

UCH-FC  
@. Ambiental  
V473  
C.1



**UNIVERSIDAD  
DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Distribución, orientación promedio y dinámica molecular de  
Paratión-d<sub>4</sub> (O,O-Dietil-O-4-nitrofenil-d<sub>4</sub>-tiofosfato) disuelto en  
bicapas lipídicas. <sup>2</sup>H-RMN y Dinámica Molecular.**

**Seminario de Título entregado a la  
Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al título de**



**QUIMICO AMBIENTAL**

**ALEJANDRA MONICA VERA ALARCON**

**Director Seminario de Título y Profesor Patrocinante**

Dr. Boris E. Weiss L.

***Diciembre, 2007***

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

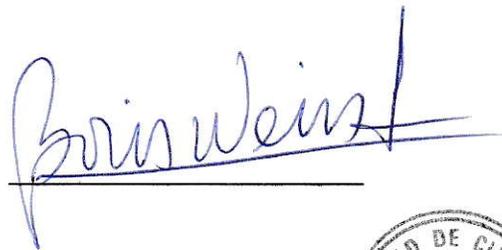
**INFORME DE APROBACION**

**SEMINARIO DE TITULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por la alumna **Alejandra Mónica Vera Alarcón** ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación del Seminario de Título como requisito para optar al título de Químico Ambiental.

**Director Seminario de Título y  
Prof. Patrocinante**

Dr. Boris E. Weiss L.



**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

Dr. Ramiro Araya



Dr. Marcelo Campos



## CURRICULUM VITAE



Alejandra Mónica Vera Alarcón  
Santa Teresa 1105. Santiago, San Bernardo.  
Teléfono particular: (02)5292882. Celular: 78654702  
E-mail: [a.monicavera@gmail.com](mailto:a.monicavera@gmail.com)

### FORMACION ACADEMICA

- Licenciatura en Ciencias Ambientales c/m en química. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias (2005).
- Seminario de Título: "Distribución, orientación promedio y dinámica molecular de paratión-d<sub>4</sub> (o,o-dietil-o-4-nitrofenil-d<sub>4</sub>-tiofosfato) disuelto en bicapas lipídicas. <sup>2</sup>H-RMN y Dinámica Molecular (2006-2007).

### CURSOS Y ELECTIVOS DE FORMACION PROFESIONAL

- Microbiología de efluentes residuales e industriales. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (2004).
- Auditoría Ambiental. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile (2005).

- Curso de Inteligencia Emocional Aplicada a la Interacción Docente Educando. Centro de Formación Técnica ESI (46 hrs), año 2006.
- Curso Evaluación de Impacto Ambiental, Universidad de Santiago de Chile. Programa de Gestión y Ordenamiento Ambiental (PROGOA) (6 semanas), año 2007.

### **SEMINARIOS Y DOCENCIA**

- Realización unidad de investigación y seminario de título, Laboratorio Físicoquímica Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Dr. Boris Weiss (2004-2007).
- 4<sup>th</sup> Workshop of Computational Chemistry and Molecular Spectroscopy. Universidad Andrés Bello Facultad de Ecología y Recursos naturales. "Molecular recognition between a cholesteric bicelle and (r) (s) 1-phenyl ethanol. <sup>2</sup>H-NMR and Molecular Dynamics". Balneario Banco Central. Punta de Tralca, Chile. Octubre 2004.
- Congreso Sociedad Química Chilena. "Dinámica Molecular de R y S-N-Acil-1-Fenil-d<sub>5</sub>-Aminopropano en Bicapas de N-Dodecanoil-L-Alaninato de Cesio". Concepción, Chile. Enero, 2006.

### **EXPERIENCIA LABORAL**

- Clases particulares química, física, matemática y química ambiental (2002-2007).
- Profesor enseñanza media física y química. Centro Educacional Santa Rosa. Blas Vial 8470, La Cisterna. (año 2006).

- Reemplazo profesor física. Colegio Superior del Maipo, San Bernardo. Covadonga 865. (Marzo- Abril 2007).
- Reemplazo Profesor Química. Colegio Nuestra Señora Maria Inmaculada. Gran avenida paradero 32. (Agosto –Septiembre 2007).
- Profesora de física y química, Escuela Nocturna de Adultos José Abelardo Núñez N° 3 ubicado en la comuna de Huechuraba. (año 2007).

#### **IDIOMAS**

- Inglés técnico, Nivel básico (1 semestre). Universidad Tecnológica Metropolitana, carrera de bibliotecología y documentación (1998).

#### **INFORMATICA**

- Nivel intermedio. Conocimientos medios–altos a nivel usuario: Windows vista, Windows xp, Windows 1998- 2000, Microsoft Word, Microsoft Works, Excel, Gromacs, Linux e Internet.

#### **DATOS PERSONALES**

- **Estado civil:** Casada
- **Nacionalidad:** Chilena
- **Fecha de Nacimiento:** 8 de junio de 1978
- **Enseñanza Básica:** Completa
- **Enseñanza Media:** Completa
- **Rut:** 14.510.485-8

## DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis hijos  
y a todas las personas que me han  
apoyado y brindado las oportunidades  
para realizar mis metas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis hijos Danae y Leonardo por la paciencia, el cariño y el amor otorgado durante todo este tiempo, ya que ellos son un pilar fundamental para la realización de mis metas y anhelos. También quiero agradecer a mis padres y amigos por el apoyo emocional y logístico; al Profesor Boris Weiss por el apoyo experimental, teórico y económico; al proyecto FONDECYT N° 1050201 por el apoyo económico para la realización de este seminario. Y en especial a la familia Urra Sánchez, Paola Muñoz y a mi gran amigo y compañero Mario Urra, ya que sin el nada de esto hubiese sido posible, y por supuesto al resto de las personas que siempre creyeron en mi.

## INDICE DE CONTENIDOS

---

	<b>Página</b>
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE ANEXOS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
SUMMARY .....	xv
<b>i.- INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>II.- METODOLOGIA .....</b>	<b>16</b>
<b>II.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA</b>	
<b>    NUCLEAR (RMN) .....</b>	<b>16</b>
II.1.1.- Espines y Momentos Magnéticos.....	17
II.1.2.- Condición de Resonancia .....	20
II.1.3.- Interacción Dipolar y Cuadrupolar .....	22
II.1.4.- Parámetros de orden enlace C-D.....	25
II.1.5.- Tiempos de relajación longitudinal (T1).....	27
<b>II.2.- DINAMICA MOLECULAR (DM).....</b>	<b>28</b>
II.2.1.- Simulación componentes del sistema .....	30
II.2.2.- Dinámica Molecular y modelación del sistema .....	31
II.2.3.- Función de autocorrelación rotacional.....	33
II.2.4.- Función de distribución radial.....	34
II.2.5.- Perfiles de densidades Parciales.....	36

II.2.5.1.- Densidades de masas.....	36
II.2.5.2.- Densidades de cargas.....	37
<b>III.- HIPOTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>38</b>
<b>III.1.- OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS .....</b>	<b>38</b>
III.1.a.- Objetivo general.....	38
III.1.b.- Objetivos específicos .....	39
<b>IV.- ESTUDIO DE LA INCORPORACION DE PARATION</b>	
<b>EN SIMILES DE MEMBRANAS BIOLOGICAS.....</b>	<b>40</b>
<b>IV.1.- PREPARACION DE PARATION-d<sub>4</sub> Y MESOFASES.....</b>	<b>40</b>
<b>IV.1.2.- MATERIALES Y METODO.....</b>	<b>40</b>
IV.1.2.1.- Síntesis de paratión-d <sub>4</sub> .....	40
IV.1.2.1.1.- Obtención de Sílica ácida Sulfúrica.....	40
IV.1.2.1.2.- Nitración de fenol-d <sub>5</sub> .....	41
IV.1.2.1.3.- Síntesis de O,O-dietil-clorotiofosfato.....	43
IV.1.2.1.4.- Síntesis paranitrofenóxido de sodio y obtención de O,O-Dietil-O-4-nitrofenil-d <sub>4</sub> -tiofosfato (paratión-d <sub>4</sub> ).....	43
IV.1.2.2.- Preparación de la muestra y mesofases .....	44
IV.1.2.3.- Espectros de <sup>2</sup> H-RMN.....	45
IV.1.2.4.- Dinámica Molecular .....	45
<b>V.- RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>47</b>
<b>V.1.- ESPECTROS DE <sup>2</sup>H-RMN.....</b>	<b>47</b>
V.1.1.- Desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu_q$ ) .....	48
V.1.2.- Parámetros de orden ( $S_{C-D}$ ) .....	51
V.1.3.- Tiempo de Relajación Longitudinal ( $T_1$ ) .....	52
V.1.4.- Espectros de <sup>1</sup> H-RMN.....	54
V.1.4.1- Ancho de la Banda Espectro <sup>1</sup> H-RMN.....	54

<b>V.2.- DINAMICA MOLECULAR</b> .....	56
V.2.1.- Energía potencial y total del sistema.....	57
V.2.2.- Perfiles de densidades de masas .....	58
V.2.3.- Perfiles de densidades de cargas .....	60
V.2.4.- Función de distribución radial (RDF).....	61
V.2.5.- Función de autocorrelación rotacional .....	64
<b>VI.- CONCLUSIONES</b> .....	68
<b>VII.- REFERENCIAS</b> .....	70

## INDICE DE TABLAS

---

	Página
<b>Tabla 1:</b> Desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu_q$ ): valores experimentales.....	48
<b>Tabla 2:</b> Valores experimentales parámetros de orden ( $S_{C-D}$ ).....	52
<b>Tabla 3:</b> Tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) medidos para la mesofase con paratión y mesofase pura.....	53
<b>Tabla 4:</b> Valores teóricos calculados a través de DM de de $\tau_c$ , $T_1$ y $S_{C-D}$ .....	67

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Paratión (o,o-dietil-o-4-nitrofenil-tiofosfato) .....	3
<b>Figura 2:</b> Modelo tridimensional del receptor nicotínico de acetilcolina .....	5
<b>Figura 3:</b> Formación complejo enzima-paratión (ACh-OP) .....	6
<b>Figura 4:</b> ATPasa tipo P, proteína integral de membrana.....	7
<b>Figura 5:</b> Espectro típico <sup>2</sup> H-RMN de N-heptanoil-L-1- fenil-2-aminopropano..	10
<b>Figura 6:</b> Cristal líquido liótopico nemático discoidal.....	12
<b>Figura 7:</b> Agregado discoidal .....	13
<b>Figura 8:</b> Representación regiones de la bicapa, mostrando sus tres zonas..	15
<b>Figura 9:</b> Núcleo de hidrógeno.....	18
<b>Figura 10:</b> Efecto Zeeman .....	20
<b>Figura 11:</b> Precesión de un núcleo con espín ½ .....	21
<b>Figura 12:</b> Niveles de energía para un núcleo de deuterio en presencia de un campo magnético externo .....	23
<b>Figura 13:</b> Acoplamiento residual cuadrupolar ( $\Delta\nu_Q$ ).....	24
<b>Figura 14:</b> Parámetros de orden ( $S_{C-D}$ ).....	26
<b>Figura 15:</b> Tiempo de relajación ( $T_1$ ).....	28
<b>Figura 16:</b> Función potencial, en la cual se basa la DM .....	29
<b>Figura 17:</b> Hyperchem v. 7.0. Construcción de surfactantes .....	31
<b>Figura 18:</b> DM de paratión .....	32
<b>Figura 19:</b> Función de autocorrelación rotacional.....	34
<b>Figura 20:</b> Distribución radial; gráfico representativo.....	35
<b>Figura 21:</b> Perfil de densidades parciales .....	36
<b>Figura 22:</b> Perfil de densidades de cargas.....	37
<b>Figura 23:</b> Diagrama espectros experimento $T_1$ inversion Recovery de paratión-d <sub>4</sub> .....	47
<b>Figura 24:</b> Curva de ajuste exponencial para la obtención de $T_1$ .....	53
<b>Figura 25:</b> Espectro <sup>1</sup> H-RMN de paratión.....	55
<b>Figura 26:</b> Dinámica Molecular (DM) de paratión.....	56

<b>Figura 27:</b> Energía total y potencial del sistema.....	58
<b>Figura 28:</b> Densidades de masas de los componentes del sistema .....	59
<b>Figura 29:</b> Densidades de cargas de los componentes del sistema.....	61
<b>Figura 30:</b> Función de distribución radial de fósforo .....	62
<b>Figura 31:</b> Función de distribución radial anillo aromático de paratión .....	63
<b>Figura 32:</b> Función de distribución radial azufre.....	64
<b>Figura 33:</b> Función de autocorrelación rotacional enlace C-D, posición <i>orto</i> anillo aromático paratión .....	66

## INDICE DE ANEXOS

---

	Página
<b>I.- ANEXO A</b>	
<b>ANTECEDENTES PESTICIDAS</b> .....	77
<b>A.1.- VISION GENERAL</b> .....	78
<b>Figura A.1.: Indicador de Exposición</b> .....	81
<b>II.- ANEXO B</b>	
<b>PESTICIDAS</b> .....	82
<b>B.1.- CLASIFICACION Y MODOS DE USO</b> .....	82
a) Insectidas y acaricidas .....	82
b) Herbicidas.....	84
c) Fungicidas.....	84
<b>B.2.- CONCEPTOS</b> .....	84
<b>B.3.- FACTORES QUE MODIFICAN LA TOXICIDAD</b> .....	85
<b>B.4.- NOMBRES PESTICIDAS</b> .....	85
<b>B.5.- CLASIFICACION DE PESTICIDAS</b> .....	86
a) Según mecanismo de acción o actividad .....	86
b) Según Dosis Letal 50 (DL <sub>50</sub> ) por vía oral y cutánea.....	86
c) Según clasificación toxicológica de la OMS .....	87
d) Según uso o tipo de organismo a controlar.....	87
e) Según grupo químico.....	87

<b>B.6.- USOS DE LOS PESTICIDAS .....</b>	<b>88</b>
a) Según grupo químico .....	88
b) Etapas para el uso del pesticidas .....	89
c) Exposición a pesticidas .....	90
<b>B.7.- RIESGO DE LOS PESTICIDAS .....</b>	<b>91</b>
B.7.1.- Efectos agudos .....	91
B.7.2.- Efectos crónicos .....	92
<b>B.8.- SITUACION DE LOS PESTICIDAS EN CHILE .....</b>	<b>93</b>
B.8.1.- Criterios para priorizar un problema de salud .....	93
<b>B.9.- RESTRICCIONES Y PROHIBICIONES AL USO           DE PESTICIDAS DE USO DOMESTICO .....</b>	<b>94</b>
<b>B.10.- PROBLEMAS DETECTADOS DE LOS PESTICIDAS .....</b>	<b>95</b>
<b>III.- ANEXO C</b>	
<b>INTOXICACIONES POR PESTICIDAS .....</b>	<b>97</b>
<b>Figura C1:</b> Gráfico de la distribución de intoxicaciones agudas por pesticidas según clasificación toxicológica .....	97
<b>C.1.- CLASIFICACION DE LAS INTOXICACIONES .....</b>	<b>98</b>
<b>Figura C.2:</b> Distribución de intoxicaciones agudas por pesticidas según clasificación tipo de notificaciones.....	98
<b>C.2.- INTOXICACIONES SEGUN GRUPO QUIMICO           DE LOS PESTICIDAS .....</b>	<b>99</b>
<b>Tabla C.1.:</b> Distribución de las intoxicaciones .....	99
<b>IV.- ANEXO D</b>	
<b>FICHA INTERNACIONAL DE SEGURIDAD QUIMICA PARATION (O,O-DIETIL-O-4-NITROFENIL-TIOFOSFATO).....</b>	<b>100</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AC:	Neurotransmisor acetilcolina.
ACh:	Enzima Acetilcolinesterasa.
ACh-OP:	Complejo enzima-paratión.
ATPasa:	Enzima integral de membrana.
CEC:	Commission for Environmental Cooperation of North America (Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte).
C-D:	Enlace carbono deuterio
CL:	Cristal líquido.
DDT:	Diclorodifeniltricloroetano
DL <sub>50</sub> :	Dosis letal 50, cantidad en mg. de producto tóxico que al ser ingeridos por una población de ratas, causa la muerte al 50% de la población.
DM:	Dinámica Molecular.
<sup>2</sup> H-RMN:	Resonancia Magnética Nuclear de Deuterio.
ICAITI:	Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. Salud humana.
MINSAL:	Ministerio de Salud (Chile).
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
OP:	Pesticida organofosforado.
OPs:	Pesticidas organofosforados.
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear.
SAG:	Servicio Agrícola y Ganadero.

## RESUMEN

Los pesticidas o plaguicidas son sustancias que eliminan, controlan y ayudan a manejar diversas plagas, siendo hoy en día utilizados tanto a nivel doméstico como industrial.

Los pesticidas más comúnmente utilizados para el control de plagas son los del tipo organofosforados (OPs), derivados del ácido fosfórico, los cuales son generalmente más tóxicos a los vertebrados que otras clases de pesticidas. Es precisamente esta característica la que permitió el uso de este tipo de pesticidas en la agricultura y en la agroindustria, trayendo consigo una serie de problemas a nivel toxicológico y ambiental. Un pesticida organofosforado (OP) que ha sido mundialmente utilizado como alternativa al DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) y otros pesticidas, es el paratión. Las cualidades de este insecticida fueron observadas por primera vez en Alemania cuando se estudiaban los gases nerviosos de guerra sarín, somán y tabún.

Utilizando espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Deuterio ( $^2\text{H}$ -RMN) y Dinámica Molecular (DM) se estudió la distribución, orientación promedio y dinámica reorientacional de paratión. Este pesticida, fue sintetizado y deuterado en el anillo aromático, para posteriormente ser incorporado a una solución de cristal líquido liotrópico nemático discoidal (clNd), preparado a partir de una mezcla de cloruro de tetradeciltrimetilamonio (TTA)/decanol/sal/agua. Este tipo de agregados forman bicapas similares a las membranas celulares, por lo que el estudio de la distribución, orientación promedio y dinámica de paratión disuelto en bicapas lipídicas es importante para el entendimiento y la comprensión del papel que juegan en el funcionamiento de las membranas biológicas, los lípidos y los sustratos disueltos en ellas.

La bicapa o membrana controla la difusión de moléculas pequeñas, iones, agua y provee de un medio particularmente adecuado para el funcionamiento de proteínas y azúcares, como por ejemplo las bombas de sodio y potasio, que restauran el potencial de membrana después del impulso eléctrico, responsable de los efectos a nivel de sistema nervioso central.

Empleando  $^2\text{H}$ -RMN se midieron los desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu_Q$ ) y tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) de las posiciones *orto* y *meta* del anillo aromático de paratión- $d_4$ . También se calcularon los parámetros de orden que caracterizan completamente la orientación promedio del anillo aromático.

Para obtener información acerca del comportamiento microscópico del sistema en estudio, se simuló una bicapa empleando DM.

Por otro lado, empleando Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Dinámica Molecular (DM) se estudió el efecto de la incorporación de paratión sobre las propiedades de la bicapa, tales como el grado de orden al interior de la ésta, entre otras propiedades.

A través del estudio de la incorporación de paratión en un símil de membrana biológica se pudo observar que este insecticida afecta la rigidez de la membrana, debido a que se ubicaría en la interfase de la bicapa, interactuando con ella a través de interacciones del tipo catión- $\pi$ , producidas entre el anillo aromático y los amonios presentes en esta zona.

## SUMMARY

Pesticides are substances that help to eliminate, control and manage several pests. Today it is being used domestically as well as industrially.

One of the most currently used pesticides for pest control are organophosphate compounds (OPs phosphoric acid derivatives), generally more toxic to vertebrates than other kinds of insecticides. Most of them are chemically unstable and consequently not persistent. It is precisely this characteristic that allowed the use of such pesticides in agriculture and agro-industry, bringing with them a number of toxicological and environmental problems. An organophosphate pesticides (OP), which has been used worldwide as an alternative to DDT and other pesticides, is parathion. The properties of this insecticide were observed for the first time in Germany, during the Second World War, when studying the nerve gases sarin, somán and tabún.

Using  $^2\text{H}$ -RMN spectroscopy and Molecular Dynamics (MD), we have studied the average distribution, orientation and dynamics of parathion in a bilayer. This organophosphate pesticides was synthesized with deuterium atoms in selected positions of the aromatic ring and incorporated in a discotic nematic lyotropic liquid crystal solution prepared with a mixture of tetradecyltrimethylammonium chloride (TTAC) / decanol / salt / water. These aggregates form a bilayer of amphiphiles, similar to cell membranes, so the study of the distribution and dynamics of orientation average parathion dissolved in these lipids aggregates is critical to understand the role they play in the early stage of incorporation into living organisms.

The membrane control the spread of small molecules, ions and water into the interior of the cell and provides a particularly suitable matrix for the functioning of proteins and sugars, such as sodium and potassium pumps, responsible for restoring the membrane potential after the electrical impulse at the central nervous system level.

Using  $^2\text{H}$ -RMN we have measured the quadrupole splittings ( $\Delta\nu_Q$ ) and longitudinal relaxation time ( $T_1$ ) of the positions *ortho* and *meta* of the aromatic ring of parathion- $d_4$ . We estimated parameters that characterize the average order of the aromatic ring. To obtain detailed information about the microscopic behavior of the system, Molecular Dynamic simulations were carried out with the program GROMACS. On the other hand, the effects of solubilization of parathion into the bilayer properties such as the order degree were also examined.

This study allows us to conclude that parathion is located mainly in the interface, possibly interacting with the ammonium head-groups, and with fast re-orientational motion. Also it was observed that the incorporation of the insecticide into the bilayer increases significantly the rigidity of the aggregate.

## SUMMARY

Pesticides are substances that help to eliminate, control and manage several pests. Today it is being used domestically as well as industrially.

One of the most currently used pesticides for pest control are organophosphate compounds (OPs phosphoric acid derivatives), generally more toxic to vertebrates than other kinds of insecticides. Most of them are chemically unstable and consequently not persistent. It is precisely this characteristic that allowed the use of such pesticides in agriculture and agro-industry, bringing with them a number of toxicological and environmental problems. An organophosphate pesticides (OP), which has been used worldwide as an alternative to DDT and other pesticides, is parathion. The properties of this insecticide were observed for the first time in Germany, during the Second World War, when studying the nerve gases sarin, somán and tabún.

Using  $^2\text{H}$ -RMN spectroscopy and Molecular Dynamics (MD), we have studied the average distribution, orientation and dynamics of parathion in a bilayer. This organophosphate pesticides was synthesized with deuterium atoms in selected positions of the aromatic ring and incorporated in a discotic nematic lyotropic liquid crystal solution prepared with a mixture of tetradecyltrimethylammonium chloride (TTAC) / decanol / salt / water. These aggregates form a bilayer of amphiphiles, similar to cell membranes, so the study of the distribution and dynamics of orientation average parathion dissolved in these lipids aggregates is critical to understand the role they play in the early stage of incorporation into living organisms.

The membrane control the spread of small molecules, ions and water into the interior of the cell and provides a particularly suitable matrix for the functioning of proteins and sugars, such as sodium and potassium pumps, responsible for restoring the membrane potential after the electrical impulse at the central nervous system level.

Using  $^2\text{H}$ -RMN we have measured the quadrupole splittings ( $\Delta\nu_Q$ ) and longitudinal relaxation time ( $T_1$ ) of the positions *ortho* and *meta* of the aromatic ring of parathion- $d_4$ . We estimated parameters that characterize the average order of the aromatic ring. To obtain detailed information about the microscopic behavior of the system, Molecular Dynamic simulations were carried out with the program GROMACS. On the other hand, the effects of solubilization of parathion into the bilayer properties such as the order degree were also examined.

This study allows us to conclude that parathion is located mainly in the interface, possibly interacting with the ammonium head-groups, and with fast re-orientational motion. Also it was observed that the incorporation of the insecticide into the bilayer increases significantly the rigidity of the aggregate.

## SUMMARY

Pesticides are substances that eliminate, control and help manage various pests, Today being used both domestic and industrial.

Pesticides most currently used for pest control are the type of organophosphate (OPs), phosphoric acid derivatives, Which are generally more toxic to vertebrates than other kinds of pesticides. It is precisely this characteristic that allowed the use of such pesticides in agriculture and agro-industry, bringing with them a host of problems at toxicological and environmental. An organophosphate pesticides (OP), which has been used worldwide as an alternative to DDT and other pesticides, is parathion. The qualities of this insecticide were observed for the first time in Germany when studying the nerve gas war sarin, somán and tabún.

Using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of deuterium ( $^2\text{H}$ -RMN) and Molecular Dynamics (MD), we studied the distribution, orientation and dynamic reorientacional average of parathion, organophosphate pesticides (OPs). This pesticide was synthesized and incorporated in its deuterium in the aromatic ring, and later was added into a liquid crystal solution liotrópico nemático disk (clnd), prepared with a mixture of chloride tetradeciltrimetilamonio (TTA) / decanol / salt / water. These types of aggregates formed bicapas similar to cell membranes, so the study of the distribution and dynamics of orientation average parathion dissolved in bicapas lipid is critical to understanding and understanding of the role they play in the functioning of the biological membranes as both lipid substrates dissolved in them.

The membrane controlling the spread of small molecules, ions, water and provides a particularly suitable for the functioning of proteins and sugars, such as pumps sodium and potassium, responsible for restoring the membrane potential after

the electrical impulse responsible for the effects at the level of the central nervous system.

Using  $^2\text{H}$ -RMN is measured the quadrupole splittings ( $\Delta\nu_Q$ ) and longitudinal ( $T_1$ ) relaxation time of the positions ortho and meta aromatic ring of parathion- $d_4$ . Also they were calculated parameters that characterize completely order guidance average aromatic ring.

For information about the microscopic behavior of the system as studied were simulated using a bilayer DM.

On the other hand, using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Molecular Dynamics (MD) studied the effect of this acquisition on the properties of the bilayer, such as the degree of order within the this, among other properties.

Through the study of the incorporation of parathion in a simile biological membrane was observed that this insecticide cause effects on this, affect the rigidity of the membrane, as this will be located at the interface of the bilayer interacting with it through cation- $\pi$  type of interactions between aromatic and ammoniums present in this area.

## I.- INTRODUCCION

Desde la década de años 40, el control de las plagas tanto en el área agrícola como sanitaria, se ha basado esencialmente en la utilización masiva de pesticidas o plaguicidas sintéticos. Si bien es cierto que la eliminación de muchas de estas plagas a través de este tipo de compuestos, ha traído importantes beneficios para la salud de la población en general, el uso y aplicación de pesticidas ha provocado no sólo la creciente contaminación del medio ambiente, sino que también serios problemas a nivel sanitario (ICAITI, 1977; OMS, 1992). Con el desarrollo masivo de la agricultura el uso de pesticidas se intensificó, llegando a ser utilizados tanto a nivel doméstico como industrial.

Los pesticidas o plaguicidas son productos químicos de amplio uso en Chile y en el mundo y son definidos como "cualquier sustancia, preparación u organismo usados para destruir, mitigar o controlar plagas" (Anexo A). Los pesticidas son utilizados principalmente con fines agrícolas, ya sean como insecticidas, herbicidas, fungicidas, etc. y se pueden clasificar según<sup>1</sup> :

- Uso
- Composición química
- Actividad
- Y grado de toxicidad

La acción fisiológica y la toxicidad varían en función de la estructura química de los pesticidas, siendo específica para cada uno de éstos. Las alteraciones provocadas

---

<sup>1</sup> Manual Fitosanitario. 2002-2003, Pág.23.Resolución N°2196, año 2000, Servicio Agrícola Ganadero (SAG).

a nivel de sistema nervioso central, son algunos de los efectos que manifiestan la toxicidad de los pesticidas en organismos vivos (Jamal, 1997).

En la actualidad los pesticidas más utilizados son los del tipo organofosforados (OPs), los cuales son derivados del ácido fosfórico y poseen dos propiedades características:

- Generalmente son más tóxicos a los vertebrados que otras clases de pesticidas
- Y la mayoría de ellos son químicamente inestables o no persistentes

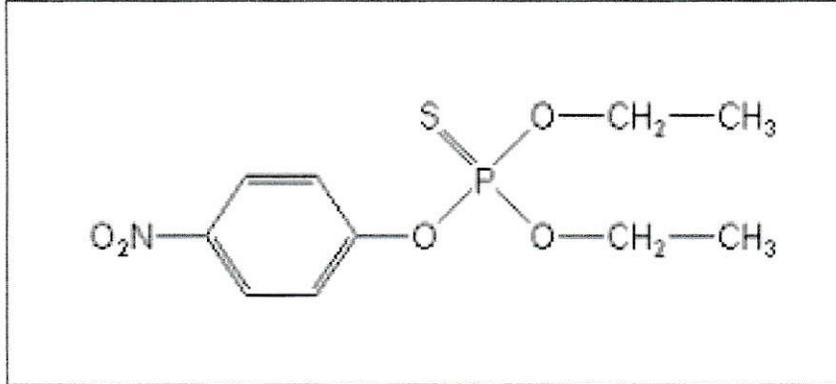
Es quizás esta última característica, la que permitió el uso masivo e indiscriminado de este tipo tóxicos en la agricultura y la agroindustria, provocando efectos a nivel toxicológico y ambiental<sup>2</sup> (Anexo A).

Un pesticida organofosforado (OP) que ha sido mundialmente utilizado como alternativa al DDT<sup>3</sup> (Diclorodifeniltricloroetano) y otros pesticidas, es el paratión. Las cualidades de este insecticida fueron observadas por primera vez en Alemania (1947) cuando se estudiaban los gases nerviosos de guerra sarín, somán y tabún. Químicamente paratión es un derivado del ácido fosfórico y posee dos grupos químicos distintos en su estructura: dos radicales alquilo (O-alquil) y una porción esterfosfato (Gallo & Lawryk, 1991) (Figura 1).

---

<sup>2</sup> "Manual Fitosanitario" 2002-2003, Pág.23. Resolución N°2196, año 2000, Servicio Agrícola Ganadero (SAG).

<sup>3</sup> CEC, 2002. "América del Norte ya no usa DDT". Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte 393, rue St-Jacques Ouest, bureau 200, Montreal (Quebec) Canadá H2Y 1N9. info@cceintl.org, [www.cec.org](http://www.cec.org).



**Figura 1:** Paratión (o,o-dietil-o-4-nitrofenil-tiofosfato). OP fenílico que llegó a la agricultura en el año 1947.

El primer OPs fenílico que llegó a la agricultura en forma masiva fue paratión en el año 1947 y hoy en día compromete la mayor parte de los pesticidas agrícolas utilizados en nuestro país y en el mundo (Anexo A). Sin embargo los problemas ambientales asociados con su uso y aplicación han requerido una seria atención acerca de los posibles efectos a nivel toxicológico y ambiental que este pesticida puede ocasionar en organismos vivos. Una propiedad de suma importancia desde el punto de vista toxicológico, es la volatilidad que este pesticida presenta, ya que la vía respiratoria constituye una de las principales vías de ingreso al organismo para este pesticida (Anexo B). Una vez introducido este compuesto químico en el medio ambiente, y como consecuencia de la cantidad usada, sus propiedades fisicoquímicas y su amplio espectro de aplicación, esta sujeto a una serie de procesos de conversión y transporte, por lo que se puede encontrar en todos los compartimientos del medio ambiente, tales como sedimentos, aguas superficiales y subterráneas, atmósfera y suelos (Edmunds, 2007).

En general las intoxicaciones por paratión, resultan principalmente de exposiciones ocupacionales o accidentales, presentándose un riesgo mayor en las personas que manipulan y trabajan con este compuesto (MINSAL, 2001). La adsorción del pesticida ocurre por contacto directo con fuentes móviles y estacionarias tales como: aire, agua, suelo y alimento<sup>4</sup>.

En Chile los plaguicidas se clasifican de acuerdo a lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>5</sup>. Esta clasificación toxicológica se basa en el grado de peligrosidad, entendido como la capacidad de producir daño agudo a la salud cuando se produce una o múltiples exposiciones en un tiempo relativamente corto. De acuerdo a esta clasificación, los plaguicidas se dividen en categorías de mayor a menor peligrosidad según la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) por vía oral y cutánea (Anexo B: Tabla B.1). Según esta clasificación paratión es tóxico y muy peligroso (grupo Ib) para salud de las personas y el medio ambiente en general<sup>6</sup>. Anualmente según datos entregados por la misma organización, se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a paratión en el mundo y en nuestro país es la principal causa de intoxicación por pesticidas de uso agrícola (Anexo C: Figura C.1).

Los efectos a corto o largo plazo que paratión puede provocar, dependen de las distintas vías de ingreso que este tenga al organismo, las cuales son principalmente a través de ingestión, inhalación y absorción dérmica. El cierto grado de polaridad que posee el pesticida, así como el tipo de disolvente que se emplea con éste, facilitan la penetración por vía cutánea, ingresando de esta forma con mayor

---

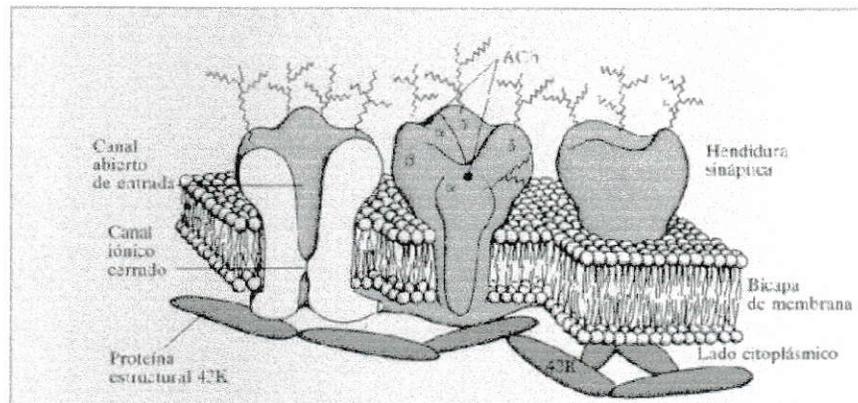
<sup>4</sup> "Sistema de Vigilancia Epidemiológica para Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas". Organización Panamericana de la Salud. Boletín Epidemiológico, Vol. 22 N°4, Diciembre 2001.

<sup>5</sup> Clasificación Toxicológica Organización Mundial de Salud (OMS) 1984.

<sup>6</sup> "Clasificación Toxicológica de los plaguicidas de uso agrícola". Santiago, 31 de agosto de 2000. Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero. <http://www.sag.cl/framearea.asp?cod=3>.

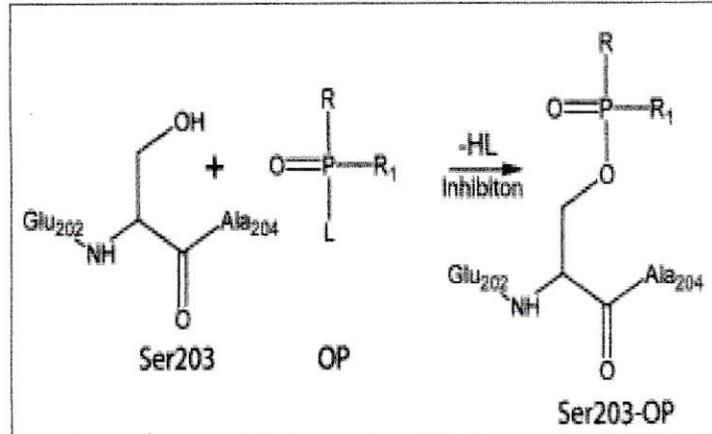
facilidad a los tejidos grasos de la piel, donde se encuentra un elevado contenido de lípidos.

Una vez dentro del organismo, paratión se distribuye rápidamente e inhibe a la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de la inhibición y actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (AC). La inhibición enzimática al parecer se produce a nivel de las hendiduras sinápticas de la enzima, provocando que esta se fosforile, produciendo de esta manera una acumulación del neurotransmisor en el organismo y posteriormente la intoxicación<sup>7</sup> (Figura 2 y Figura 3).



**Figura 2:** Modelo tridimensional del receptor nicotínico de acetilcolina.

<sup>7</sup> "Case Definition for Acute Pesticide-Related Illness and Injury Cases Reportable to the National Public Health Surveillance System". <http://www.cdc.gov/niosh/pestsurg/pdfs/pest-casdef2000.pdf>.

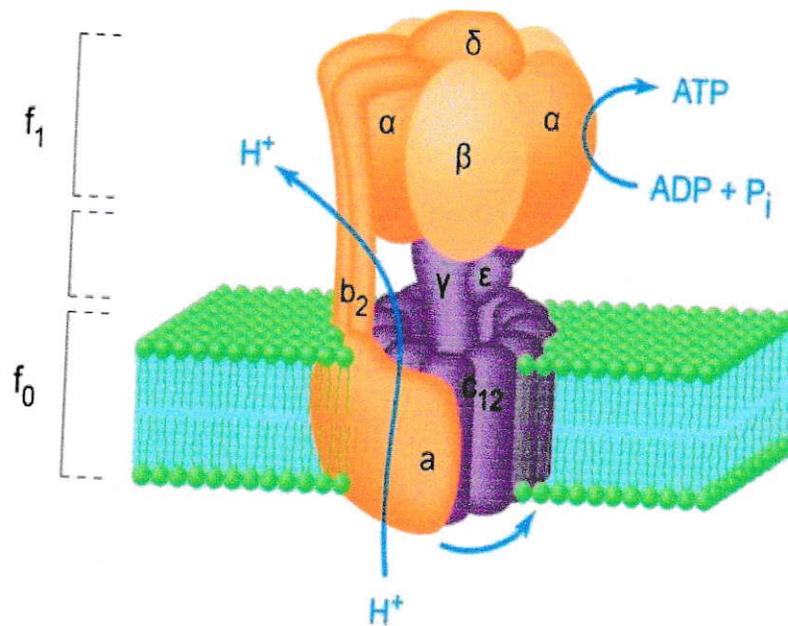


**Figura 3:** Formación complejo enzima-paratión (ACh-OP). Unión de paratión al sitio estérico de la enzima.

Diversas proteínas tales como enzimas y canales de membrana de células animales, que se encuentran rodeadas por un ambiente hidrofóbico formado por lípidos, cuya actividad tiene relación con la flexibilidad conformacional que su esqueleto peptídico posee dentro de la membrana lipídica, sufren cambios conformacionales durante su ciclo catalítico, los cuales se pueden vincular con la organización que presenta la mesofase. Sin embargo, el ingreso de sustratos o moléculas pequeñas a la membrana lipídica puede provocar diversas alteraciones en la estructura de la misma, afectando a los componentes presentes en ella y restringiendo de alguna forma el grado de libertad que estos poseen dentro de la matriz lipídica y alterando a proteínas, neurotransmisores y/o enzimas presentes en ella (Taylor, 1985; Antunes-Madeira y col, 1996).

Estudios realizados en membranas de eritrocitos de cerdo, han demostrado que paratión actúa también inhibiendo a la enzima ATPasa, proteína integral de membrana, la cual se encuentra presente en la mayoría de las células animales y tiene

un papel fundamental en numerosos procesos nerviosos, renales y cardíacos. Es sabido que la actividad catalítica de la enzima ATPasa, se relaciona en cierta parte con la flexibilidad conformacional que su esqueleto peptídico presenta dentro de la membrana lipídica (Blasiak, 1995) (Figura 4).



**Figura 4:** ATPasa tipo P. Proteína integral de membrana.

La membrana lipídica que rodea a ésta y a otras enzimas puede ser considerada como un sistema fluido de estructura líquida cristalina lamelar de bicapa ordenada, la cual le confiere a sus componentes una libertad de movimiento restringida (Blasiak, 1995; Suwalsky y col, 2001). Sin embargo, el grado de libertad de los componentes de la membrana puede ser afectado por el ingreso de paratión a la misma, alterando no solo la composición de esta sino que también a ciertas

propiedades físicas de la membrana y por último a la enzima. No obstante la baja solubilidad (Solubilidad en agua, ml/100 ml a 25°C: 0,0024) y la escasa persistencia presentada por paratión (Anexo D), no permiten que este insecticida se bioacumule en los tejidos grasos a diferencia de otros pesticidas (organoclorados como el DDT), produciéndose de esta forma efectos reversibles a nivel de sistema nervioso central luego de un tiempo de no encontrarse en exposición directa al pesticida<sup>8</sup>.

La idea que el estado físico y las propiedades fisicoquímicas de la matriz lipídica tienen influencia en la función de proteínas de membrana es una hipótesis ya aceptada y para la cual se han obtenido evidencias experimentales (Lundback y col, 1996; Parasassi & Gratton, 1995).

Estudiar el comportamiento, la localización, orientación promedio y dinámica de paratión al interior de cristales líquidos liotrópicos nemáticos discoidales (clnd), utilizados como miméticos de membranas celulares, así como el rol de las propiedades y la organización de la mesofase, como factores que modulan la actividad de neurotransmisores y/o proteínas, puede entregar información real acerca de los mecanismos y modo de acción del pesticida en organismos vivos.

Aspectos tales como la distribución, orientación promedio y dinámica reorientacional de huéspedes incorporados en análogos de membrana biológicas, han sido temas de estudios realizados experimentalmente y teóricamente mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Fluorescencia y Dinámica Molecular (DM) (Weiss-López y col. 2000; Ahumada y col, 2005).

Una técnica que entrega información acerca de la orientación y movilidad de moléculas disueltas en sistemas ordenados como lo son las membranas lipídicas, es

---

<sup>8</sup> CONAMA "Guía para el establecimiento de las normas secundarias de calidad ambiental". [www.conama.cl](http://www.conama.cl).

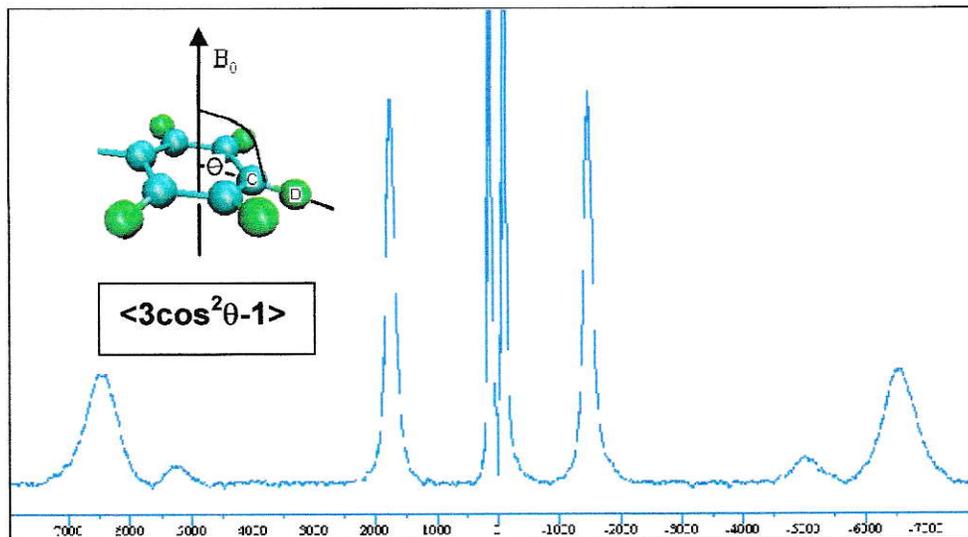
la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear, fenómeno físico basado en las propiedades magnéticas que poseen los núcleos atómicos.

La RMN permite alinear los campos magnéticos de diferentes átomos en la dirección de un campo magnético externo. La respuesta a este campo externo depende del tipo de núcleos atómicos por lo que esta técnica puede utilizarse para obtener información sobre una muestra determinada.

Existen ciertas interacciones moleculares que dependen de la orientación promedio y movilidad de ejes moleculares con respecto a la dirección de un campo magnético aplicado. Un tipo de interacción que se presenta en núcleos que poseen momento cuadrupolar eléctrico (número cuántico de espín  $I \geq 1$ ), como es el caso del núcleo de deuterio, es la interacción cuadrupolar.

La interacción cuadrupolar, en general, se produce entre la gradiente del campo eléctrico generado por el entorno electrónico del núcleo en cuestión y el momento cuadrupolar eléctrico nuclear. En este caso, la interacción depende directamente del promedio  $\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle$ , es decir del ángulo  $\theta$ , formado entre el campo magnético y el eje principal de la gradiente del campo eléctrico en torno al núcleo.

Moléculas disueltas en una muestra de solución isotrópica, no presentan este tipo de interacción, ya que todas las posibles direcciones en el espacio tienen igual probabilidad, promediándose a cero esta interacción. Por otro lado, en una solución anisotrópica, como lo es un cristal líquido (cl), donde no todas las direcciones del espacio son equivalentes, esta interacción no se promedia a cero, manifestándose en el espectro como un desdoblamiento cuadrupolar residual ( $\Delta\nu_Q$ ) (Khetrapal y col, 1975) (Figura 5).



**Figura 5:** Espectro típico  $^2\text{H}$ -RMN de *N*-heptanoil-*L*-1-fenil-2-aminopropano.

Empleando Resonancia Magnética Nuclear de Deuterio ( $^2\text{H}$ -RMN), se puede obtener el tiempo de relajación longitudinal ( $T_1$ ), tiempo correspondiente al restablecimiento de las desigualdades de Boltzmann después de un pulso de energía (Khetrapal y col, 1975). Para núcleos con número cuántico de espín  $I \geq 1$ ,  $T_1$  depende de la movilidad del enlace carbono-deuterio (C-D) y de la magnitud del campo magnético aplicado.

Midiendo ambos observables experimentalmente se puede obtener información de la localización, orientación promedio y movilidad molecular de paratión disuelto en sistemas de análogos de membranas biológicas.

La descripción detallada a nivel atómico de este tipo de sistemas, se puede obtener a través de simulaciones computacionales mecánicoclasicas. Este tipo de simulación, es una herramienta teórica, conocida como Dinámica Molecular (DM), la

cual es de incalculable ayuda para la interpretación de resultados experimentales y se basa en la existencia de un potencial mecánicoclasico simple, al cual se encuentran sometidas todas las partículas del sistema. A través de la segunda ley de Newton se obtiene la trayectoria, la cual contiene toda la información del pesticida disuelto en el símil de membrana biológica. En este tipo de simulación las moléculas se visualizan en términos de átomos que se mantienen unidos por enlaces, ángulos de enlace, potenciales, interacciones de Coulomb y van der Waals (Pastor & Venable, 1993; Xiang & Anderson, 1995).

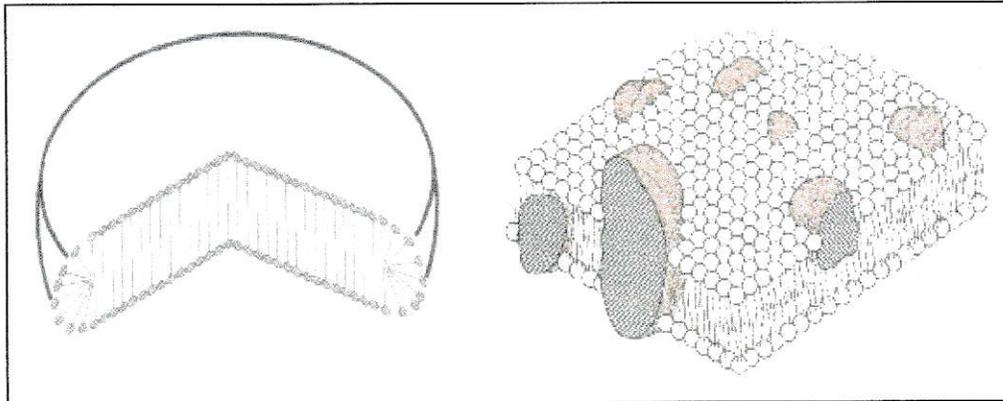
Con el propósito de comprender el comportamiento de este pesticida organofosforado dentro de la membrana, se estudió la orientación promedio, distribución y dinámica reorientacional de paratión deuterado en el anillo aromático (paratión- $d_4$ ) disuelto en bicapas lipídicas.

Se sintetizó paratión- $d_4$  (Fletcher y col, 1948) y se incorporó a una solución anisotrópica de cristales líquidos (cl), los cuales corresponden a un estado intermedio de la materia, más dinámicos que un sólido pero con un orden mayor que un líquido. Estos cl se pueden clasificar según su origen en termotrópicos (unidad básica es una molécula o polímero) y liotrópicos (unidad básica es un agregado de moléculas) (Miño-Galaz, 1999).

Las mesofases liotrópicas, están conformadas por sustancias anfifílicas, es decir existe una separación espacial de la molécula en una parte hidrofílica (parte polar y/o cargada) y otra parte hidrofóbica (una o mas cadenas alquílicas de un gran número de átomos de carbono saturados).

En la naturaleza existen una gran cantidad de sustancias anfifílicas, entre ellas los principales componentes de las membranas celulares, los fosfolípidos y los glicolípidos. Un tipo de cl que forma agregados con simetría de oblato, análogos a

membranas biológicas, son los cristales líotropicos nemáticos discoidales (clnd), por lo que el estudio de paratión disuelto en este tipo de sistemas permite dar una primera aproximación de lo que ocurre en sistemas biológicos con el ingreso de paratión a la membrana (Figura 6).

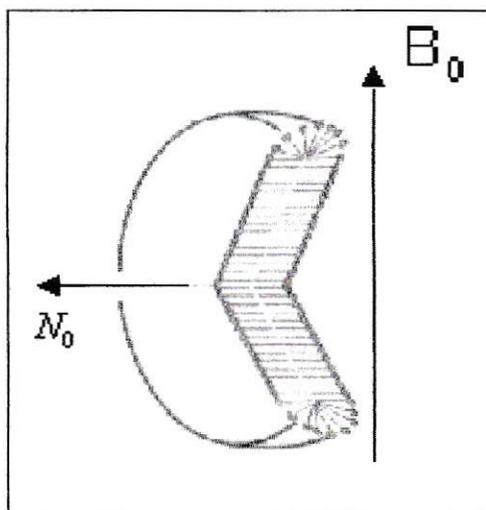


**Figura 6:** Cristal líquido líotropico nemático discoidal. A la derecha un clnd y a la izquierda un fragmento de membrana celular. El orden en ambos agregados es similar.

Los clnd se obtienen al mezclar ciertas cantidades determinadas de bromuro o cloruro de TTA/decanol/sal/agua. Estos cl poseen una característica muy particular para nuestro estudio y la técnica de RMN, ya se orientan espontáneamente en presencia de campos magnéticos externos, con el eje de simetría del disco perpendicular a la dirección del campo magnético aplicado<sup>9</sup> (Miño-Galaz, 1999) (Figura 7).

---

<sup>9</sup> Los clnd se orientan espontáneamente en presencia de campos magnéticos externos, esto ocurre gracias al tamaño reducido de los agregados y a la anisotropía diamagnética de estos, la cual se debe a la circulación de los electrones de las cadenas alifáticas de los detergentes que forman el agregado.



**Figura 7:** Agregado discoidal. Se orienta frente a un campo magnético externo  $B_0$ , de acuerdo a la figura.

Debido a que los clnd corresponden a fluidos anisotrópicos, donde no todas las direcciones del espacio son equivalentes, la información que se puede obtener a partir del espectro RMN es distinta a la información que se puede obtener del espectro de una solución isotrópica (Harris, 1986).

Empleando Resonancia Magnética Nuclear de deuterio ( $^2\text{H}$ -RMN), se midieron los desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu_Q$ ) y tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) de parafin- $d_4$ , obteniendo variables experimentales, tales como parámetros de orden del anillo aromático, los cuales están relacionadas con la orientación promedio y la movilidad de la molécula dentro de la mesofase.

Los efectos de la molécula agregada en los símiles de membranas biológicas fueron estudiados mediante la adición de decanol- $\alpha$ - $d_2$ . Las interacciones entre las moléculas de agua intersticial y la superficie de la bicapa, fueron estudiadas midiendo

el desdoblamiento cuadrupolar del agua deuterada (OHD), agregada como una disolución al 0,05% en el agua empleada para la preparación de las mesofases.

Los efectos que ocasiona este huésped en la estructura de la bicapa, también se estudiaron a través de Dinámica Molecular (DM), obteniendo información de la movilidad, localización, distribución y orientación promedio de paratión en la bicapa.

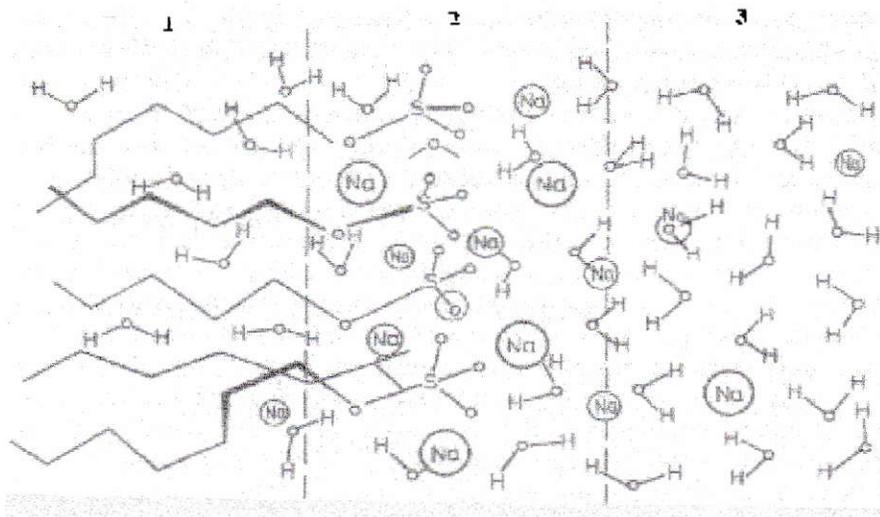
Las simulaciones computacionales se realizaron con el paquete de programas GROMACS v3.0<sup>10</sup>, donde se reprodujeron las condiciones experimentales. Se modeló un cl como una bicapa y tres moléculas de paratión se incorporaron en dicho sistema, ubicándolas en distintas regiones del símil de membrana.

Dentro de la bicapa, en la cual se incorporó paratión- $d_4$ , se pueden identificar tres regiones características, la primera región corresponde a la fase acuosa, formada por iones y moléculas de agua, la segunda corresponde a la interfase, donde se encuentran las cabezas polares de los anfifilos, contraiones, iones agregados y agua.

La tercera región corresponde al centro hidrofóbico, en esta región se encuentran todas las colas hidrofóbicas de las moléculas anfifílicas (Diehl & Khetrapal, 1969) (Figura 8).

---

<sup>10</sup> Gromacs User manual v.3.0. Van der Spoel, D., Van Buuren, A.R., Apol, E., Meulenhoff, P.J., Tieleman, D.P., Sijbers, A.L.T.M., Hess, B., Feenstra, K.A., Lindahl, E., Van Drunen, R., and Berendsen, H.J.C., Department of Biophysical Chemistry, University of Groningen, Groningen, The Netherlands, 2001.



**Figura 8:** Representación de las regiones de la bicapa, mostrando sus tres zonas.

Empleando DM, se estudiaron propiedades del sistema tales como el orden, organización y distribución promedio de los distintos componentes de la bicapa. A través de funciones de distribución radial, tiempos de correlación reorientacional, tiempos de relajación, parámetros de orden, distribución de masas y distribución de cargas, también se estudió la distribución, localización y movilidad promedio de paratión disuelto en el cilnd.

## II.- METODOLOGIA

El estudio de la distribución, orientación promedio y dinámica reorientacional de paratión- $d_4$  disuelto en miméticos de membranas biológicas, se realizó utilizando clnd. Los efectos producidos por este insecticida dentro del agregado fueron observados a través de DM y  $^2\text{H}$ -RMN.

Se sintetizó paratión deuterado en el anillo aromático ( $d_4$ ), se incorporó al cristal líquido y empleando  $^2\text{H}$ -RMN se obtuvo información acerca de la localización, movilidad y orientación promedio del insecticida en el agregado.

El cl fue modelado a través de DM, como una bicapa y tres moléculas de paratión fueron colocadas en distintas regiones de ésta, obteniendo de esta forma la trayectoria del sistema, la cual posee toda la información necesaria para el estudio del pesticida dentro agregado. Para tener un mejor entendimiento del fundamento de estas dos valiosas herramientas (DM y  $^2\text{H}$ -RMN), a continuación se realiza una breve descripción de ellas.

### II.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN)

La espectroscopía se define como la interacción entre la materia y la radiación electromagnética. Existen varios tipos de espectroscopía, tales como las de Fluorescencia, IR, RMN, etc. Sin embargo la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear, es quizás la técnica más poderosa y versátil para la dilucidar estructuras y dinámicas de moléculas, utilizada en las últimas décadas (Hore, 1995).

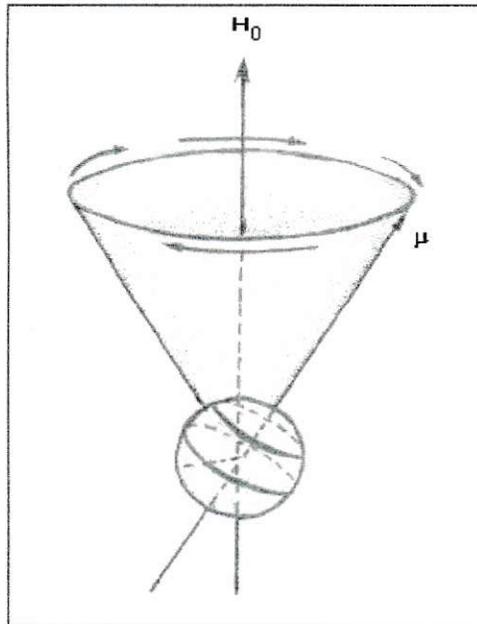
Para poder comprender la base de esta técnica, se revisaran algunos conceptos básicos de la física.

### **II.1.1.- Espines y Momentos magnéticos**

Las partículas elementales poseen propiedades básicas como la carga, masa y espín o momento angular intrínseco.

El espín es una propiedad de suma importancia para poder comprender la base de RMN y puede ser definido como la rotación de la partícula en torno a su propio eje (Robin & Harris, 1986). El espín nuclear, es la resultante de los momentos angulares de espín de los neutrones y protones que componen el núcleo. Existen dos números cuánticos que describen las propiedades magnéticas del núcleo de un átomo,  $I$  y  $m_I$ , donde  $I$  determina el valor del momento angular de espín nuclear y  $m_I$  la componente Z del momento angular.

Una consecuencia del momento angular de espín nuclear, es la aparición de un dipolo magnético o momento magnético, de magnitud  $\mu$  (Figura 9).



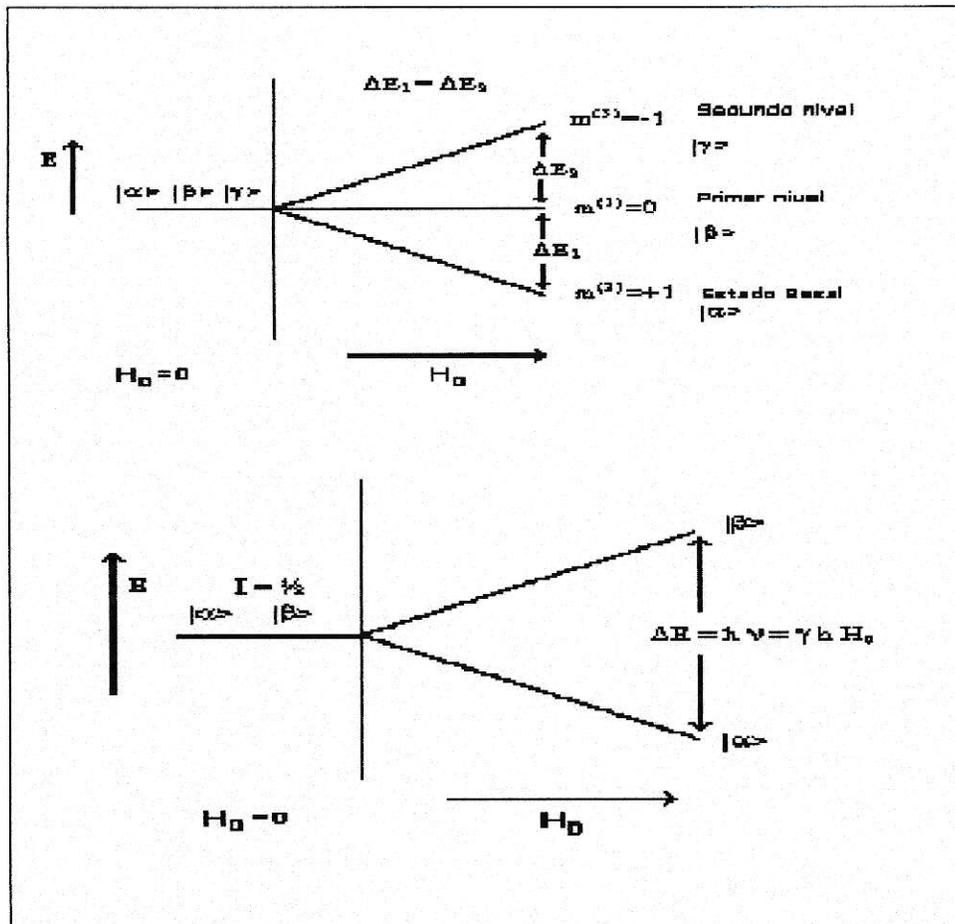
**Figura 9:** Núcleo de hidrógeno. Momento magnético  $\mu$ , en torno al campo magnético externo  $H_0$ .

Debido a que el momento angular de espín nuclear se encuentra cuantizado, el momento magnético  $\mu$  y su energía, también están cuantizados y cada estado de energía puede ser descrito por un conjunto de números cuánticos adecuados, que son resultantes de una función de onda de estado estacionario que describe totalmente su comportamiento.

El número cuántico de espín nuclear  $I$ , puede tomar valores enteros y semienteros, siendo el número de estados posibles igual a  $2I + 1$ , para un cierto valor de  $I$ . Estos estados están caracterizados por el número cuántico  $m_I$ , que determina la orientación del momento magnético  $\mu$  en presencia de un campo magnético externo aplicado ( $H_0$ ). En ausencia de campos magnéticos externos las posibles orientaciones de  $\mu$  (desde  $-I$  hasta  $+I$ ), poseen la misma energía, es decir se encuentran

degenerados. Al encontrarse la partícula en presencia de un campo magnético externo, los estados del momento magnético, adquieren valores distintos de energía, rompiéndose así los estados degenerados.

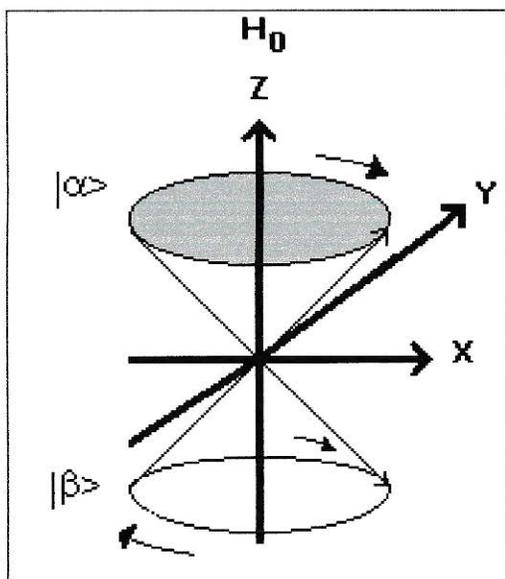
En el caso del núcleo de deuterio ( $^2\text{H}$ ) que presenta un número cuántico de espín nuclear  $I = 1$ , el número de posibles estados u orientaciones con respecto al campo magnético externo ( $H_0$ ) del momento magnético nuclear es igual a 3. Al aplicar un campo magnético externo se rompen los estados degenerados separándose en los distintos niveles, produciéndose diferencias de energía entre los estados magnéticos del núcleo, siendo estas diferencias las que se observan al realizar un experimento de RMN. La ruptura de los estados degenerados de energía del momento magnético del núcleo en presencia de un campo magnético externo aplicado ( $H_0$ ) es un fenómeno llamado efecto Zeeman (Robin & Harris, 1986) (Figura 10).



**Figura 10:** Efecto Zeeman. En la figura superior se muestra el caso de  $l = 1$ , la figura inferior el caso de  $l = 1/2$ .  $|\beta\rangle$ ,  $|\alpha\rangle$  y  $|\gamma\rangle$ , funciones que describen los posibles estados de energía de la partícula.

### II.1.2.- Condición de Resonancia

Las posibles orientaciones del momento magnético  $\mu$ , con respecto al campo magnético externo  $H_0$  no se presentan como una simple alineación en torno a este, sino más bien corresponde a una precesión del momento magnético  $\mu$  en torno al campo magnético externo aplicado, como consecuencia del principio de incertidumbre de Heisenberg (Bethe & Jackiw, 1997) (Figura 11).



**Figura 11:** Precesión de un núcleo con espín  $\frac{1}{2}$ . Esta precesión es consecuencia del principio de incertidumbre de Heisenberg.

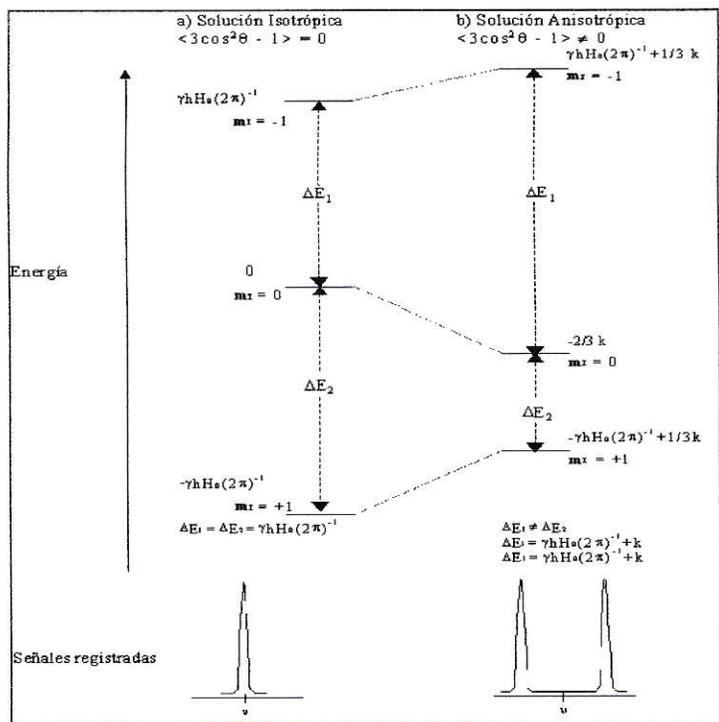
Esta precesión de  $\mu$  en torno al campo, lleva asociada una frecuencia característica de cada núcleo, conocida como frecuencia de Larmor ( $\omega_0 = \gamma H_0$ ), donde  $\gamma$  es la razón giromagnética y  $H_0$  es el campo magnético. Cuando la frecuencia del pulso de radiación aplicada al núcleo, es igual a la frecuencia de Larmor, las partículas se van a transferir del estado de menor energía al estado de mayor energía, produciéndose la “condición de resonancia”, dando como resultado transiciones de energía ( $\Delta m_{\pm} = \pm 1$ ) entre los distintos niveles y las señales espectroscópicas observadas (Carrington & McLachlan, 1979).

### II.1.3.- Interacción Dipolar y Cuadrupolar

Las interacciones dipolar y cuadrupolar nuclear observadas al realizar un experimento de RMN, dependen del grado de libertad de movimiento de los núcleos, es decir de la orientación promedio y movilidad que tienen éstos en una determinada solución o medio. En soluciones isotrópicas de baja viscosidad, el libre movimiento molecular promedia a cero estas interacciones, ya que en este tipo de soluciones las direcciones en el espacio son equivalentes, por lo que no aparecen en el espectro de RMN. Por otra parte si colocamos una molécula en una solución anisotrópica, su movimiento será restringido en ciertas direcciones del espacio, como ocurre en cristales líquidos<sup>11</sup>, haciéndose evidentes las interacciones dipolar y cuadrupolar en el espectro, ya que estas no se promedian a cero (Araya-Maturana y col, 2004) (Figura 12).

---

<sup>11</sup> Debido a la anisotropía de la solución de cristal líquido la energía de los niveles  $m_l = -1, 0, +1$ , varía, haciendo variar también  $\Delta E_1$  y  $\Delta E_2$ .

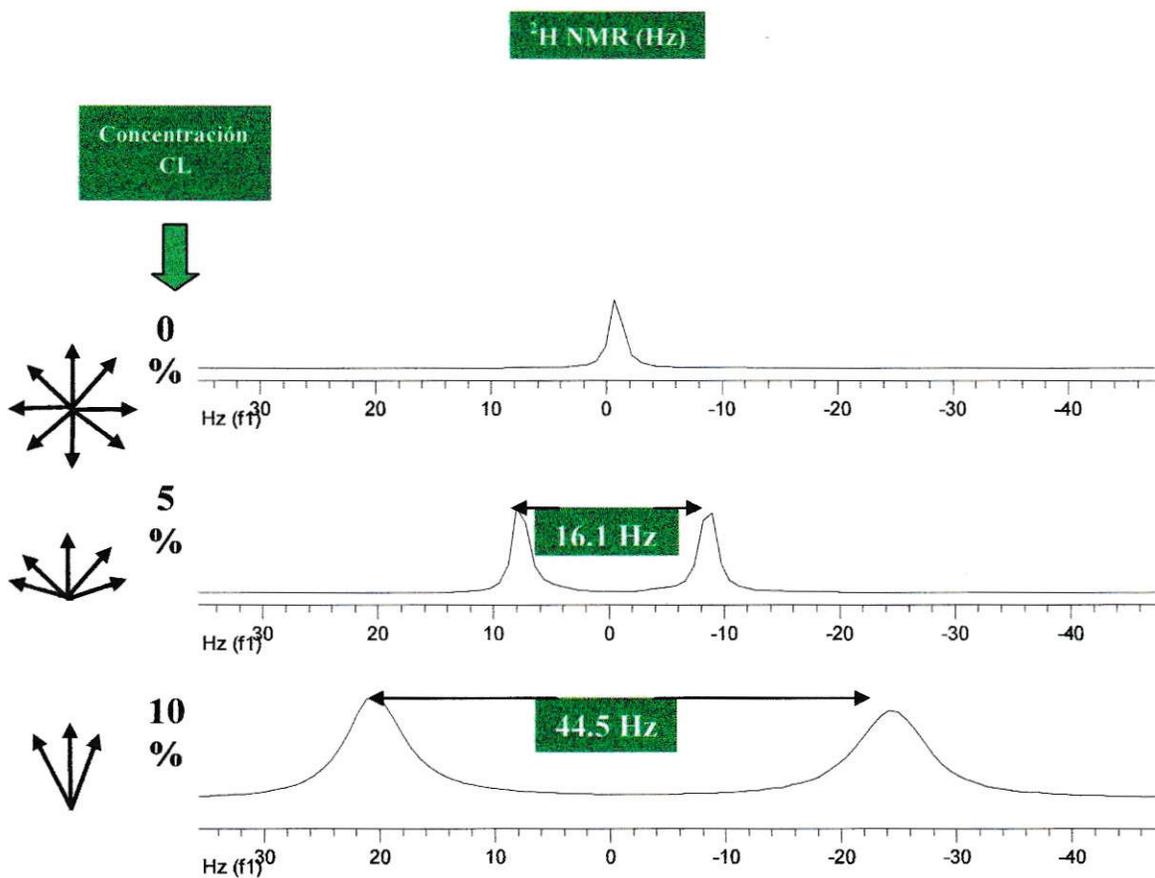


**Figura 12:** Niveles de energía para un núcleo de deuterio en presencia de un campo magnético externo  $H_0$ . a) Solución isotrópica; b) Solución anisotrópica.

Núcleos con número cuántico de espín  $I \geq 1$ , que poseen cuádrupolo eléctrico, como es el caso del deuterio, son de mucho interés para este estudio.

La interacción cuadrupolar se presenta en núcleos con número cuántico de espín  $I \geq 1$  y se produce entre la gradiente del campo eléctrico del entorno electrónico del núcleo en cuestión y el momento cuadrupolar eléctrico nuclear. En este caso la interacción depende directamente del promedio  $\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle$ , donde  $\theta$  es el ángulo formado entre el campo magnético externo y el eje principal de la gradiente del campo eléctrico en el entorno del núcleo, prácticamente co-lineal al enlace C-D.

En una solución anisotrópica la molécula no presenta libre rotación, ya que todas las posibles direcciones en el espacio no están presentes con igual probabilidad, con lo que el valor de la interacción cuadrupolar es distinta a cero, manifestándose en el espectro como un desdoblamiento residual, llamado desdoblamiento cuadrupolar ( $\Delta\nu_Q$ ), el cual puede ser obtenido directamente del espectro y se mide en Hz (Figura 13).



**Figura 13:** Acoplamiento residual cuadrupolar ( $\Delta\nu_Q$ ), el cual puede ser obtenido directamente del espectro y se mide en Hz.

#### II.1.4.- Parámetros de orden enlace C-D

En presencia de un campo magnético externo ( $H_0$ ), el desdoblamiento cuadrupolar observado, es proporcional al parámetro de orden del enlace C-D ( $S_{CD}$ ). El  $S_{CD}$  nos da una medida de la dinámica reorientacional de moléculas disueltas en sistemas ordenados, como lo son las bicapas lipídicas y también es función de la orientación de la molécula con respecto a la dirección del campo magnético externo (Diehl & Khetrapal, 1969).

En la gran mayoría de los casos, la información que se puede obtener de un espectro de RMN, de una solución isotrópica de baja viscosidad, corresponde al promedio de un observable sobre todas las posibles orientaciones moleculares, por lo que en una solución de este tipo, la información acerca de un observable se pierde debido a la libre rotación de la molécula en la solución, promediando estas interacciones a cero.

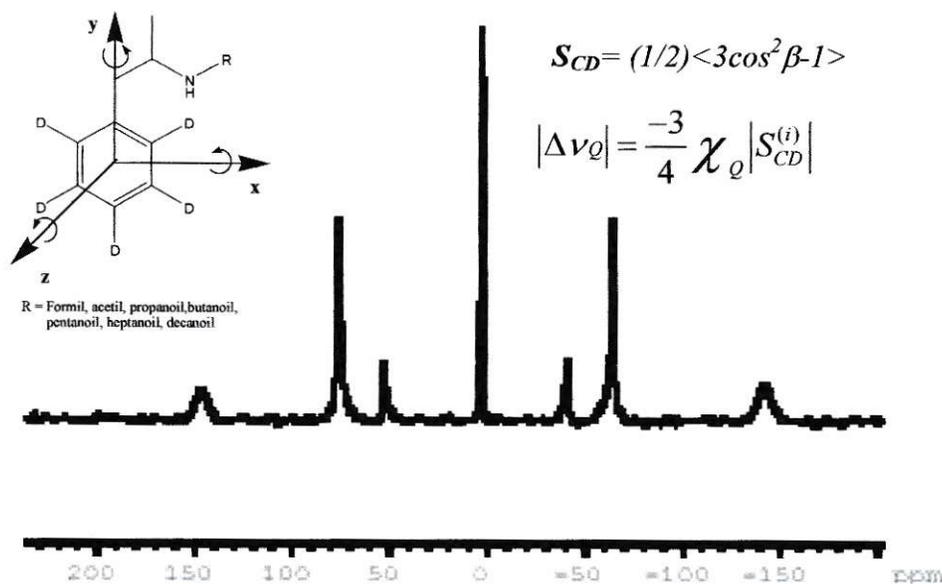
Para tener un mejor acceso a esta información, resulta útil el empleo de soluciones anisotrópicas, en este tipo de solución, estas propiedades se promedian solo parcialmente a cero, obteniéndose un valor residual de la propiedad en observación.

La orientación promedio de un cuerpo rígido en un campo magnético externo, puede ser descrita totalmente por la matriz de orden  $S$ , que es proporcional a la interacción dipolar y cuadrupolar. Esta matriz contiene elementos, que poseen el número mínimo de parámetros necesarios para describir la orientación de un cuerpo rígido asimétrico.

El  $S_{CD}$  es igual a  $(1/2)\langle 3\cos^2\beta - 1 \rangle$ , donde  $\beta$  es el ángulo entre el enlace C-D y el campo magnético externo y es el promedio sobre todas las posibles orientaciones.

Valores de  $S_{CD}$  igual a 1,0 son para ejes orientados paralelos con respecto al campo, -0,5 para ejes orientados perpendiculares a la dirección del campo y valores de 0,0 para un eje que rota libremente u orientado en la dirección del ángulo mágico ( $54,7^\circ$ ).

Conociendo los desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu_q$ ) del anillo aromático de paratión, es posible calcular directamente el valor del parámetro de orden  $S_{CD}$ , el cual depende de la movilidad y orientación molecular (Figura 14).

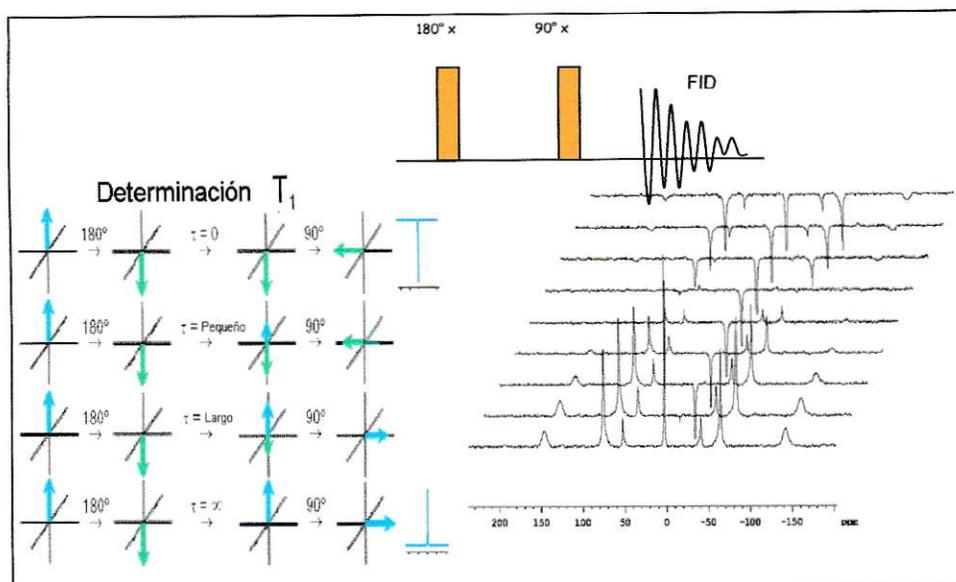


**Figura 14:** Parámetros de orden ( $S_{CD}$ ). Los valores de los desdoblamientos cuadrupolares observados para el anillo aromático son un reflejo de los parámetros de orden de los ejes de interacción.

### II.1.5.- Tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ )

A través de  $^2\text{H}$ -RMN se puede obtener, el tiempo de relajación longitudinal ( $T_1$ ), tiempo característico correspondiente al restablecimiento de las desigualdades de Boltzman después de un pulso de energía, y depende sólo de la movilidad del enlace C-D, para núcleos con número cuántico de espín  $\geq 1$ .

En el caso particular de moléculas que poseen enlaces C-D, es posible relacionar el  $T_1$ , con el tiempo de autocorrelación rotacional del enlace C-D ( $\tau_c$ ). La función de autocorrelación rotacional, llamada también función memoria, nos indica los cambios de una cierta propiedad y su persistencia en el tiempo. Si se ajusta esta función a un decaimiento monoexponencial se obtiene el tiempo de autocorrelación rotacional  $\tau_c$ , el cual es una medida de la movilidad molecular. Para poder determinar  $T_1$  en un experimento de RMN, se utiliza la secuencia de pulsos conocida como inversión RECOVERY ( $T_1\text{RI}$ ) (Cowan, 1997; Pursey, 1961) (Figura 15).



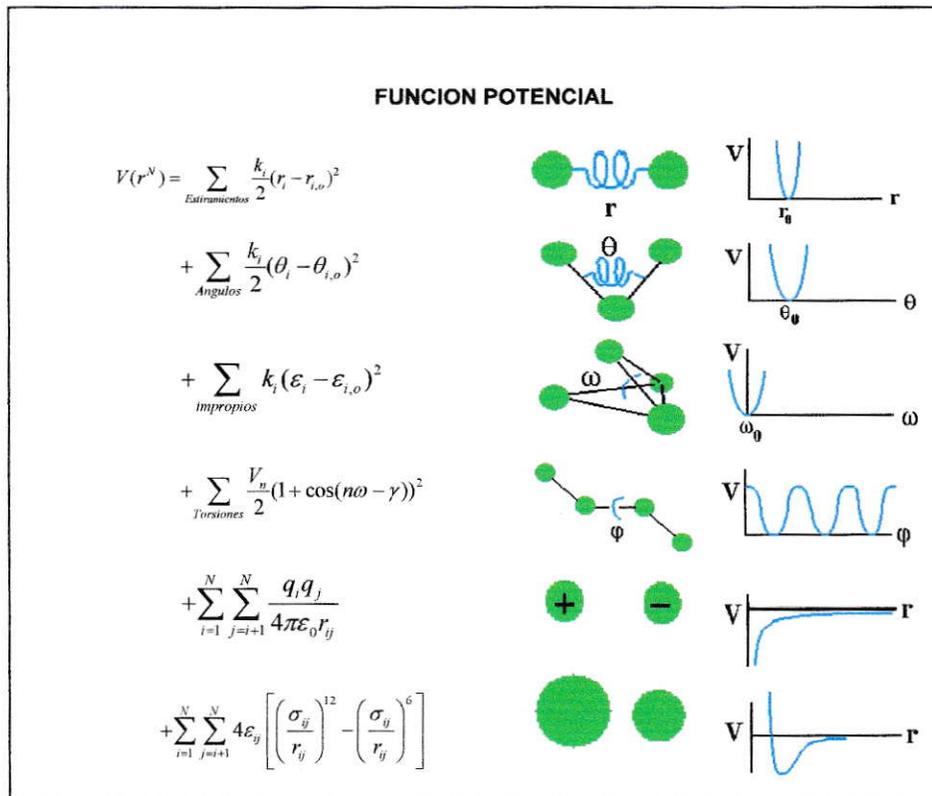
**Figura 15:** Tiempo de relajación ( $T_1$ ). Se mide empleando la secuencia de pulsos conocida como inversión RECOVERY ( $T_1$ RI).

## II.2.- DINAMICA MOLECULAR (DM)

La Dinámica Molecular (DM) es una técnica de simulación en que átomos y moléculas interactúan de acuerdo a un cierto potencial.

En general, los sistemas estudiados son complejos y consisten de un gran número de átomos, por lo que se hace casi imposible poder encontrar todas sus propiedades de forma analítica. Para resolver este problema, la DM utiliza métodos numéricos, que describen el comportamiento de estos sistemas moleculares complejos a nivel atómico, a través de las simulaciones computacionales. Si bien es cierto que este modelo simplifica el problema real, de igual forma permite predecir valores de propiedades que son de gran utilidad en la interpretación de resultados experimentales.

En este tipo de simulaciones se visualizan las moléculas en términos de átomos que se mantienen unidos por enlaces representados por resortes, potenciales periódicos para las superficies conformacionales, además de interacciones de Coulomb y van der Waals entre átomos no enlazados (Leach, 2001) (Figura16).



**Figura 16:** Función potencial, en la cual se basa la DM. Esta considera las distintas interacciones entre los átomos.

La DM se basa en una función de energía potencial, dada por las atracciones y repulsiones entre los átomos, por el campo de fuerza del sistema y es función de las

coordenadas de todas las partículas de este. Esta función considera las distintas interacciones entre los átomos: enlazantes (estiramientos, ángulos, ángulos de torsión) y no enlazantes (interacciones de Van der Waals y de Coulomb), las cuales tienen parámetros constantes definidos para cada grupo de átomos interactuantes, parámetros que se encuentran en el campo de fuerza del modelo.

Empleando la segunda ley de Newton, suponiendo posiciones iniciales y un conjunto de fuerzas que actúan sobre cada una de las partículas del sistema en estudio, es posible obtener la trayectoria.

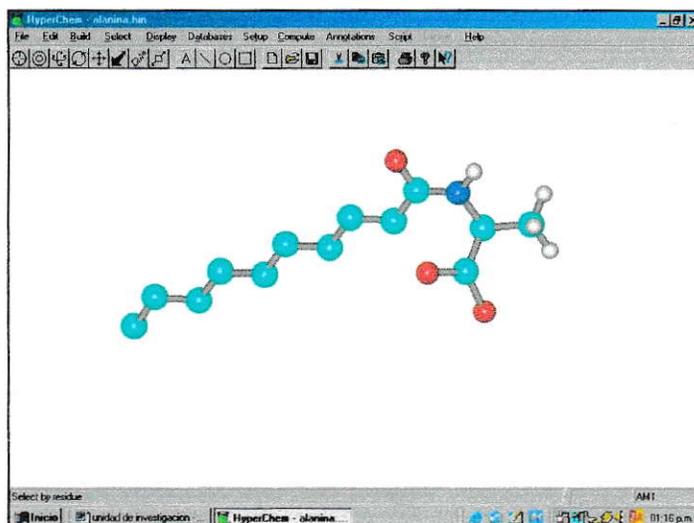
A partir de la trayectoria obtenida, se calculan, las propiedades que describen la estructura del sistema, como los perfiles de densidad y funciones de distribución radial, además de propiedades dinámicas como lo son los tiempos de autocorrelación rotacional y parámetros de orden, entre otras.

### **II.2.1.- Simulación componentes del sistema**

La construcción y optimización de geometría de la molécula de paratión y de los surfactantes (TTA y Deo) del símil de membrana biológica se realizó través de un programa computacional llamado HyperChem<sup>12</sup> (figura 17).

---

<sup>12</sup> “User guide, theory and methods”. Hypercube Inc. HyperChem, *Computational Chemistry*.. (1996)(T) (366s). djvu



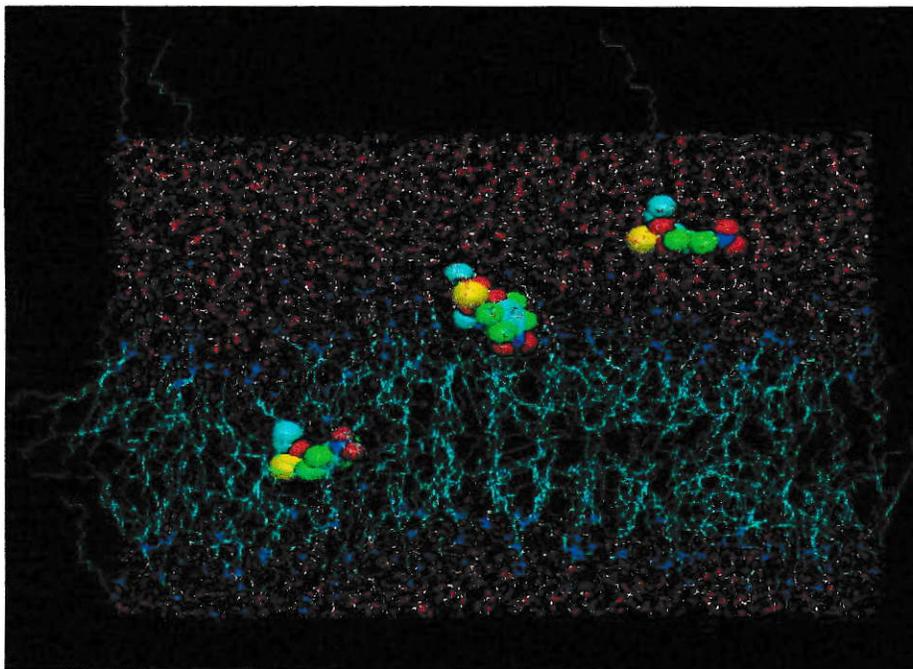
**Figura 17:** Programa Hyperchem v7.0. Construcción y optimización de geometría típica.

## II.2.2.- Dinámica Molecular y modelación del sistema

El cl se modeló como una bicapa, construida a partir de agua (4.192 H<sub>2</sub>O), cloruro de sodio (288 NaCl), cloruro de tetradeciltrimetilamonio (192 TTACl) y decanol (96 DeOH).

Posteriormente fueron colocadas dentro de la bicapa tres moléculas de paratión en distintas regiones ésta. Se ubicó una molécula en la fase acuosa, la interfase y centro hidrofóbico de ésta.

Los átomos de hidrógeno de las cadenas lipídicas de los surfactantes no son representados explícitamente y se utilizó una aproximación de átomos condensados (Figura 18).



**Figura 18:** DM de paratión. Sistema constituido por agua ( $H_2O$ ), cloruro de sodio ( $NaCl$ ), cloruro de tetradeciltrimetilamonio (TTACl), decanol (DeOH) y 3 moléculas de paratión ubicadas en distintas regiones de la bicapa.

Las interacciones que posee cada átomo fueron definidas y reproduciendo las condiciones experimentales se realizó la simulación computacional del sistema.

Para obtener la trayectoria se utilizó el paquete de programas GROMACS v3.0<sup>13</sup>. Para este tipo de cálculo normalmente se elige un intervalo de integración en el tiempo suficientemente pequeño, 2 femtosegundos (fs). La visualización de las trayectorias y los gráficos moleculares, se realizó a través del programa VMD<sup>14</sup>.

---

<sup>13</sup> "GROMACS". Groeningen Machine for Chemical Simulations. [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org).

<sup>14</sup> "VMD User's Guide". April 3, 2007. Theoretical and Computational Biophysics Group. University of Illinois and Beckman Institute. 405 N. Mathews Urbana, IL 61801. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

Para comprender mejor el comportamiento, orientación promedio, distribución y dinámica de paratión en análogos de membranas biológicas, se estudiaron propiedades del sistema tales como:

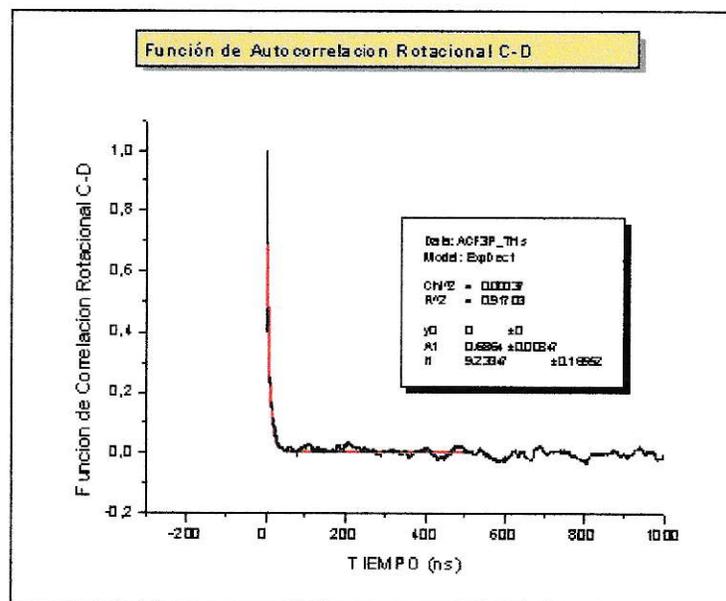
### **II.2.3.- Función de autocorrelación rotacional**

La función memoria o de autocorrelación rotacional, es dependiente del movimiento Browniano de los componentes del sistema y establece en que medida están correlacionados los estados de en ciertos intervalos de tiempo (Verlet, 1968).

Producto de la movilidad molecular, las propiedades magnéticas de los núcleos se transforman en propiedades dependientes del tiempo, haciendo que la libre rotación de las moléculas en el medio sean influenciadas por las moléculas vecinas del sistema. Debido a que el concepto de movilidad molecular es complicado (traslación, rotación, rotación interna, vibración, etc.) se asimila que todo el movimiento de la molécula es de rotación, por lo que los tiempos de relajación pueden proporcionar información sobre el movimiento dinámico de rotación de las moléculas en disolución. Uno de los parámetros dinámicos que se puede obtener con el estudio de los procesos de relajación es el tiempo de autocorrelación rotacional ( $\tau_c$ ), que es una medida del tiempo que tarda la molécula en rotar un radian en cualquier eje.

Empleando la trayectoria es posible calcular la función de autocorrelación rotacional del enlace C-D y aproximando la función a un decaimiento monoexponencial se puede obtener el tiempo de correlación rotacional del enlace C-D ( $\tau_c$ ), el cual nos entrega una medida de la movilidad del anillo aromático del pesticida disuelto en el cl.

El tiempo de autocorrelación rotacional es en cierta forma inversamente proporcional al tiempo de relajación longitudinal del núcleo, por lo que a mayores  $\tau_c$  menores  $T_1$  y por lo tanto menor es la movilidad de la molécula en el medio en el cual se encuentra disuelta (Figura 19).

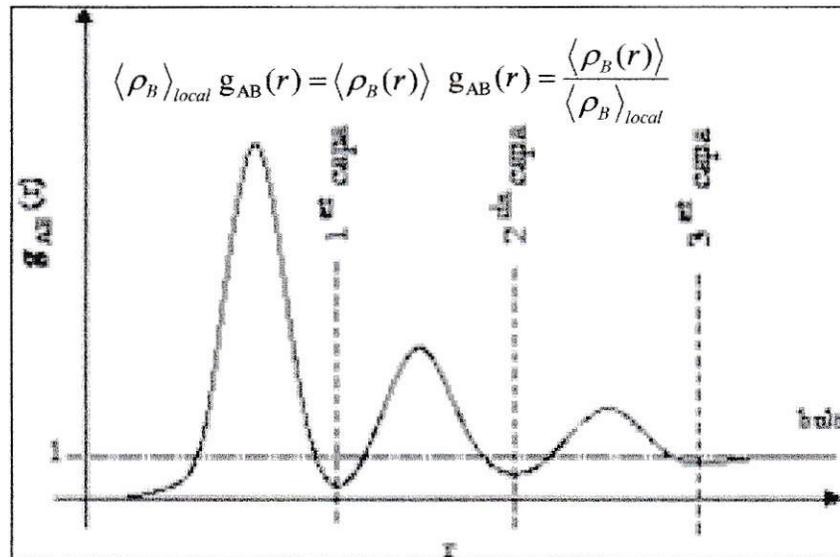


**Figura 19:** Función de autocorrelación rotacional. Ajuste a un decaimiento monoexponencial.

#### II.2.4.- Función de distribución radial (RDF)

La función de distribución radial (RDF) o también llamada función de correlación de pares (McQuarrie, 1976), es el camino más usado para describir la estructura microscópica de un sistema y permite estimar la probabilidad de encontrar una partícula a una cierta distancia de otra partícula de referencia.

En la práctica la RDF se calcula tomando un átomo de referencia con respecto a otro, obteniendo la densidad macroscópica del sistema y la densidad local (Figura 20).



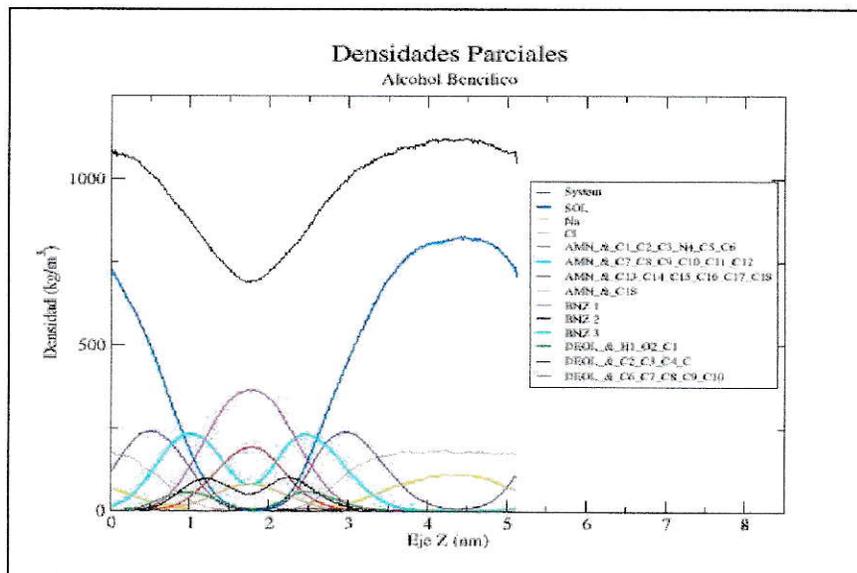
**Figura 20:** Función de distribución radial (RDF), gráfico representativo. Consiste en construir cascarones esféricos concéntricos alrededor de la partícula de interés.

Este método consiste en construir cascarones esféricos concéntricos alrededor de la partícula de interés, en este caso paratión, y medir la densidad local del sistema dentro de la cáscara, permitiendo estimar el número de especies que se encuentran interactuando a una cierta distancia del pesticida, obteniendo de esta forma una imagen clara acerca del ordenamiento particular alrededor de una cierta especie atómica o molecular.

## II.2.5.- Perfiles de densidades parciales

### II.2.5.1.- Densidades de masas

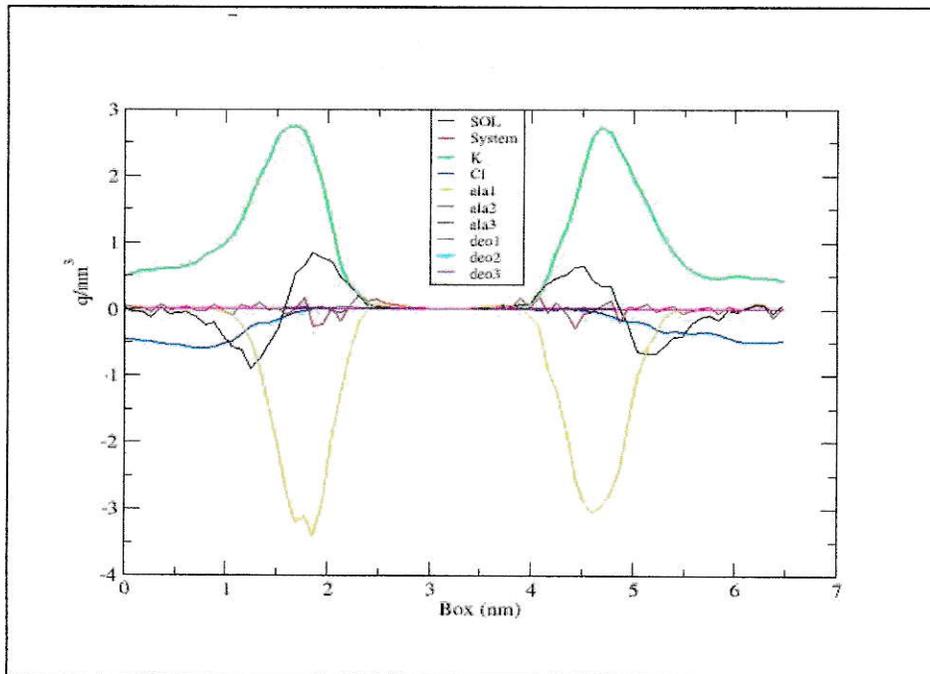
Uno de los métodos más convenientes para describir la localización de los distintos componentes de la bicapa a lo largo de cierto eje, es el perfil de densidad. En este cálculo la caja del sistema en estudio se divide en capas perpendiculares a lo largo del eje normal a la bicapa (eje Z), se calcula la densidad de masa de cada uno de los constituyentes del sistema y se grafica un promedio en el tiempo de las densidades en función de la posición del centro de masa de cada uno de los cortes (McQuarrie, 1976) (Figura 21).



**Figura 21:** Perfil de densidades parciales de un sistema típico en estudio, entregado por el paquete de programas GROMACS v3.0. Se calcula la densidad a través de la caja con respecto al eje Z de la bicapa.

### II.2.5.2.- Densidades de cargas

El perfil de densidad de carga permite dar una interpretación del comportamiento de las especies cargadas en el sistema. Al igual que el perfil de masa, se divide la caja del sistema en capas a lo largo de un eje, generalmente el eje perpendicular a la normal de la bicapa (eje Z), se suman las cargas de todos los átomos de un grupo por cada corte y se grafica el promedio en el tiempo de las cargas en función de la posición del centro de masa de los componentes del sistema a lo largo del eje (Figura 22).



**Figura 22:** Perfil de densidades de cargas de los componentes de un sistema típico en estudio, entregado por el paquete de programas GROMACS v3.0. Promedio en el tiempo de las cargas en función de la posición del centro de masa.

### **III.- HIPOTESIS DE TRABAJO**

El modo de acción de paratión en organismos vivos debería depender de su distribución, orientación promedio y dinámica reorientacional en la membrana y sus efectos sobre la misma. Este pesticida al ser una molécula con grupos polares y grupos apolares debería ubicarse en la interfase de la membrana, afectando de alguna forma ciertas propiedades catalíticas de proteínas y/o neurotransmisores presentes en ella.

#### **III.1.- OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS**

La localización, orientación promedio y dinámica de paratión en la membrana, resulta útil para un mejor entendimiento acerca del modo de acción de este pesticida, por lo que se estudiará el efecto que produce a nivel molecular paratión en el agregado, utilizando un modelo simple de membrana biológica. Para este fin se plantearon los siguientes objetivos generales y específicos.

##### **III.1.a.- Objetivo general**

Entender, observar y estudiar los efectos que causa paratión- $d_4$  al interior de cristales líquidos liotrópicos nemáticos discoidales (clnd), utilizados como miméticos de membranas celulares, empleando  $^2\text{H}$ -RMN y DM.

### III.1.b.- Objetivos específicos:

- 1.- Sintetizar paratión deuterado en el anillo aromático ( $d_4$ ).
- 2.- Medir los desdoblamientos cuadrupolares y tiempos de relajación longitudinal de deuterio a través de  $^2\text{H}$ -RMN.
- 3.- Calcular parámetros de orden del anillo aromático de paratión- $d_4$ .
- 4.- Realizar dinámicas moleculares del sistema.
- 5.- Calcular tiempos de autocorrelación rotacional, tiempos de relajación longitudinal de deuterio y parámetros de orden a través de DM.
- 6.- Calcular funciones de distribución radial, densidades parciales de masas, de cargas y orientación promedio de paratión.

## **IV.- ESTUDIO DE LA INCORPORACION DE PARATION EN SIMILES DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

### **IV.1.- PREPARACION DE PARATION- $d_4$ Y MESOFASES**

#### **IV.1.2.- Materiales y métodos**

La síntesis de paratión- $d_4$  (O,O-Dietil-O-4-nitrofenil- $d_4$ -tiofosfato), se realizó empleando una serie de reacciones, con el fin de obtener deuterado en el anillo aromático al pesticida.

##### **IV.1.2.1.- Síntesis de paratión- $d_4$**

En una primera reacción, la síntesis se realizó en fase sólida, para optimizar la nitración del anillo aromático en la posición *para*. El compuesto de partida fue fenol deuterado en el anillo aromático (fenol- $d_5$ ). La fase sólida que se utilizó en esta síntesis fue sílica sulfúrica ácida, la cual también fue preparada (Zolfigol, 2001). La secuencia de la síntesis del pesticida se resume a continuación.

##### **IV.1.2.1.1- Obtención de sílica ácida sulfúrica**

En un balón de 250 ml se agregaron 20 g de sílica gel (1). Posteriormente en un embudo de adición a presión constante se agregaron 4,3 ml de ácido clorosulfónico (2) gota a gota por un tiempo aproximado de 30 min sobre la sílica gel, obteniéndose

la sílica sulfúrica ácida (3). El sistema se debe mantener en constante agitación por un tiempo 20 min como mínimo, para eliminar todo el ácido clorhídrico (4) producido durante la reacción, siendo este finalmente burbujeado en un recipiente con hidróxido de sodio acuoso ( $\text{NaOH}_{(\text{ac.})}$ ) (Reacción I). La sílica sulfúrica ácida obtenida fue guardada luego en un recipiente cerrado por tan solo unas horas, ya que ésta debe ser utilizada de inmediato, debido a que pierde sus propiedades catalíticas.

#### Reacción I



#### **IV.1.2.1.2.- Nitración de fenol- $d_5$**

Una vez obtenida la sílica sulfúrica ácida, en un mortero se pulverizaron: 3,6 g de sílica sulfúrica ácida (1), 0,54 g de nitrato de sodio (2), 3,04 g de sílica gel húmeda al 60 % p/p (3) y 0,5 g de fenol deuterado (fenol- $d_5$ ) (4) en el anillo aromático (90% de Deuterio). Todos estos reactivos fueron homogeneizados y pulverizados durante un tiempo aproximado de 30 min. El término de la reacción se controló a través de cromatografía en capa fina (Reacción II.b).

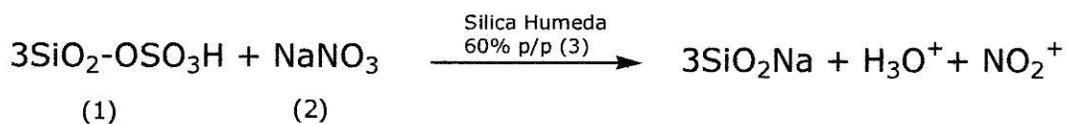
Una vez obtenidos los nitrocompuestos éstos se extraen con sucesivas alícuotas de 20 ml de diclorometano, para posteriormente ser separados a través de

cromatografía en columna, se utilizó una mezcla de solventes en las siguientes proporciones: 0,8 de acetato de etilo, 0,2 de acetona y 2,0 de n-hexano.

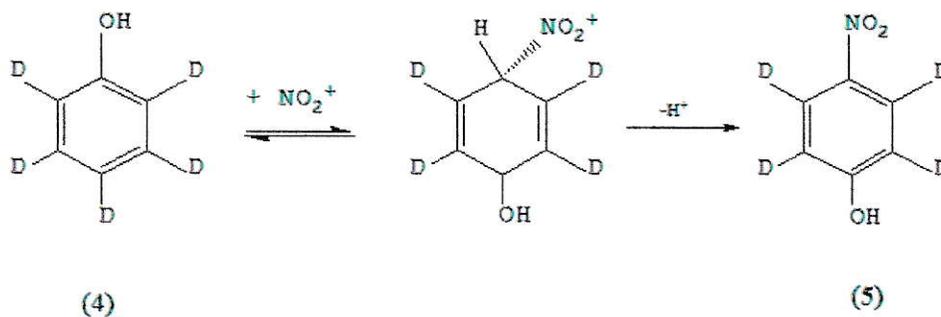
Para identificar las fracciones en las cuales se encontraba el producto (paranitrofenol- $d_4$ ) se utilizó cromatografía de capa fina. Una vez identificadas las fracciones, se evaporó el solvente hasta obtener el paranitrofenol- $d_4$  (5).

### Reacción II

a)



b)

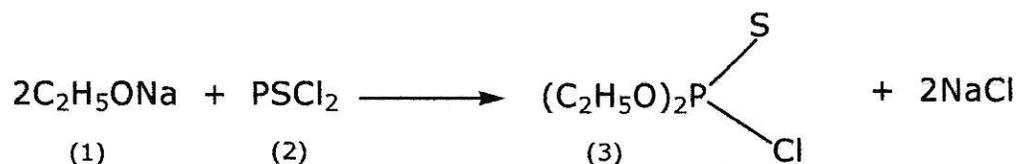


### V.1.2.1.3.- Síntesis de O,O-dietil-clorotiofosfato

En un balón de 50 ml se agregaron 0,26 g de sodio metálico ( $\text{Na}^0$ ) en 18,53 ml de tetrahidrofurano (THF), formándose de esta forma el etóxido de sodio ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}$ ) (1). En un embudo de adición se colocaron 10 ml de etanol uvasol, agregando posteriormente 6,3 g de cloruro de tiosforil ( $\text{PSCl}_2$ ) (2), los cuales fueron agregados gota a gota a la misma solución donde se había formado anteriormente el étoxido de sodio (Reacción III). La solución se dejó en agitación constante durante algunas horas, hasta que reaccionó todo el étoxido de sodio.

El O,O-dietil-clorotiofosfato ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{PSCl}$ ) (3) obtenido fue purificado en un equipo de destilación al vacío, luego guardado y refrigerado para su posterior utilización.

#### Reacción III



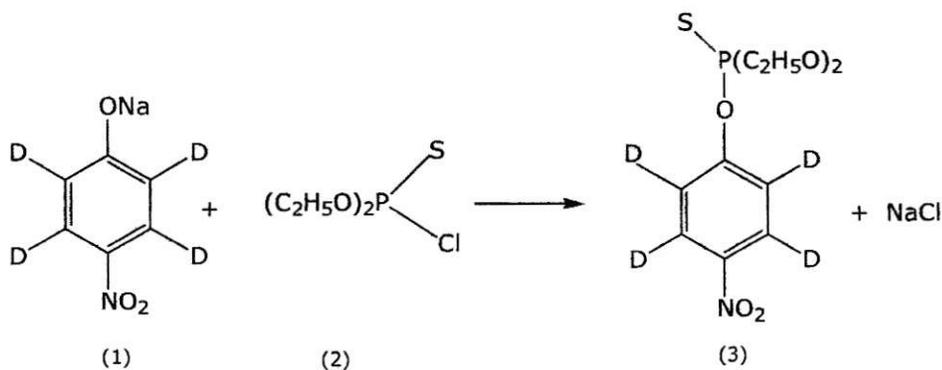
### IV.1.2.1.4.- Síntesis de paranitrofenóxido de sodio ( $d_4$ ) y obtención de O,O-Dietil-O-4-nitrofenil- $d_4$ -tiofosfato (paratión- $d_4$ )

400 mg de paranitrofenol- $d_4$ , obtenidos en la Reacción III, fueron disueltos en 5 ml de THF y agregados a un embudo de adición. 170 mg de hidruro de sodio (NaH) y

5 ml de THF se agregaron a un balón de 50 ml, posteriormente gota a gota se agregó paranitrofenol- $d_4$  disuelto en THF. La solución obtenida se dejó agitando por unas horas hasta que todo el NaH reaccionó por completo.

Una vez formado el paranitrofenóxido de sodio deuterado ( $C_6D_4ONaNO_2$ ) (1) (Reacción IV), se agregaron 200 mg de *O,O*-dietil-clorotiofosfato (2) a la solución gota a gota y se dejó en agitación constante por un día. El crudo de paratión- $d_4$  (3) obtenido fue disuelto en tolueno y lavado con agua, formándose dos fases, las cuales fueron separadas. La porción que contenía al pesticida fue destilada al vacío y posteriormente purificada por cromatografía de capa fina preparativa.

#### Reacción IV



#### **IV.1.2.2.- Preparación de la muestra y mesofases**

La muestra de cl fue preparada a partir de 551 mg de cloruro de tetradeciltrimetilamonio (TTAC), 171 mg de cloruro de sodio (NaCl), 138  $\mu\text{L}$  de decanol (DeOH al 15% decanol- $d_2$ ) y 1.500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  (0,05%  $\text{D}_2\text{O}$ ). La mezcla se

homogeneizó por sucesivas agitaciones y centrifugaciones, hasta alcanzar la contextura de un líquido viscoso transparente. Luego se agregaron 15 mg de paratión- $d_4$  al  $cd_4$ , homogeneizando nuevamente por agitaciones y centrifugaciones sucesivas hasta que el compuesto se disolvió por completo en el cristal. Por último la muestra se trasvasió a un tubo de resonancia magnética nuclear para su posterior medición.

#### **IV.1.2.3.- Espectros $^2H$ -RMN**

Los espectros fueron tomados a 300 K empleando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance 400 NMR<sup>15</sup>.

Un pulso de 90° de una duración de 19  $\mu s$ , a la frecuencia de deuterio (64,1 MHz) y con una ventana espectral de 25 kHz fueron utilizados para la medición de los espectros de  $^2H$ -NMR.

Los errores experimentales en las mediciones de los desdoblamientos cuadrupolares fueron:  $\pm 2 Hz$  para el HDO;  $\pm 30 Hz$  para el decanol- $\alpha$ - $d_2$  y  $\pm 25 Hz$  para paratión.

#### **IV.1.2.4.- Dinámica Molecular**

La estructura de todas las moléculas de partida fueron construidas usando el programa Hyperchem, la simulación de la bicapa, los cálculos de las trayectorias y su posterior análisis fue realizado con el paquete de programas GROMACS, v3.0. El

---

<sup>15</sup> “Bruker Avance 400 NMR”. Los espectros fueron tomados en la Pontificia Universidad Católica de Chile.

programa VMD se utilizó para visualizar las trayectorias del sistema y los gráficos moleculares. Los parámetros que describen la función potencial del sistema provienen del campo de fuerza del programa GROMOS<sup>16</sup>. Las cargas de las moléculas del sistema se obtuvieron a través del cálculo y optimización de geometría utilizando el programa Gaussian View<sup>17</sup>. La temperatura y la presión del sistema se mantuvieron constantes a 300 K y 1 bar respectivamente. El intervalo de integración para la variable de tiempo en cada paso fue de 2 fs, para la simulación de nuestro sistema. Y todos los cálculos fueron realizados en un cluster de 22 procesadores Pentium III.

La membrana lipídica fue modelada como una bicapa. Se construyó una celda unitaria con dos moléculas del ión tetradeciltrimetilamonio (TTA<sup>+</sup>) y una molécula de decanol (DeOH), siendo esta celda replicada 4 veces en el eje X y 12 veces en el eje Y. La monocapa generada contenía 96 moléculas de TTA<sup>+</sup> y 48 DeOH. Esta monocapa fue copiada y posteriormente se giró en 180° en torno el eje Y, cuidando que ésta quede alineada con el eje Z de la bicapa, luego fue colocada en una caja rectangular con dimensiones de 6,5 x 7,1 x 6,1 nm<sup>3</sup>, con condiciones de borde periódico en todas las direcciones del espacio. El sistema final quedó constituido por 4.192 moléculas de agua, 288 iones de sodio y 480 iones de cloro.

Las condiciones experimentales se reprodujeron y se minimizó la energía del sistema para evitar malos contactos entre las moléculas. Luego se incorporaron las moléculas de paratión en distintas regiones de la bicapa. Finalmente se minimizó nuevamente la energía y se calcularon 10 ns de trayectoria para el sistema en estudio.

---

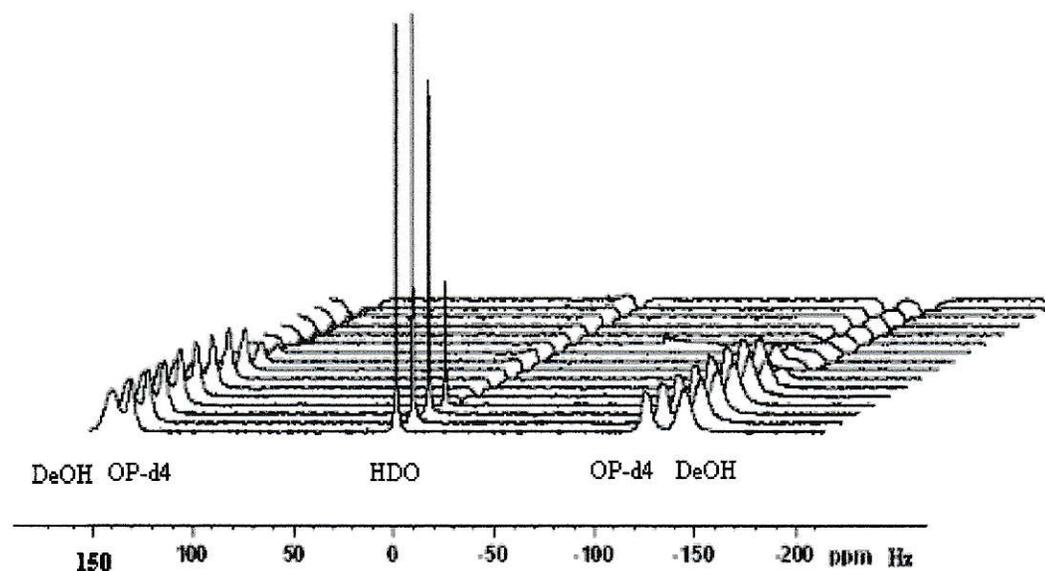
<sup>16</sup> GROMOS, campo de fuerza del programa, con el cual se realizó el cálculo de la trayectoria del sistema.

<sup>17</sup> Gaussian View 4 for Unix/Linux. "Gaussian View, user manual". Se distribuye sólo en formato binario. Una licencia firmada o adición es requerida antes del envío. Disponible en: [www.gaussian.com/gv\\_plat.htm](http://www.gaussian.com/gv_plat.htm).

## V.- RESULTADOS Y DISCUSION

### V.1.- ESPECTROS DE $^2\text{H}$ -RMN

La serie de espectros de  $^2\text{H}$ -RMN de paratión- $d_4$ , resultantes del experimento para la obtención de  $T_1$  a través del método inversion RECOVERY, se muestran en la figura 23.



**Figura 23:** Diagrama de todos los espectros del experimento  $T_1$  inversion RECOVERY de paratión- $d_4$ .

De la serie de espectros obtenida se determinaron los valores de los tiempos de relajación longitudinal de deuterio ( $T_1$ ) y los desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu_q$ ). El valor de  $\Delta\nu_q$  se mide directamente del espectro completamente relajado.

Al observar los espectros podemos identificar cada una de las señales claramente. El  $\Delta\nu_q$  mayor corresponde al decanol deuterado (DeOH- $d_2$ ), el siguiente desdoblamiento corresponde a las posiciones *orto* y *meta* del anillo aromático de la molécula de paratión- $d_4$  y el doblete más intenso corresponde al del agua deuterada (HDO).

#### V.1.1.-Desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu_q$ )

Se midieron los  $\Delta\nu_q$  de HDO, decanol- $\alpha$ - $d_2$  y paratión- $d_4$ , los cuales se obtuvieron directamente del espectro. Para observar los efectos o alteraciones que provoca paratión dentro del símil de membrana biológica, se midieron los  $\Delta\nu_q$  y  $T_1$  de la mesofase pura sin huésped. Los resultados para los distintos componentes del sistema y la mesofase pura se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu_q$ ). Sistema paratión/TTAC y mesofase pura, valores experimentales.

Componente del sistema	Desdoblamiento cuadrupolar ( $\Delta\nu_q$ ) Hz	Desdoblamiento cuadrupolar mesofase pura ( $\Delta\nu_q$ ) Hz
<i>Paratión-<math>d_4</math></i>	14953	—
<i>Decanol-<math>\alpha</math>-<math>d_2</math></i>	16678	12470
<i>HDO (agua deuterada)</i>	10,8	5,3

En la Tabla 1 se puede observar un aumento significativo de  $\Delta\nu_q$  tanto para el agua y como para el decanol luego del ingreso del pesticida al agregado.

El espectro de obtenido de  $^2\text{H}$ -RMN para el sistema paratión/TTAC muestra que los  $\Delta\nu_q$  de las posiciones *meta* y *orto* del anillo aromático del pesticida no son resueltos, por lo que sólo se muestra una señal evidente en el espectro (Figura 23).

Las posiciones *orto* y *meta* observadas como una sola señal de paratión en el espectro, se pueden explicar a través ciertos procesos dinámicos de intercambio, que podría estar sufriendo el anillo aromático de la molécula, haciendo que las posiciones *orto* y *meta* de éste, resulten ser equivalentes.

Los valores de  $\Delta\nu_q$  presentados para el HDO en el símil de membrana biológica con pesticida, aumentaron prácticamente al doble de su valor con respecto a la mesofase pura sin paratión (Tabla 1).

El valor de  $\Delta\nu_q$  del agua (HDO) nos entrega información a cerca de la movilidad en la interfase de las soluciones de cl y miden la interacción de las moléculas de agua con la superficie del agregado. El aumento de este observable nos indica una disminución en la movilidad de las moléculas de agua intersticial, debido al ingreso de paratión a la mesofase.

En el caso del decanol- $\alpha$ - $d_2$ , el  $\Delta\nu_q$  nos sirve como medida del grado de orden o de la rigidez del agregado en la región interior de la interfase. Al ingresar paratión a la mesofase, aumenta este observable, indicando una disminución de la movilidad molecular debido al aumento en la rigidez de la interfase, donde se localizan las especies que dan origen a las señales espectroscópicas. El aumento en la rigidez en la región de la interfase de la membrana podría provocar una disminución en la movilidad de los distintos componentes de la misma y en la flexibilidad conformacional del esqueleto peptídico de ciertas proteínas integrales de membrana, enzimas y/o neurotransmisores, afectando su actividad catalítica y produciendo posibles efectos a

nivel de sistema nervioso central a través de la inhibición de enzimas y/o neurotransmisores.

La rigidez de la región de la interfase se debe a que paratión se podría ubicar preferentemente en esta zona del agregado interactuando con los grupos amonios y el solvente presentes en esta región posiblemente a través de una interacción del tipo catión- $\pi$ .

Los valores de  $\Delta v_q$  presentados para el anillo aromático de paratión son inusualmente altos para moléculas tan pequeñas como este pesticida (Weiss-López y col, 2000; Weiss-López y col, 1997), sin embargo el espacio configuracional que poseen los enlaces C-D presentes en el anillo aromático de paratión- $d_4$  y los enlaces de C-D del decanol- $\alpha$ - $d_2$ , son similares, por lo que valores de  $\Delta v_q$  presentados por paratión posiblemente se deberían a una orientación co-planar del anillo aromático con respecto a la superficie de la bicapa, debido a que los deuterios del pesticida tendrían una orientación similar a la de los deuterios de decanol dentro de la mesofase.

El decanol- $\alpha$ - $d_2$ , se encuentra deuterado en la posición  $\alpha$ , la cual corresponde al carbono que sustenta el grupo -OH. Este grupo -OH se encuentra en contacto con el agua intersticial, posiblemente formando puentes de hidrógenos, mientras que la cadena alifática se encuentra al interior del agregado. El decanol- $\alpha$ - $d_2$  al encontrarse incorporado en el agregado debería ser más rígido que paratión teniendo así una menor movilidad dentro de la membrana lipídica.

Experimentalmente se pudo observar que los desdoblamientos cuadrupolares de paratión son muy similares a los del decanol siendo menores en un 10 %. Por último los desdoblamientos cuadrupolares de la mesofase con huésped en el caso de

la molécula decanol- $\alpha$ - $d_2$  aumentaron en un 15% con respecto a la mesofase pura. Siendo todos estos resultados consecuentes con el modelo propuesto.

### V.1.2.- Parámetros de orden ( $S_{C-D}$ ).

Los parámetros de orden, nos entregan una medida de la dinámica reorientacional de paratión con respecto al campo magnético externo aplicado. A través de los  $\Delta\nu_q$  de paratión calculados y empleando la ecuación 1 mostrada a continuación.

**Ecuación 1:**

$$|\Delta\nu_q| = \frac{-3}{4} \chi_q |S_{CD}^{(i)}|$$

Donde:

$\chi_q$ = Constante de acoplamiento cuadrupolar para el enlace C-D, 185 kHz para el anillo aromático.

$\chi_q$ = Constante de acoplamiento cuadrupolar para el enlace C-D, 167 kHz para las cadenas alifáticas.

$\chi_q$ = Constante de acoplamiento cuadrupolar para el enlace O-D, 308 kHz, para el agua.

Se obtuvo el parámetro de orden de anillo aromático de la molécula huésped disuelta en el medio anisotrópico. Los resultados para los distintos componentes del sistema y el insecticida se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Valores experimentales de los parámetros de orden ( $S_{C-D}$ ).

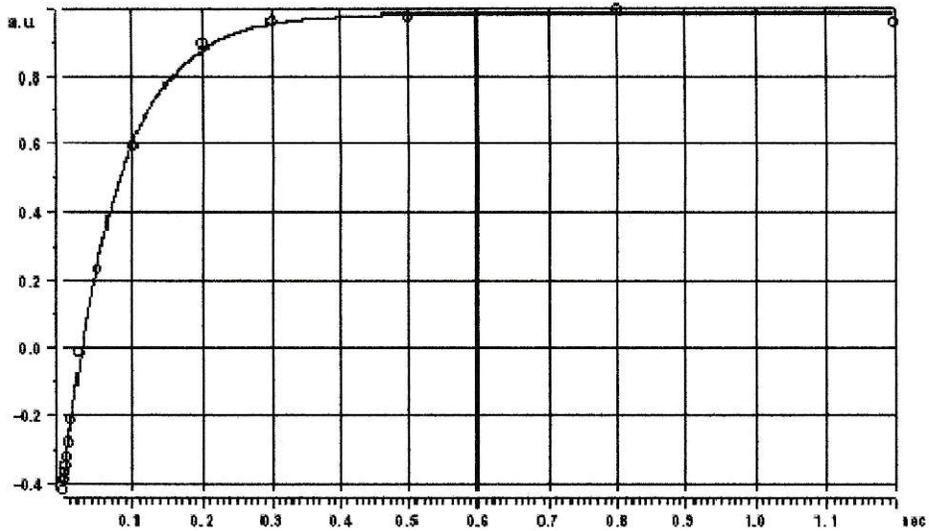
<b>Componente del sistema</b>	<b>Parámetros de orden experimentales (<math>S_{C-D}</math>)</b>
<b><i>Paratión-<math>d_4</math></i></b>	0,108
<b><i>Decanol-<math>\alpha</math>-<math>d_2</math></i></b>	0,133
<b><i>HDO (agua deuterada)</i></b>	—

Los  $\Delta\nu_q$  de las posiciones *meta* y *orto* del anillo aromático del pesticida no son resueltas, por lo que solo se muestra una señal evidente en el espectro. Las posiciones *orto* y *meta* tienen casi el mismo ángulo respecto al eje molecular X, por lo que sólo se puede determinar un parámetro de orden, el cual es un promedio de las posiciones *orto* y *meta* del anillo aromático de paratión.

El parámetro de orden presentado por el enlace C-D de la molécula de paratión es muy semejante al observado para decanol, suponiendo que la orientación del enlace C-D del anillo aromático de paratión es muy similar a la adoptada por el enlace C-D de la posición  $\alpha$  del DeOH.

### **V.1.3.- Tiempo de Relajación Longitudinal ( $T_1$ )**

El cálculo de  $T_1$  se hizo usando la integral de las señales de la derecha de la serie de espectros (Figura 23), obteniéndose un gráfico de la integral de las posiciones *orto* y *meta* del anillo aromático de paratión- $d_4$  en función del tiempo (Figura 24).



**Figura 24:** Curva de ajuste exponencial de las posiciones *orto* y *meta* de paratión- $d_4$  para la obtención de  $T_1$ .

Los  $T_1$  obtenidos del espectro de  $^2\text{H}$ -RMN para la mesofase con y sin huésped se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:**  $T_1$ , medidos para la mesofase con paratión y mesofase pura.

Componentes del sistema	Tiempo de Relajación Longitudinal ( $T_1$ )	Tiempo de Relajación Longitudinal ( $T_1$ ) mesofase pura
<b><i>Paratión</i></b>	13,1 ms	—
<b><i>Decanol-<math>d_2</math></i></b>	94,2 ms	87,7 ms
<b><i>DHO (agua deuterada)</i></b>	439 ms	363 ms

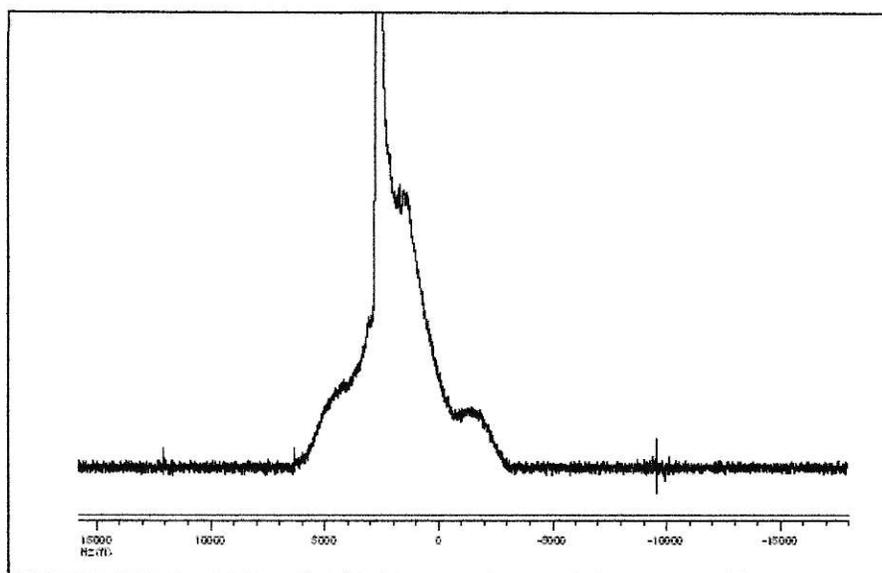
Los valores de  $T_1$  de DeOH aumentaron en 7,41% con respecto a la mesofase pura, pudiéndose atribuir este aumento a la alteración de la integridad de la mesofase por el ingreso de paratión a la misma. El enlace C-D de paratión relaja más rápido que el enlace C-D de DeOH, por lo que paratión tendría una menor movilidad en el agregado que decanol, aún cuando éste se encuentra formando parte de la bicapa. Un aumento en el tiempo de relajación longitudinal con respecto a la mesofase pura indicaría un aumento de la movilidad, debido al aumento de la rigidez de la región de la interfase, por otra parte el  $T_1$  de HDO aumentó en un 20,93%, siendo todo esto corroborado por los valores de  $\Delta\nu_q$  presentados por HDO y DeOH.

#### **V.1.4.- Espectros de $^1\text{H}$ -RMN**

##### **V.1.4.1- Ancho de banda**

Una medida del grado de orden de las cadenas alifáticas al interior del agregado, se puede obtener por el valor del ancho de la banda del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, que corresponde a la interacción o acoplamiento dipolar ( $\Delta\nu_d$ ).

El acoplamiento dipolar ( $\Delta\nu_d$ ) de las cadenas del agregado no se promedia cero, debido al ordenamiento que presenta el agregado en el campo, produciendo el ensanchamiento de la señal del espectro formando una banda, el ancho de esta banda constituye una medida de la movilidad de las cadenas alifáticas al interior del agregado. (Figura 25).



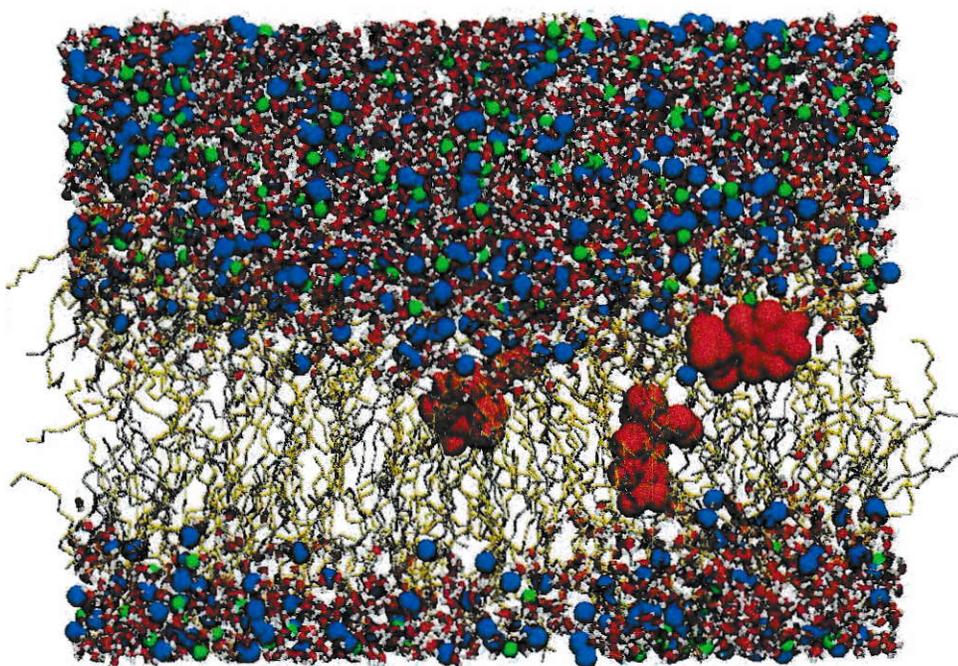
**Figura 25:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del símil de membrana con paratión. El ancho de la banda es una medida del orden interno del agregado.

La adición de paratión al cl produjo una variación del ancho de la banda, con respecto a la mesofase pura, aumentando de 5,5 kHz a 5,9 kHz respectivamente, lo que corresponde a un aumento de un 7%.

Los valores observados sugieren que las moléculas de paratión adicionadas modifican la dinámica del símil de membrana biológica, siendo la tendencia a aumentar la rigidez de la misma.

## V.2.- DINAMICA MOLECULAR

En la simulación computacional del sistema, se pudo observar que solo una de las tres moléculas de paratión ubicadas en las distintas regiones de la bicapa, luego de 7 ns de trayectoria, se encuentra fuera de la interfase y desplazada hacia el centro del agregado, las otras dos moléculas de paratión se encuentran preferentemente en la interfase de la bicapa (Figura 26).



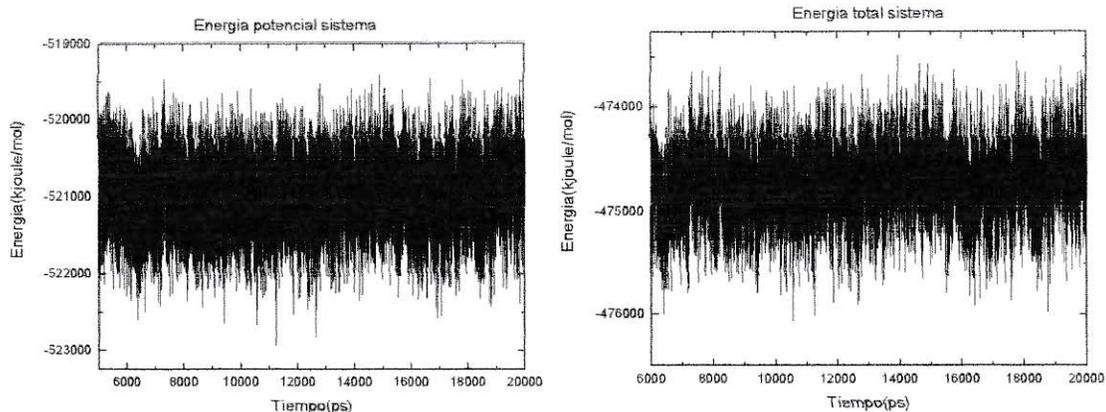
**Figura 26:** DM. Simulación del sistema después de 7 ns de trayectoria. Los átomos de cloro (Cl) se representan en color azul, sodio (Na) verde, decanol (DeOH) plateado y tetradeciltrimetilamonio (TTA) naranja y paratión (o,o-dietil-o-4-nitrofenil-tiofosfato) de color rojo.

Posiblemente las moléculas de paratión estarían interactuando con la interfase de la membrana, al parecer a través de una interacción del tipo catión- $\pi$  entre el anillo aromático del pesticida y los amonios presentes en esta región. El cierto grado de polaridad del pesticida, debido a sus grupos polares y apolares presentes en su estructura, facilitarían el ingreso de éste a la región hidrofóbica donde se encuentra un elevado contenido de lípidos, sin embargo debido a la escasa persistencia presentada por el pesticida, éste no se bioacumula en tejidos grasos, produciendo efectos a nivel de sistema nervioso central solo reversibles, por lo que se podría pensar que paratión puede ingresar y salir de la membrana con facilidad, ya que luego de un tiempo de no encontrarse expuesto el individuo al pesticida los efectos desaparecen por completo

Para obtener una visión a nivel molecular de lo estudiado experimentalmente se calcularon ciertas propiedades del sistema.

#### **V.2.1.-Energía potencial y total del sistema**

Se calculó la energía potencial y total del sistema. Se pudo observar que la energía y su fluctuación se mantuvieron constantes durante toda la simulación, presentando el sistema cierta estabilidad para realizar la DM (Figura 27).

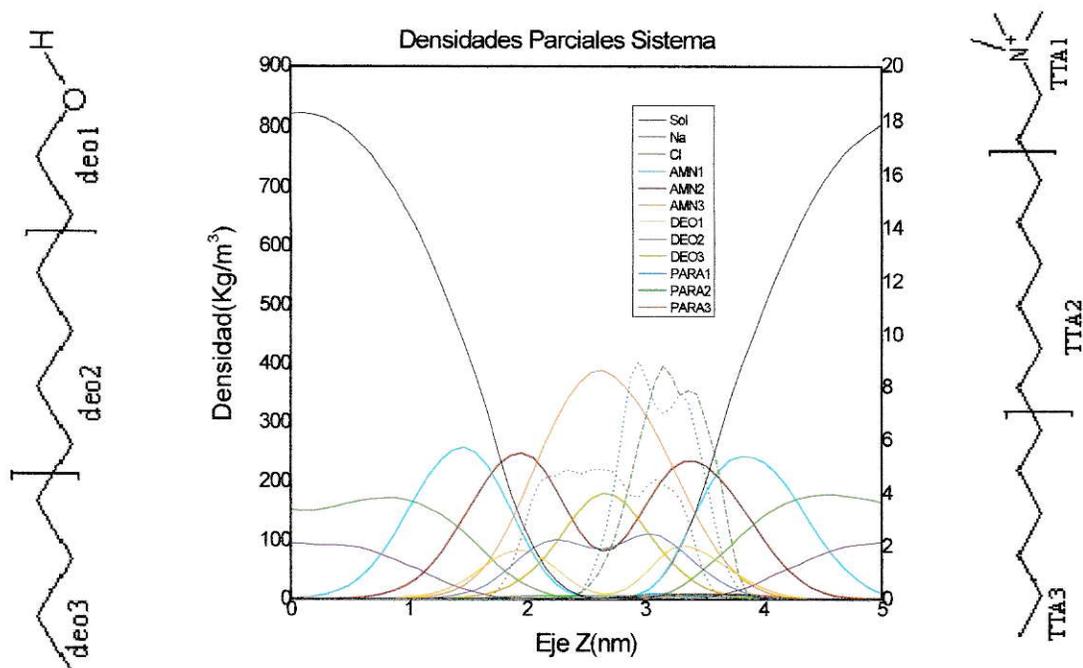


**Figura 27:** Energía total y potencial del sistema, fue constante durante toda la simulación.

#### V.2.2.- Perfil de densidades de masas

Para describir la localización de los distintos componentes de la bicapa se calculó el perfil de densidades de masas.

Para entender de mejor forma el comportamiento de los surfactantes (TTA<sup>+</sup> y DeOH), estos fueron divididos en tres fragmentos. El caso del TTA<sup>+</sup>, la cabeza de amonio más los dos primeros metilenos, corresponden al primer fragmento (AMN1), la parte central de la cadena hidrofóbica al segundo fragmento (AMN2) y los últimos 6 carbonos al tercer fragmento (AMN3). Por otro lado en el DeOH, el primer fragmento corresponde al grupo hidroxilo más los dos primeros metilenos (DEO1), la región central de la cadena hidrofóbica corresponde al segundo (DEO2) y los últimos 4 carbonos al tercer fragmento (DEO3). Por otra parte las moléculas de paratión fueron nombradas como PARA1, PARA2 y PARA3 respectivamente (Figura 28).



**Figura 28:** Perfil de densidades de masas a lo largo del eje Z de la caja para todos los componentes del sistema y división de las moléculas de TTA<sup>+</sup> y DeOH en sus tres fragmentos.

La Figura 28, muestra el perfil de densidades de masas a lo largo del eje Z de todos los componentes de la mesofase en estudio. La escala de la derecha corresponde a la densidad de las tres moléculas de paratión y la escala del lado izquierdo corresponde al resto de los componentes del sistema. Las curvas en el perfil de densidades parciales, representan la posición del centro de masa de cada grupo, ión o molécula. Se puede apreciar claramente que el TTA<sup>+</sup> y DeOH son las moléculas constituyentes de la bicapa. La parte polar de estas dos moléculas (AMN1 y DEO1) se encuentran orientadas hacia el solvente y las cadenas alquílicas hacia el interior (AMN3 y DEO3). El agua se encuentra ubicada en los extremos de la caja y en el

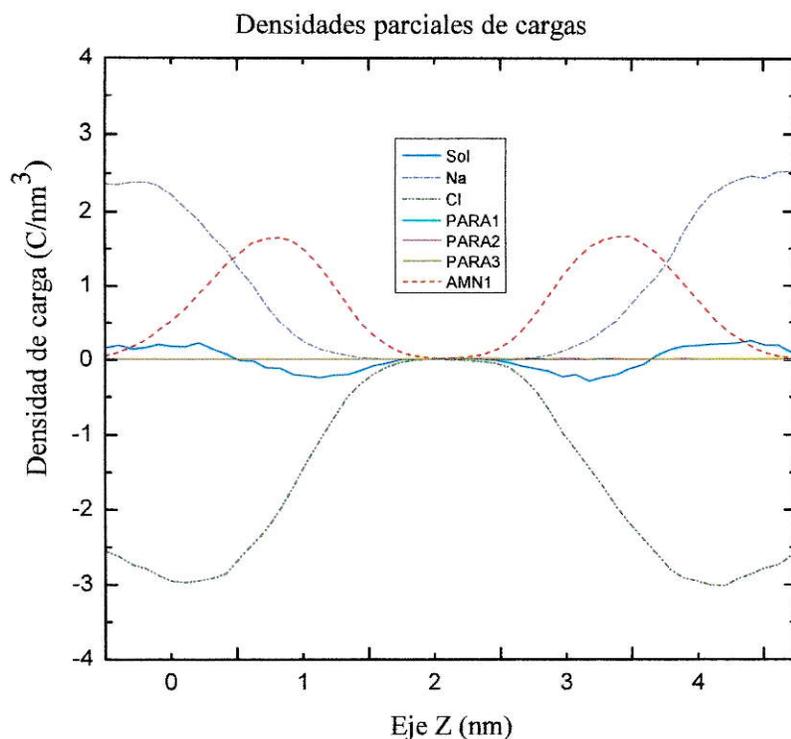
centro de la bicapa no hay agua, apreciándose que la densidad del agua tiene valores máximos en los extremos y luego disminuyen hasta cero en el centro de la bicapa.

En el caso de las moléculas de paratión (PARA1, PARA 2 y PARA 3), se puede observar en el perfil que dos moléculas se mantienen en la interfase (PARA1 y PARA2) y la otra se encuentra desplazada hacia el centro de la bicapa, indicando que el insecticida se reparte entre ambas fases, siendo esto congruente con el modelo planteado y los resultados experimentales.

### **V.2.3.- Perfil de densidades de cargas**

El estudio del comportamiento de las especies cargadas a lo largo del eje Z de la caja se realizó a través del cálculo de densidades de cargas parciales del sistema.

Al analizar el comportamiento de las especies cargadas del sistema a lo largo del eje Z, se observa que los iones presentan una gradiente de carga entorno a la interfase, presentando una mayor concentración de carga en la región acuosa y luego esta disminuye progresivamente hasta hacerse cero al interior de la bicapa. Se puede observar que el agua se encuentra polarizada en la interfase. El paratión al no poseer carga no aparece en el perfil. En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos.



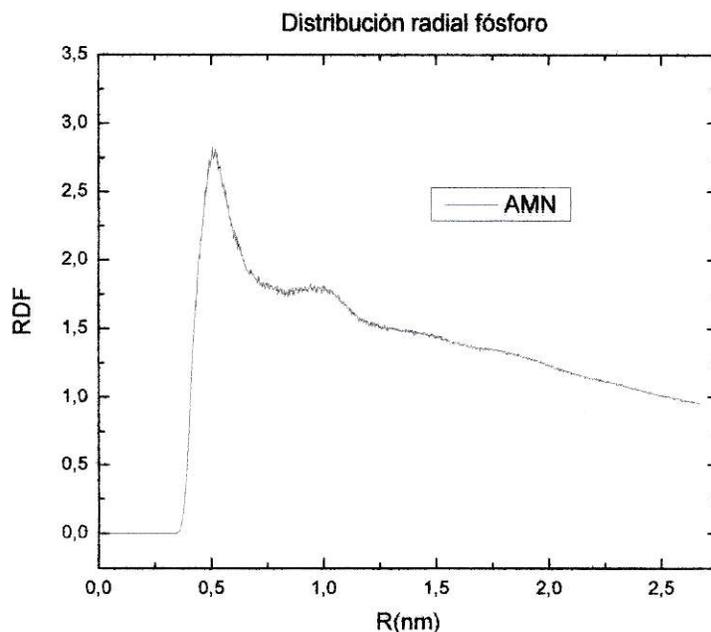
**Figura 29:** Densidades parciales de carga de los componentes del sistema.

#### V.2.4.- Función de distribución radial (RDF)

Se calcularon las funciones de distribución radial (RDF's) del sistema, las cuales entregan una imagen clara acerca del ordenamiento particular alrededor de cierta especie atómica o molecular, debido a que ésta representa el número de moléculas situadas dentro del volumen de una corona esférica de cierto espesor y situada a una cierta distancia de una molécula de referencia o central.

En este método se construyen cascarones esféricos concéntricos alrededor de la partícula de interés, en este caso el paratión, y se mide la densidad local del sistema dentro de la cáscara.

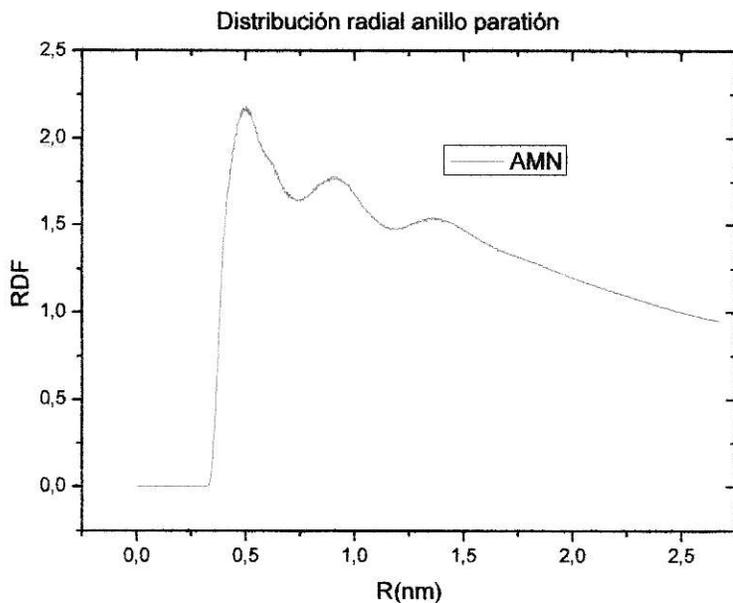
Se calcularon funciones de distribución radial, para ciertos átomos presentes en la estructura de paratión. Se calculó la RDF del átomo de fósforo del pesticida con respecto a la porción amonio de TTA<sup>+</sup> (Figura 30).



**Figura 30:** Función de distribución radial (RDF) de fósforo con respecto a los amonios.

En la Figura 30 se puede observar claramente la existencia de dos máximos, los cuales en este caso miden la probabilidad de encontrar un número de moléculas de amonio dadas, que se encuentren alrededor del átomo de fósforo de paratión. El primer máximo se encuentra a 0,513 nm de distancia del átomo de fósforo con un número de aproximadamente 2,8 moléculas de amonio rodeando al átomo de pesticida. La segunda esfera se encuentra a una distancia de 0,99 nm del azufre con un total de aproximadamente 1,78 moléculas de amonio alrededor del átomo de azufre.

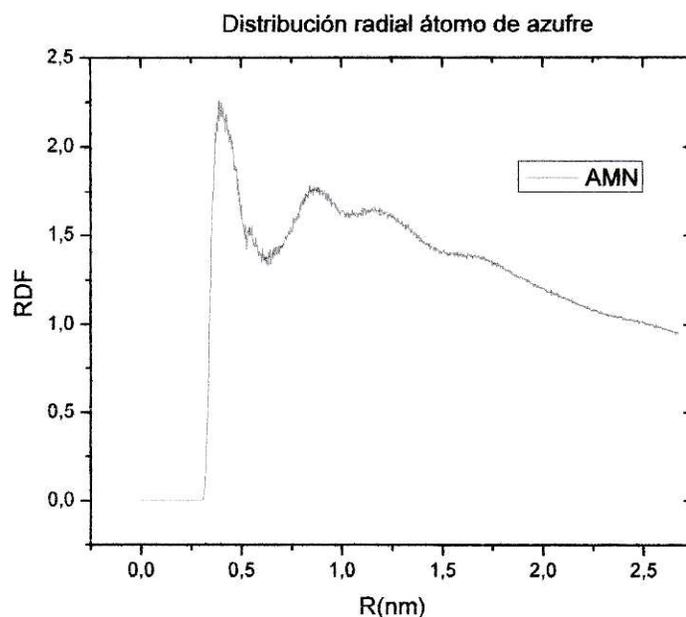
Similarmente se calculó la RDF del anillo aromático de paratión con respecto a los amonios presentes en la mesofase. Los resultados se muestran en la figura 31.



**Figura 31:** Función de distribución radial del anillo aromático de paratión con respecto a los amonios de la mesofase

En la Figura 31 se puede observar claramente la existencia de 3 máximos, o tres esferas de moléculas de amonio rodeando al anillo de paratión. Las esferas se ubican a una distancia de 0,61 nm con 2,2 moléculas de amonio, 0,98 nm con 1,8 moléculas y 1,49 nm con 1,5 moléculas, respectivamente.

Por último se calculó de igual forma la RDF del átomo de azufre presente en la estructura de paratión con respecto a los amonios de la mesofase. Los resultados se muestran en la Figura 32.



**Figura 32:** Función de distribución radial de azufre presente en la estructura de paratión con respecto a los amonios de la mesofase.

La Figura 32 muestra la existencia de tres esferas de moléculas de amonio rodeando al átomo de azufre. Las esferas se ubican a una distancia de 0,58 nm con 2,3 moléculas de amonio, 0,97 nm con 1,7 moléculas y 1,39 nm con 1,6 moléculas respectivamente del átomo de azufre.

#### V.2.5.- Función de autocorrelación rotacional

A partir de la trayectoria se calculó la función de autocorrelación rotacional para cada uno los enlaces C-D de las posiciones *orto* y *meta* del anillo aromático de paratión, la cual fue ajustada a un decaimiento monoexponencial, de donde se obtuvo

el valor de  $\tau_c$ , con este valor se calculó el tiempo de relajación longitudinal ( $T_1$ ) teórico a partir de la siguiente ecuación:

**Ec.2**

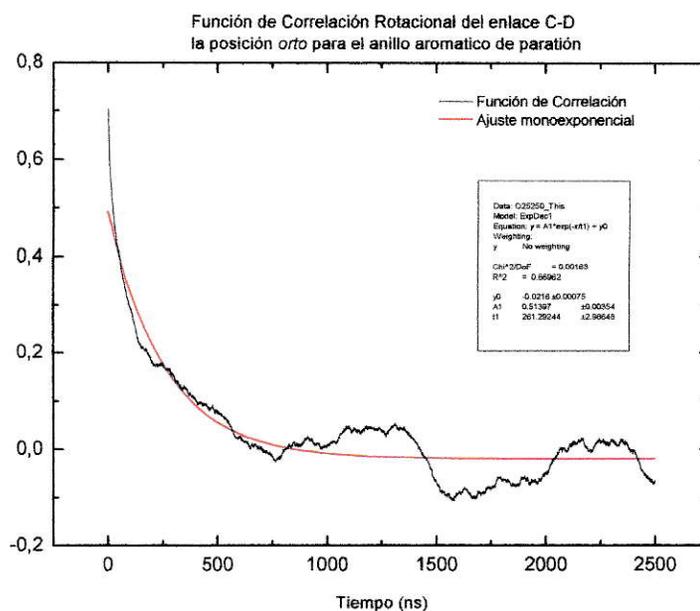
$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{3}{80}\right) \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) (2\pi eQ/h)^2 (\partial^2 V/\partial z^2)^2 \left\{ \frac{2\tau_c}{(1 + \omega^2 \tau_c^2)} + \frac{8\tau_c}{(1 + \omega^2 \tau_c^2)} \right\}$$

Donde  $\eta$  es el parámetro de asimetría de la gradiente del campo eléctrico en torno al núcleo, igual a 0,05 en el caso del enlace C-D de un anillo aromático e igual a cero en el caso del enlace C-D de cadenas alifáticas y el enlace O-D del agua. El término  $[(2\pi eQ/h) (\partial V/\partial z^2)]$  es la constante cuadrupolar en unidades de frecuencia angular y los términos:

$$\frac{2\tau_c}{(1 + \omega^2 \tau_c^2)} \quad \text{y} \quad \frac{8\tau_c}{(1 + \omega^2 \tau_c^2)}$$

Corresponden a las densidades espectrales a la frecuencia de Larmor y al doble de ésta respectivamente.

La Figura 33 se puede observar la función de autocorrelación rotacional y su correspondiente ajuste para el enlace C-D de la posición *orto* de una de las tres moléculas simuladas a través de DM.



**Figura 33:** Función de correlación rotacional del enlace C-D de la posición *orto* para el anillo aromático de una de las moléculas de paratión. La línea negra es la función de autocorrelación rotacional la línea roja corresponde al ajuste con un decaimiento monoexponencial.

En el caso de la molécula decanol la función de autocorrelación no se pudo ajustar a un decaimiento monoexponencial.

Experimentalmente sólo se obtuvo un valor de  $T_1$  para las posiciones *orto* y *meta* del anillo aromático, por lo que los valores obtenidos de  $\tau_c$  calculados para estas posiciones se promediaron. A través de DM también se obtuvieron los parámetros de orden del anillo aromático de paratión. En la tabla 4 se muestran los valores de  $\tau_c$ , los parámetros de orden y los valores de  $T_1$  obtenidos para las distintas moléculas de paratión.

**Tabla 4:** Valores de  $\tau_c$ ,  $T_1$  y  $S_p$  teóricos calculados a través de DM.

Molécula de paratión	Tiempo de correlación $\tau_c^{o,m}$ (ps)	Tiempo de relajación $T_{1o,m}$ (ms)	Parámetro de orden ( $S_p$ )
1	$242,82 \pm 2,73$	8,48	$0,24 \pm 0,43$
2	$233,49 \pm 2,35$	8,75	$0,23 \pm 0,41$
3	$418,46 \pm 2,16$	5,41	----

Según lo observado sólo 2 moléculas paratión se encuentran dentro de la interfase y esto se refleja en los tiempos de correlación calculados. Esto se puede observar en los valores presentados en la Tabla 4, pudiéndose ver como una de las moléculas de paratión presenta grandes valores de  $\tau_c$  y pequeños de  $T_1$ , por lo que se puede decir que esta molécula posee una menor movilidad. Así mismo, las moléculas que se encuentran dentro de la interfase presentan valores esperados según lo observado experimentalmente.

## VI.- CONCLUSIONES

El estudio de paratión abre la posibilidad de poder comprender y entender las propiedades tóxicas que presentan sobre los organismos vivos este tipo de pesticidas.

Si bien es cierto que los beneficios que nos entregan los pesticidas son innegables tanto para la productividad como para la agricultura, éstos producen serios daños a personas y organismos que se encuentran expuestos a ellos. Entender el comportamiento de este pesticida a nivel molecular nos permite comprender su dinámica cuando ingresa a organismos vivos.

Paratión al ser un inhibidor de ciertas enzimas responsables del impulso nervioso central, produce efectos sobre neurotransmisores y/o enzimas que se encuentran en las membranas celulares. Esta inhibición se debería principalmente al ingreso del pesticida a la membrana lipídica produciendo un aumento en la rigidez de ésta y disminuyendo el grado de libertad de los componentes presentes en ella.

Paratión al presentar en su estructura grupos polares y apolares se ubicaría en la región de la interfase del agregado, interactuando con las especies presentes en esta zona, posiblemente a través de una interacción del tipo catión- $\pi$  entre el anillo aromático del pesticida y los iones amonio, produciendo de esta forma un aumento en la rigidez de la membrana.

Las tendencias en los observables experimentales y teóricos sugieren que la molécula de paratión adicionada modifica la integridad y/o la dinámica del símil de membrana biológica, siendo la tendencia a la rigidez de la misma. Esto se puede atribuir a la incorporación de paratión que puede inducir a modificaciones en la dinámica interna de la interfase.

El estudio de la localización, orientación promedio y dinámica de paratión permite elucidar el mecanismo de incorporación de este tipo de pesticida órganofosforado a organismos vivos.

La simulación molecular computacional permitió estudiar propiedades experimentales que aún hoy en día resulta difícil su exacta medición.

Finalmente, este estudio permite obtener información de la dinámica de moléculas en sistemas no rígidos, muy frecuentes en seres vivos, permitiendo de alguna forma comprender los mecanismos de acción de este tipo de compuestos tóxicos, que no sólo son perjudiciales para los seres vivos sino que también para el medio ambiente en general.

## VII.- REFERENCIAS

Abragam, A. 1985 Principles of Nuclear Magnetism. Oxford University Press. International Series Of Monographs on physics. England.

Ahumada, H., Montecinos, R., Tieleman, D. P., y Weiss-López, B. E. 2005. Orientation and Dynamics of benzyl Alcohol and Benzyl Alkyl Ethers Dissolved in Nematic lyotropic Liquid Crystals.  $^2\text{H}$ -RMN And Molecular Dynamics Simulations. J. Phys. Chem. 109, 6644-6651.

Antunes-Madeira, M. C., Videira, R. A., Lopes, V. y Madeira, V. M. C. 1996. Toxicity of organophosphorus insecticides: Alteration de membrane fluidity. Med. Sci. Res. 24, 753.

Araya Maturana, R. J., Ahumada Gutiérrez, H. R., Martínez, R. y Montecinos Escobar, R. A. 2004. About the difference in the quadrupole splitting of water between cationic and anionic nematic lyotropic liquid crystals.  $^2\text{H}$ -NMR and Molecular Dynamics study. Journal of the Chilean Chemical Society, vol.49 (3):209-213.

Bethe, H. A y Jackiw, R. 1997. Intermediate Quantum Mechanics. Advanced Book Classics. Addison-Wesley.

Blasiak, J.1995a. Changes in membrana fluidity evoked by organophosphorous insecticida brofenvinfos and its methylated analogue. Comp. Biochem. Physiol. C 110.

Blasiak, J. 1995b. Inhibition of erythrocyte membrane (Ca<sup>+2</sup> + Mg<sup>+2</sup>)-ATPase by the organophosphorus insecticides parathion and methylparathion. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C; 119-125.

Carrington, A. y McLachlan, A. D. 1967. *Introduction to Magnetic Resonance with Applications to Chemistry and Chemical Physics*. New York: Harper & Row.

Cowan, B. P. 1997. *Nuclear Magnetic Resonance and Relaxation*. United Kingdom: Cambridge University Press, Cambridge.

Diehl, P., Khetrapal, C. L. 1969. NMR Studies of molecules Oriented in the Nematics Phase of Liquid Crystals. En: Diehl, P., Fluck, E., Kosfeld, R., coord. *NMR Basic Principles and Progress*. Eds. Vol. 1, p 16.

Edmunds, T. 2007. *Estimación de la Contaminación Ambiental por Plaguicidas en Suelos Agrícolas de la isla de Pascua, V Región, Chile*. Facultad de Ciencias Universidad de Chile.

Fletcher, J. H., Halmiton, J. C., Hechenbleik-Ner, I., Hoegber, E. I., Sertl, B. J. Y Cassaday, J. T. 1948. Preparation of O,O-Diethyl-O-p-Nitrophenyl Thiophosphate (Parathion). *Stanford Research Laboratories American Cyanamid Company Stanford, Connecticut*.

Gallo, M. A. y Lawryk, N. J. 1991. Organic phosphorus pesticides. En: W.J Haves y E.R Laws (eds), Handbook of Pesticide Toxicology, Classes of Pesticides, vol 2. San Diego, CA: Academic Press Inc.

Harris, R. K. 1986. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. University of Durham, England. P. 81.

Harris, R. K. 1987. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. A. Physicochemical View. Longman Scientific and Technical, Harlow. England. Pp 260.

Hore, P.J. 1995. Nuclear Magnetic Resonance. Oxford Chemistry Primers, OUP.

ICAITI, 1977. En: Estudio de las Consecuencias Ambientales y Económicas del uso de Plaguicidas en la Producción de algodón de Centroamérica. Informe Final. Proyecto N°1412. PNUMA Proyectos N.° 0205-73-002 y 0108-75-007. Guatemala. Pp. 94-147.

Jamal, J.A. 1997. Neurological Syndromes of Organophosphorus Compounds. Adverse Drug React Toxicol Rev; 16(3):133-70.

Khetrapal, C.L., Kunwar, A.C., Tracey, A.S. y Diehl, P. 1975. Nuclear Magnetic Resonance: Basic Principles and Progress. En: P. Diehl, E. Fluck y R. Kosfeld (eds), Lyotropic Liquid Crystals. Springer-Verlag., Germany. Pp 1-85.

Leach, A.R. 2001. Molecular modelling: Principles and applications. 2<sup>a</sup> Ed., Prentice Hall.

Lesot, P., Merlet, D. y Courtieu, J. 1996. Discrimination and analysis of the NMR spectra of enantiomers dissolved in chiral liquid crystal solvents through 2D correlation experiments. *Liquid-Crystals*. 21(3);427-435.

Lundback, J.A., Birn, P., Girrschman, J., Hansen, A.J. y Anderson, O.S. 1996. Membrane stiffness and channel function. *Biochemistry*. Rev.35:3825.

McQuarrie D.A. 1976. *Statistical Mechanics*. Harper, Row Publishers, Inc., USA.

MINSAL, 1998. Situación Epidemiológica de las Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, Chile publicado en el año 2000.

Miño Galaz, G. A.1999. Localización y Orientación Promedio de Alquil Bencil Eteres Disueltos en Cristales Líquidos Liotrópicos. Memoria para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

OMS, 1992. Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura. Ginebra: Organización Mundial de la Salud

OPS, 2001. Sistema de Vigilancia Epidemiológica para Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas. Organización Panamericana de la Salud, Boletín Epidemiológico, Vol. 22 N° 4.

Pursey, H. A note on the Carr-Purcell, 1961. Method of measuring nuclear magnetic resonance Relaxation Times. Proc. Phys. Soc.; 78: 808-811.

Pastor, R. W., Venable, R. M. 1993. Molecular and stochastic dynamics simulations of lipid membranes. En: W. F. Van Gunsteren, P. K. Weiner , A. K. Wilkinson (Eds.), computer Simulation of Biomolecular Systems: Theoretical and Experimental applications. Chap. 2, Escom Science Publishers, leiden, pp. 443-464.

Parasassi, T. and Gratton E., 1995. Membrane lipid domain and dynamics as detected by laurdan fluorescence. J. Fluoresc. 5, 59.

Suwalsky, M., Ramos, P., Villena, F. Cárdenas, H., Norris, B., Cuevas, F. y Sotomayor, C. 2001. The organophosphorus Insecticida Parathion Changes Properties of Natural and Model Membranas. Pesticide Biochemistry and Physiology. 70; 74-85.

Taylor, P. 1985. Anticholinesterase agents. En: A. G. Gilman y L. S. Goodman (eds), The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: Macmillan Publishing Co. Inc.; pp.110-28.

Van der Spoel, D., Van Buuren, A. R., Apol, E., Meulenhoff, P. J., Tieleman, D.P., Sijbers, A. L. T. M., Hess, B., Feenstra, K. A., Lindahl, E., van Drunen, R., y Berendsen, H. J. C., 2001 Gromacs User manual v.3.0, Department of Biophysical Chemistry, University of Groningen. Groningen. The Netherlands.

Verlet, L. 1968. Computer Experiments on Classical Fluids. II. Equilibrium Correlation Functions. Phys. Rev., 165, 201.

Weiss-López, B., Miño, G., Araya-Maturana, R. y Tracey, A. S. 2000. Average Orientation and Location of Benzyl Alcohol-d<sub>5</sub> and Alkyl Benzyl-d<sub>5</sub> Ethers in Anionic Nematic Lyotropic Liquid Crystals. Langmuir. 16(8);4040-4044

Weiss-López, B., Azocar M., Montecinos R., Cassels B., y Araya-Maturana R. 2001. Differential Incorporation of L- and D-N-Acyl-1-phenyl-d<sub>5</sub>-2 aminopropane in a Cesium N-Dodecanoyl-L-alaninate Cholesteric Nematic Lyomesophase. Langmuir, 17, 6910.

Xiang, T. X. , Anderson, B. D. 1995. Mean molecular potentials in a model lipid bilayer: A molecular dynamics simulation. J. Chem. Phys. 103 () 8666-8678.

Zolfigol, Mohammad Ali. 2001. Silica Sulfuric acid/NaNO<sub>2</sub> as a novel heterogeneous system for production pf thionitrites and disulfides under mil conditions. Tetrahedron, 57; 9509-9511.

# **ANEXOS**

**ANEXO A**

**ANTECEDENTES PESTICIDAS**

## ANTECEDENTES PESTICIDAS

### A.1.- VISION GENERAL

Los pesticidas o plaguicidas son sustancias que son utilizadas en la agricultura, la agroindustria y en la salud, entre otras ramas, con el fin de eliminar, controlar y manejar las plagas.

Históricamente, personas y plagas han tenido una asociación larga, y el uso de químicos para eliminarlas no son nuevos. Los antiguos romanos, por ejemplo, esterilizaban el suelo usando cenizas y salmueras de sal. Hace 300 años, los extractos de agua de las plantas de tabaco (la nicotina) se usaban efectivamente para matar insectos y los extractos de las flores de crisantemo han sido usados en Asia como pesticida por lo menos desde 1800. Componentes Inorgánicos que contienen compuestos como; sulfuro, cobre, mercurio y arsénico se usaron extensivamente como insecticidas, herbicidas o fungicidas en la primera mitad de este siglo.

Después de la segunda guerra mundial debido a los cambios introducidos en el sector agrícola en los modelos de producción y cultivo hubo un creciente aumento en la industria química orgánica sintética, masificándose el uso de pesticidas. Un conjunto aparentemente nuevo de pesticidas baratos convenientes para la aplicación sobre áreas extensas, llegó a ser ampliamente disponible. Los pesticidas orgánicos sintéticos han reemplazado principalmente los inorgánicos y botánicos. Estos químicos llamados milagrosos prometían eliminar el hambre, la enfermedad y mejorar de calidad de vida de la población en el mundo.

Aunque resultan innegables los beneficios que han traído los pesticidas tanto a nivel de producción agrícola como para la prevención y combate de enfermedades

(animales y humanas) tales como la malaria, fiebre amarilla, dengue y numerosos parásitos, su uso y aplicación continua e indiscriminada y la ausencia de normas efectivas de prevención, han sido determinantes en los problemas ambientales y toxicológicos asociados a estos compuestos.

Los pesticidas se han usado por décadas en el sector agrícola, sin embargo poco se conoce sobre su incorporación en la cadena alimenticia y el contenido de sus residuos en suelos, aguas y alimentos. Estudios realizados acerca de la persistencia de ciertos pesticidas en suelos, han demostrado que incluso algunos de ellos pueden permanecer largo tiempo en el medio ambiente ocasionando problemas en la salud de la población, produciendo efectos agudos y crónicos tales como trastornos neuroconductuales, alteraciones a nivel de la esfera reproductiva como la esterilidad, malformaciones congénitas, mutagénesis, daños en los sistemas inmunológico, respiratorio y dermatológico.

El primer pesticida utilizado a nivel doméstico e industrial en la década de los años 40, del siglo pasado, fue el DDT, el cual fue presentado al mundo como la solución a todas las plagas sin efectos nocivos para el ser humano y medio ambiente en general, e hizo merecedor del premio Nóbel de medicina o fisiología a su descubridor Müller, en el año 1939. El costo reducido, fácil obtención, aplicación y gran eficacia de este compuesto, extendieron rápidamente su uso, sin antes poder evaluar los posibles efectos negativos que éste produciría sobre los seres vivos y el medio ambiente, efectos que hasta el día de hoy persisten.

Luego del descubrimiento del DDT aparecieron otros pesticidas organoclorados, compuestos orgánicos sintéticos químicamente muy parecidos al DDT, que poseen átomos de cloro en su estructura. Los pesticidas organoclorados poseen una gran persistencia en el medio ambiente, por lo cual fueron prontamente

reemplazados por los pesticidas del tipo organofosforados (OPs), sintetizados en la década de los años 50.

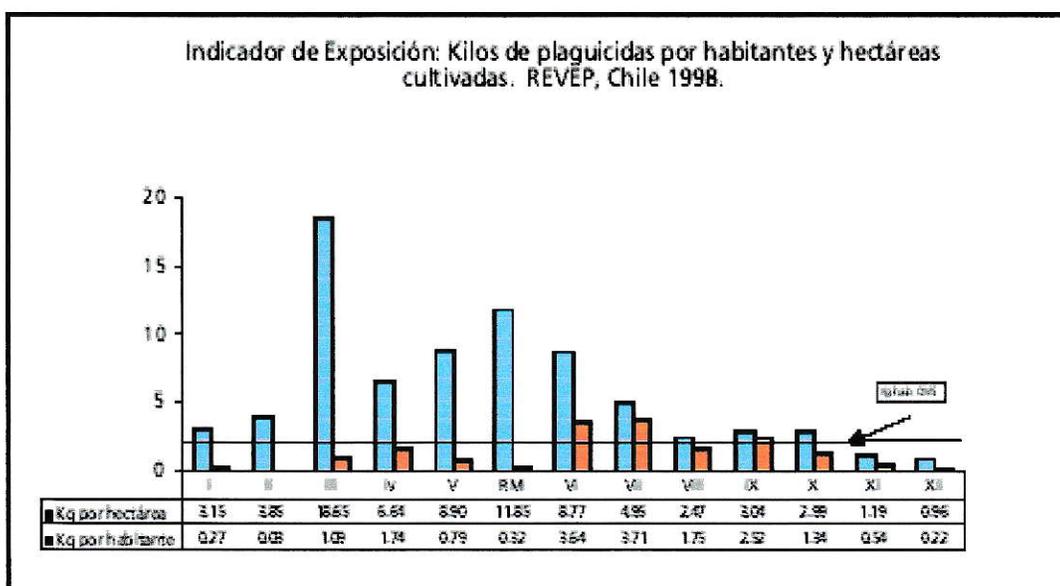
Los OPs son pesticidas de baja persistencia y una alta reactividad, utilizados a gran escala y en forma masiva a nivel industrial, sin embargo la toxicidad aguda de estos compuestos es mayor que la de otra clase de pesticidas. Posteriormente a estos pesticidas le siguieron los carbamatos, siendo también hoy en día uno de los grupos de pesticidas más utilizados a nivel industrial. A nivel doméstico y para el control específico de insectos, se ha extendido el uso de los piretroides, derivados sintéticos de un insecticida natural extraído del crisantemo.

Investigaciones recientes con respecto a la seguridad en el uso de muchos pesticidas han hecho sugerir la necesidad de reevaluar nuestras prácticas actuales con el intento de que se desarrollen políticas más racionales a cerca del uso de estos compuestos. En los últimos 40 años, el uso y aplicación de químicos para controlar insectos indeseables, malezas y roedores, ha llegado a ser cada vez más irracional y enormes cantidades de pesticidas se usan en la producción de alimentos, maderas, manejo de tierras públicas, en el hogar y en jardines.

Desde 1960, la cantidad total producida de pesticidas se ha doblado, como también se doblado el consumo de pesticidas a nivel mundial. En Chile durante el año 1998 se encontraban vigentes en el país 900 productos de uso agrícola. En la última década en el uso de pesticidas aumento en un 48% y las importaciones de éstos alcanzaron a 17,942 toneladas, implicando una exposición mayor para la población en zonas rurales. Si analizamos algunos indicadores de exposición como los kilos de plaguicidas por hectáreas cultivadas (Figura A.1), nos encontramos que en Chile se utilizaron en 1998 un promedio nacional de 4,7 kilogramos de plaguicidas/Ha, con una

carga promedio de 1,2 kilos de plaguicidas por habitante para dicho año<sup>18</sup>. Esto implica el doble de la media mundial estimada por OMS que es de 0,6 kilos persona año.

Aunque la cantidad de pesticidas producidos y usados son relativamente un pequeño porcentaje de todos los químicos orgánicos sintéticos, los pesticidas son de particular interés ya anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a pesticidas.



**Figura A.1:** Indicador de Exposición (1998). La población utilizada fue la total del país

<sup>18</sup> Fuente: INE 1998

**ANEXO B**  
**PESTICIDAS**

## **PESTICIDAS**

Un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia química orgánica o inorgánica, ya sea natural o una mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas o especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos y productos agrícolas. Los plaguicidas son productos químicos de amplio uso en Chile y están incorporados en actividades de salud pública, en la agroindustria, entre otros, siendo el sector agrícola donde estas sustancias presentan una mayor utilización.

### **B.1.- CLASIFICACION Y MODOS DE USOS**

Los pesticidas son funcionalmente y químicamente muy diversos. Existen pesticidas de amplio espectro, que son tóxicos a una amplia variedad de especies y tipos de organismos. Un herbicida de amplio espectro podría usarse, por ejemplo, para matar todos los arbustos, maleza, y pastos en un sitio de construcción. En contraste, otros pesticidas son altamente específicos o selectivos, efectivos contra un grupo definido de organismos tales como polillas y mariposas. De esta forma dependiendo del tipo de plaga o uso que se le va dar al pesticida se pueden clasificar en:

#### **B.1.1.- Insecticidas y acaricidas**

Los insecticidas se clasifican principalmente en 4 grupos; organoclorados, organofosforados, carbamatos y botánicos.

Los insecticidas organoclorados son neurotóxicos y muy estables químicamente, es decir no se degradan fácilmente en el ambiente y permanecen sin cambios en el suelo y agua, pudiendo ser absorbido o ingeridos por organismos, acumulándose en los tejidos mediante el proceso de bioconcentración.

Una segunda clase de insecticidas son los organofosforados (OPs), pesticidas más agudamente tóxicos en animales vertebrados, tales como pájaros, pescados, lagartos y mamíferos. A este grupo de insecticidas se han asociado más envenenamientos de seres humanos que cualquier otra clase de pesticidas.

Los OPs (productos disponibles a los consumidores) son químicamente inestables, desaparecen rápidamente en el ambiente y no tienen tendencia de acumularse en los tejidos. En general los OPs intervienen en la función normal del sistema nervioso de una manera compleja, finalmente afectando los sistemas circulatorios y respiratorios. Otros OPs inducen otros efectos neurotóxicos, parecidos a los efectos del alcoholismo y la diabetes.

Los carbamatos, una tercera clase de insecticidas, están entre los pesticidas más usados en el mundo, existiendo en el comercio desde 1950. A pesar de su largo uso en el tiempo no se tiene información de los efectos en animales, pero en presencia de nitratos tiene efectos cancerígenos, también los carbamatos son asociados con el deterioro del riñón e hígado.

Otro grupo importante de insecticidas son los botánicos y se componen de un conjunto diverso de compuestos producido en forma natural por las plantas. Estos insecticidas desarrollados naturalmente son altamente efectivos y algunos (como la nicotina) han sido usados para este fin, desde hace muchos años.

### **B.1.2.- Herbicidas**

Los herbicidas son utilizados para controlar especies indeseables de plantas, que compiten por luz, agua, nutrientes y espacio con plantas de cultivo para alimentos, destruyen en la misma proporción la cosecha como lo hacen los insectos. Una cantidad considerable de los herbicidas consumidos anualmente se utiliza para prados públicos, campos de golf, jardines de patio y canales de riego, entre otros.

### **B.1.3.- Fungicidas**

Conjuntamente con las bacterias, los hongos descomponen material orgánico, paños, pinturas, cartulinas, pan, o simplemente viven en las plantas. La mayoría de los fungicidas usados, sólo funciona en la superficie tratada necesitando aplicaciones repetidas. Recientemente un nuevo y efectivo sistema de fungicida ha sido desarrollado, eliminando la necesidad que se rocíe frecuentemente y reduciendo la contaminación ambiental. Varios fungicidas tales como pentaclorofenol, hexaclorobenceno, son clasificados como derivados del benceno. El Pentaclorofenol no solamente se utiliza como fungicida, sino también como preservante de la madera, contra termitas y además es usado como herbicida.

## **B.2.- CONCEPTOS**

- ❖ **Plaga agrícola:** Se define como cualquier organismo vivo o de naturaleza especial que por su nivel de ocurrencia y dispersión constituye un grave riesgo para el estado fitosanitario de las plantas o productos.

- ❖ **Autorización:** Es el permiso para fabricar, importar, distribuir, vender o aplicar plaguicidas, el cuál debe ser otorgado en Chile por el Servicio Agrícola y Ganadero (S. A. G.).
  
- ❖ **Formular:** Es el proceso que combina los diversos componentes de un plaguicida, lo que permite su venta, distribución y utilización, el producto final es el plaguicida agrícola, este es una mezcla de uno o más ingredientes activos, más algunos aditivos.
  
- ❖ **Aditivos:** Son ingredientes inertes o adyuvantes, son sustancias que se agregan al ingrediente activo (i.a.) para mejorar las propiedades físicas y químicas de las formulaciones. Entre ellos se encuentran: agentes tensoactivos, estabilizadores, anticoagulantes, colorantes, surfactantes, esmétricos, agentes malolientes, odorizantes, entre otros.
  
- ❖ **Tóxico:** Es cualquier sustancia química que en contacto o absorbida por un organismo vivo puede producir efectos adversos.
  
- ❖ **Toxicidad:** Es la capacidad de una sustancia de producir daño,  $DL_{50}$ , con la cual muere el 50% de los animales de experimentación.

### **B.3.- FACTORES QUE MODIFICAN LA TOXICIDAD**

- ✓ **Del tóxico:** Composición, propiedades fisicoquímicas, dosis y concentración, vías de entrada y metabolismo, etc.
  
- ✓ **Del individuo:** Estado de salud, edad, estado nutricional y sexo, etc.
  
- ✓ **Del medio ambiente:** Temperatura, presión atmosférica, luz, tipo de trabajo, etc.

### **B.4.- NOMBRES DE LOS PESTICIDAS**

- 1) **Nombre comercial,** es el nombre que el fabricante le da al producto formulado, es el nombre con que aparece en la publicidad el producto.
  
- 2) **Nombre común** del ingrediente activo, es el nombre del i.a. del pesticida.

3) **Nombre químico** del ingrediente activo o nombre químico, es el nombre que se usa para describir la estructura química del ingrediente activo en los pesticidas.

## B.5.- CLASIFICACION DE PLAGUICIDAS

Los pesticidas se pueden clasificar según diferentes criterios entre ellos se pueden mencionar:

### a) Según mecanismo de acción o actividad

- ❖ **De contacto**, actúan por contacto directo, cáusticos.
- ❖ **Sistémicos**, actúan translocándose dentro de la planta, el producto es aplicado al follaje y absorbido por este para ser transportado por el sistema vascular de la planta.
- ❖ **De inhalación**, actúan a través del sistema respiratorio del insecto

**También se pueden encontrar:**

Digestivos, de acción protectora, repelente, acción residual y de acción erradicante.

### b) Según Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) por vía oral y cutánea

**Tabla B.1.:** Clasificación toxicológica según DL<sub>50</sub>.

Categoría	LD 50 Aguda (ratas) mg/kg				Color
	Oral		Cutánea		
Tóxico	sólido	líquido	sólido	líquido	Etiqueta
1 extremadamente	< 5	>20	>10	>40	<b>ROJA</b>
2 Altamente	< 5	>20	>10	>40	<b>AMARILLA</b>
3 Moderadamente	>50	>200	>100	>400	<b>AZUL</b>
4 Ligeramente	>500	>2000	>1000	>4000	<b>VERDE</b>

**c) Según clasificación toxicológica de la OMS**

**Tabla B.2.:** Clasificación toxicológica según OMS.

Clasificación de OMS	Clasificación de peligro	Color de la etiqueta	Símbolo de peligro
Sumamente peligros	<b>MUY TÓXICO</b>	<b>ROJO</b>	CALABERA
Muy peligroso	<b>MUY TÓXICO</b>	<b>ROJO</b>	CALABERA
Moderadamente peligroso	<b>NOCIVO</b>	<b>AMARILLA</b>	CRUZ
Poco Peligroso	<b>CUIDADO</b>	<b>AZUL</b>	-
Normalmente no ofrece peligro	<b>PRECAUCIÓN</b>	<b>VERDE</b>	-

**d) Según uso o tipo de organismo que desea controlar**

- Insecticidas..... Insectos
- Fungicidas..... Hongos
- Herbicidas..... Hierbas
- Acaricidas..... Ácaros
- Nematicidas-Fumigantes de suelo..... Nemátodos
- Molusquicidas..... Moluscos
- Rodenticidas..... Ratones
- Avicidas..... Aves
- Bactericidas..... Bacterias

**e) Según grupo químico**

- Organofosforados.
- Organoclorados.
- Carbamatos.
- Piretroides
- Bipiridilos.
- Fenoxiacético.
- Bromuro de Metilo.

- Herbicidas Nitrofenólicos y Nitrocresólicos
- Insecticidas de Cloruros Orgánicos Sólidos
- Pesticidas Arsenicales
- Herbicidas Clorofenólicos, etc.

## **B.6.- USOS DE LOS PLAGUICIDAS**

- ❖ **Agricultura y Forestal.**
  - En el campo, bosques, invernaderos, suelos, productos, etc.
- ❖ **Agroindustria.**
  - Tratamiento de alimentos de exportación: cámaras de Bromuro de Metilo y Anhídrido Sulfuroso.
- ❖ **Salud Pública.**
  - Tratamiento de Sarna y Pediculosis.
  - Manejo de Vectores: Chagas, mosquitos, etc.
- ❖ **Doméstico.**
  - En el hogar.
  - Tratamientos de parques y lugares públicos.
- ❖ **Veterinario.**
  - Parásitos, moscos, etc.

### **B.6.1.- Principales usos de los plaguicidas según grupo químico**

INSECTICIDAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. Organofosforados.</li> <li>2. Organoclorados.</li> <li>3. Piretrinas y Piretroides</li> </ul>
NEMATICIDAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>1. Organofosforados</li> </ul>

FUNGICIDAS	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ditiocarbamatos.</li> <li>2. Cloratanil.</li> <li>3. Organofosforados</li> </ol>
FUMIGANTES	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ditiocarbamatos.</li> <li>2. Cloratanil.</li> <li>3. Organofosforados</li> </ol>
HERBICIDAS	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bipiridilos.</li> <li>2. Clorofrnoxi.</li> <li>3. Organofosforados</li> </ol>

**Nota: en Chile existen autorizados por el SAG más de 900 productos de uso agrícola.**

#### **B.6.2.- Etapas para el uso del plaguicida**

- 1.- Registro (uso agrícola y doméstico)
- 2.- Ingreso
- 3.- Transporte
- 4.- Comercialización (venta)
- 5.- Uso (antes durante y después de la aplicación)
- 6.- Manejo

7.- Eliminación de residuos

8.- Disposición final

9.- Consumo de alimentos fumigados (nacional y exportación)

### **B.6.3.- Exposición a plaguicidas**

Las exposiciones a plaguicidas o pesticidas son de tipo ocupacionales o accidentales y la adsorción del pesticida ocurre por contacto directo con fuentes móviles y estacionarias tales como: aire, agua, suelo y alimento. Presentando un mayor riesgo de intoxicación la población laboral, que manipula y trabaja con estos tóxicos.

#### **Vías de exposición:**

- Producción de plaguicidas.
- Transporte y el almacenamiento.
- Preparación y mezcla.
- Aplicación (vía aérea y terrestre).
- Eliminación.
- Mantenimiento de maquinarias.
- Consumo de alimentos contaminados.
- Consumo de agua contaminada.
- Aplicación a personas, casas, predios, edificios, animales, etc.

## **B.7.- RIESGO DE LOS PLAGUICIDAS**

### **Dependen de:**

- La toxicidad del plaguicida para el humano (clasificación tox/OMS)
- Las condiciones de exposición de la población general y laboral.
- Los niveles de exposición general y laboral.

### **Evaluación del riesgo**

1. **Uso de los datos** de toxicología de los plaguicidas.
2. **Evaluación del efecto crítico** efecto adverso que se espera ocurra en los niveles más bajos de exposición.
3. **Evaluación del nivel máximo** al que se puede exponer el trabajador o la población sin efectos adversos en la salud.
4. **Comparación del nivel máximo** con los niveles de exposición real, evaluación cuantitativa del riesgo.
5. **Exposición real/valor de referencia** (Ocup. y gral.) Razón de riesgo, mayor a 1, muestra el exceso de riesgo.

### **B.7.1.- Efectos agudos por plaguicidas**

#### **B.7.1.1.- Intoxicaciones vinculadas a una exposición de corto tiempo con efectos sistémicos o localizados.**

#### **La gravedad y daños a la salud dependen de:**

- La dosis.
- El tipo de producto (toxicidad, tipo químico, vehículo).

- La vía de ingreso al organismo.
- Las características del tóxico (edad, nutrición, etc.).

**Se destacan:**

- Irritación de la piel y mucosas.
- Efectos en el sistema nervioso y periférico.
- Efectos cardiovasculares, bradicardia, taquicardia, HTA, etc.
- Efectos respiratorios; neumonitis, fibrosis pulmonar.
- Efectos gastrointestinales; diarrea, vómitos.
- Efectos renales: insuficiencia renal.

**B.7.2.- Efectos crónicos por plaguicidas**

**B.7.1.2.- Intoxicaciones vinculadas a exposición a bajas dosis por largos periodos de tiempo.**

**Principales efectos:**

- ✓ **Cáncer:** Carcinogenesis; arsenicales.
- ✓ **Probable carcinogénico:** Dibromuro de etileno, DDT, toxafeno.
- ✓ **Daño al sistema reproductivo:** Esterilidad.
- ✓ **Disminución del índice de fertilidad;** captan.
- ✓ **Efecto mutagénico:** Dibromuro de etileno.
- ✓ **Efecto teratogenico:** Carbaril, captan, paraquat, maneb, etc.
- ✓ **Daño en el sistema inmunitario:** Dicofol, triclorfon.
- ✓ **Neurotoxicidad:** Retardada: OF; leptofos, Carbamato: carbaril.

## **B.8.- SITUACION DE LOS PLAGUICIDAS EN CHILE**

Importación de Plaguicidas Año 1998: 17.942 Toneladas (incremento del 48% en la última década). Año 2001: 18.584 Toneladas.

### **Existen registrados para:**

- **Uso Agrícola:** 447 ingredientes activos y 875 formularios comerciales. SAG, agosto 2002.
- **Uso doméstico:** más de 400 plaguicidas, IST.

### **La población rural es la principalmente expuesta:**

- Chile año 1998: 4.7 Kilos de plaguicidas por Hectáreas.
- Chile año 1998: 1.2 Kilos de plaguicidas por Hab. – Año

### **B.8.1.- Criterios para priorizar un problema de salud:**

- Magnitud
- Gravedad o severidad
- Vulnerabilidad y/o ser prevenible
- Preocupación o interés local
- Tendencia

## B.9.- RESTRICCIONES Y PROHIBICIONES AL USO DE PLAGUICIDAS DE USO DOMESTICO

<b>PRODUCTO</b>	<b>AÑO (Prohibición)</b>
Monofluoracetato de Sodio o compuesto 1080	1982
DDT.	1984
Dibromuro de Etileno	1985
Dieldrin, Endrin, Heptocloro y Clordán	1987
Aldrin	1988
Daminozide	1989
Sales orgánicas o inorgánicas de mercurio	1993
Mevintos	1994
2,4,5-T, Clodimeform, Toxafeno o Canfeclor	1998
Lindano, uso agrícola	1998
Paratión Etilo y Metilo	1999
Pentaclorobenceno	1999
Restringe Paraquat	2001
Hexaclorobenceno	2002
Mirex	2002

Fuente Servicio Agrícola y Ganadero

## **B.10.- PROBLEMAS DETECTADOS DE LOS PESTICIDAS**

- **Amplio uso** de actividades agrícola, forestal, doméstica, sanitaria, veterinaria, entre otras.
- **Población general en peligro o está expuesta**, directa o indirectamente a los pesticidas.
- **Población laboral agrícola** expuesta, en particular grupo de trabajadores del país.
- **Existencia de muertes** por intoxicación con pesticidas.
- **Escaso conocimiento** de la población y equipos de salud de los riesgos para la salud de los pesticidas.
- **Limitadas acciones preventivas** para su uso laboral y general.
- **Libre venta** de los pesticidas.
- **No existe regulación para aplicación terrestre.**

### **B.10.1.- Exposición a plaguicidas**

#### **Poblacion general:**

- Comunidades Rurales: cerca del campo donde se aplica.
- Familias de trabajadores agrícolas.
- Escolares y profesores: colegios cerca zonas de aplicación.
- Personas expuestas al consumo de: alimentos y aguas (contaminadas).
- Personas en tratamiento sarna y pediculosis.
- Personas expuestas a aplicaciones domésticas: casas.

**Trabajadores/as:**

- Del sector agrícola y agroindustria.
- De empresas de aplicación urbana.
- De empresas formuladoras.
- Que realizan mantención de maquinaria transporte, almacenamiento y comercialización de pesticidas.
- De la industria forestal.

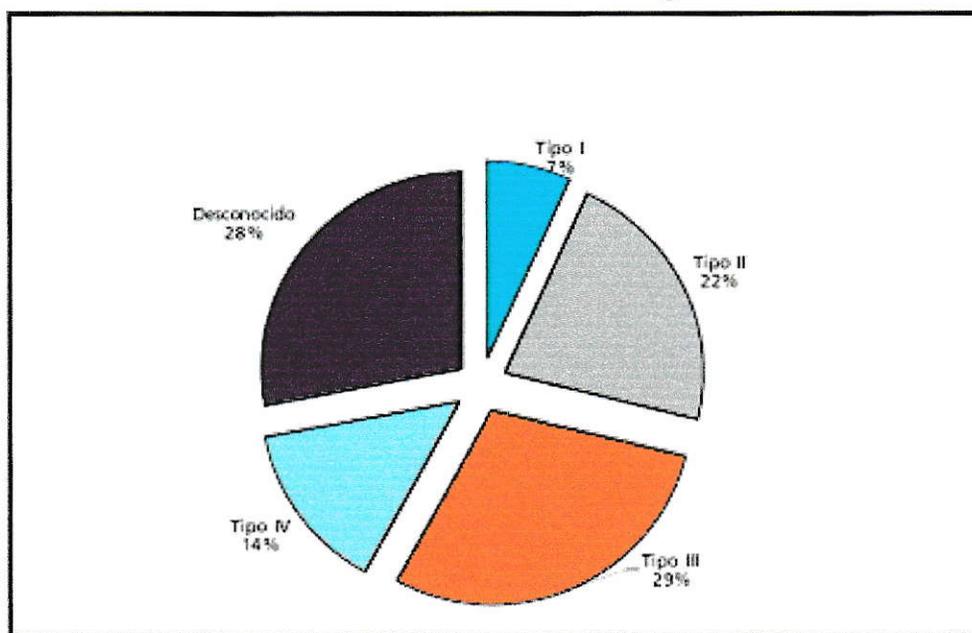
## **ANEXO C**

# **INTOXICACIONES POR PESTICIDAS**

## INTOXICACIONES POR PESTICIDAS

Anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a paratión en el mundo y en nuestro país es la principal causa de intoxicación por pesticidas de uso agrícola. La OMS define la clasificación aguda de los pesticidas a través de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) (ver Anexo B). En Chile el 29 % de las intoxicaciones corresponden a pesticidas de los grupos extremadamente tóxico (Tipo 1) y altamente tóxico (Tipo 2), siendo estos grupos los responsables del 51% de las muertes y las hospitalizaciones (Figura C.1).

Distribución de intoxicaciones agudas.

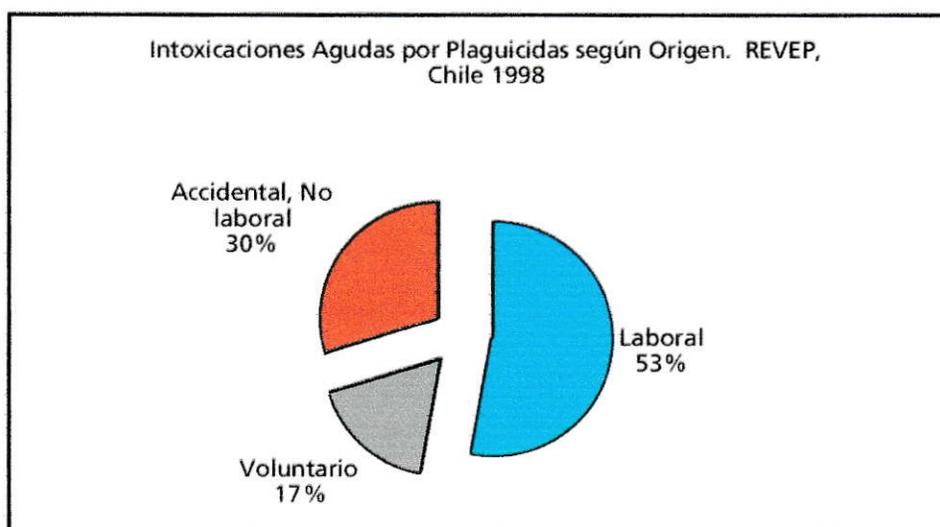


**Figura C1:** Gráfico de la distribución de intoxicaciones agudas por pesticidas según clasificación toxicológica aguda. Fuente REVEP, Chile 1998.

### C.1.- CLASIFICACION O TIPO DE LAS NOTIFICACIONES DE INTOXICACIONES

En nuestro país las intoxicaciones más frecuentes son aquellas vinculadas al trabajo, conocidas como **intoxicaciones laborales**, con un 53% (447) de las notificaciones. En 1998 el segundo lugar correspondió a las **intoxicaciones accidentales no laborales** con un 30 % (248), que son aquellos casos ocurridos en el hogar y espacios cerrados. Por último están aquellas clasificadas como **intoxicaciones voluntarias** que representan los intentos de suicidio con un 17% (143).

En el año anterior en 1997 el primer lugar en intoxicaciones también correspondió a las laborales (67%), en segundo lugar aparecieron las voluntarias (16%) y en tercero las **accidentales no laborales** (15,17%) (Figura C.2).



**Figura C.2:** Gráfico de la distribución de intoxicaciones agudas por pesticidas según clasificación tipo de las notificaciones de intoxicaciones. Fuente REVEP Chile 1998.

## C.2.- INTOXICACIONES SEGUN GRUPO QUIMICO DE LOS PESTICIDAS

Los grupos químicos predominantes en las intoxicaciones son los organofosforados con un 56%, situación que se repitió en años anteriores, seguido del grupo de los piretroides con un 6% (Tabla C.1). Cabe destacar que no se pudo precisar información referente al ingrediente activo y su grupo químico en el 15% de los casos.

**Tabla C.1.:** Distribución de intoxicaciones agudas según grupo químico de plaguicidas.

<b>Tipo de plaguicida</b>	<b>N° de intoxicaciones</b>	<b>%</b>
<b><i>Organofosforado</i></b>	468	55,5
<b><i>Organoclorado</i></b>	2	0,2
<b><i>Carbamato</i></b>	36	4,3
<b><i>Piretroides</i></b>	54	6,4
<b><i>Bipiridilo</i></b>	13	1,5
<b><i>Fenoxiacético</i></b>	8	0,9
<b><i>Bromuro de metilo</i></b>	15	1,8
<b><i>Otros</i></b>	121	14,3
<b><i>Desconocido</i></b>	127	15,0
<b><i>Total</i></b>	844	100

**ANEXO D**

**FICHA INTERNACIONAL DE SEGURIDAD  
QUIMICA PARATION**

## FICHA INTERNACIONAL DE SEGURIDAD QUIMICA

**PARATION**  
**O,O-DIETIL-O-4-NITROFENIL-D<sub>4</sub>-TIOFOSFATO**  
 $(C_2H_5O)_2PSOC_6H_4NO_2$   
**Masa molecular: 291.27**  
**ICSC: 0006**

Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión de las Comunidades Europeas © CCE, IPCS, 1994

Derramas y fugas	Almacenamiento	Envasado y etiquetado
<p>Evacuar la zona de peligro. Consultar a un experto. Ventilar. Recoger, en la medida de lo posible, el líquido que se derrama y el ya derramado en recipientes presentables, absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro. Neutralizar cuidadosamente el residuo con sustancias alcalinas. (Protección personal adicional: equipo autónomo de respiración).</p>	<p>A prueba de incendio. Separado de oxidantes fuertes. Mantener en lugar fresco y seco. Herméticamente cerrado.</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p>                     Símbolo: N                      Símbolo: T+                      R: 27/28-50/53                      S: (1/2-)28-36/37-45-60-61                      Clasificación de Peligros NU:                      6.1 CE                 </p>

## TIPOS DE PELIGRO/ EXPOSICION

	<b>Peligros/ síntomas agudos</b>	<b>Prevención</b>	<b>Primeros auxilios/ lucha contra incendios</b>
<b>Incendio</b>	Combustible.	Evitar las llamas.	Polvo, agua pulverizada, espuma, dióxido de carbono.
<b>Explosión</b>	—	—	En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.
<b>Exposición</b>		Evitar la formación de niebla del producto. Higiene estricta. Evitar la exposición de adolescentes y niños.	Consultar al médico en todos los casos.
<b>Inhalación</b>	Dolor de cabeza, vómitos, diarrea, vértigo, debilidad, convulsiones, dificultad respiratoria, contracción de las pupilas, calambres musculares, excesiva salivación, pérdida del conocimiento.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo, respiración artificial si estuviera indicada y proporcionar asistencia médica.
<b>Piel</b>	Puede absorberse.	Guantes protectores y traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas, aclarar y lavar la piel con agua y jabón y proporcionar asistencia médica.

<b>Ojos</b>	Puede ser absorbido. Enrojecimiento, dolor, visión borrosa.	Pantalla facial o protección ocular combinada con la protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad) y proporcionar asistencia médica.
<b>Ingestión</b>	Calambres abdominales (para mayor información, véase Inhalación).	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca, provocar el vómito (únicamente en personas conscientes), dar a beber agua abundante y proporcionar asistencia médica.

### DATOS IMPORTANTES

<b>Estado físico; aspecto y propiedades físicas</b>	<b>Peligros físicos</b>	<b>Peligros químicos</b>
<p>Líquido entre amarillo pálido y marrón (producto técnico), de olor característico.</p> <p><i>Punto de ebullición:</i> 375°C</p> <p><i>Punto de fusión:</i> 6°C</p> <p><i>Densidad relativa :</i> 1.26 mg/ml</p> <p><i>Solubilidad en agua,</i> ml/100 ml a 25°C: 0.0024</p>	El vapor es más denso que el aire y puede extenderse a ras del suelo; posible ignición en punto distante.	La sustancia se descompone al calentarla intensamente, produciendo gases tóxicos: monóxido de carbono, óxidos de azufre, óxidos de fósforo, óxidos de nitrógeno. Reacciona con oxidantes fuertes. Ataca a algunas formas de plásticos, caucho y recubrimientos. Se hidroliza rápidamente en contacto con álcalis.

## EXPOSICION

Vías de exposición	Efectos de exposición de corta duración	Efectos de exposición prolongada o repetida
La sustancia se puede absorber por inhalación del aerosol, a través de la piel y por ingestión. La sustancia se puede absorber a través de los ojos.	La sustancia irrita los ojos, la piel y el tracto respiratorio. La sustancia puede causar efectos en el sistema nervioso por inhibición de la colinesterasa, dando lugar a convulsiones, fallo respiratorio, debilidad muscular. La exposición puede producir la muerte. Los efectos pueden aparecer de forma no inmediata. Se recomienda vigilancia médica.	Inhibidor de la colinesterasa efectos acumulativos son posibles: véase riesgos/síntomas agudos
Limites de exposición	Riesgo de inhalación	Datos ambientales
TLV (como TWA): 0.1 mg/m <sup>3</sup> (piel) (ACGIH 1995-1996). MAK: 0.1 mg/m <sup>3</sup> (piel) (1996).	La evaporación a 20°C es despreciable; sin embargo, se puede alcanzar rápidamente una concentración nociva de partículas en el aire por pulverización.	Presión de vapor, Pa a 20 °C : 0,005 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 10 Punto de inflamación: 120-160°C

### NOTAS

El producto comercial puede contener impurezas inflamables. Está indicado examen médico periódico dependiendo del grado de exposición. Los síntomas del edema pulmonar no se ponen de manifiesto, a menudo, hasta pasadas algunas horas y se agravan por el esfuerzo físico. Reposo y vigilancia médica son, por ello, imprescindibles. En caso de envenenamiento con esta sustancia es necesario realizar un tratamiento específico; así como disponer de los medios adecuados junto las instrucciones respectivas. Los disolventes usados en formulaciones comerciales pueden modificar las propiedades físicas y toxicológicas. La alerta por el olor es insuficiente.

### FICHA DE EMERGENCIA DE TRANSPORTE

(Transport Emergency Card): TEC (R)-755a Código NFPA: H 4; F 1; R 0;

### NOTA LEGAL IMPORTANTE

Ni la CCE ni la IPCS ni sus representantes son responsables del posible uso de esta información. Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales.