- α -Phosphatidylcholine*. Retrieved 2012 йил 10-12 from Sigma-Aldrich: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p5638pis.pdf

Сох, С. (2005). *2,4-D*. Retrieved 2012 йил 15-5 from <http://www.signaloflove.org/clearcutting/reports/24D.pdf>

Abruzzese, L. (1992). *Patent No. 0509518a1*. Italia.

Cobb, A. H., & Reade, J. P. (2010). *Physiology of herbicide action* (2^a Edición ed.). Wiley-Blackwell.

Billes, F., Endrédi, H., & Várady, B. (2001). Effect of deuteration on the vibrational spectra of organic molecules. Budapest: Process in Isotopes and Molecules Conference.