

UCH-FC
Doc-Q
B.151
C.1

Universidad de Chile



Quinonas Biológicamente Activas Disueltas en Miméticos de Membrana. Un estudio ^2H -RMN y Dinámica Molecular.

**Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
En Cumplimiento Parcial de los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Doctor en Química

Facultad De Ciencias

Por

Víctor Eduardo Bahamonde Padilla

Enero, 2014

Director de Tesis Dr: Boris Weiss López

Co-Director de Tesis: Hernán R. Ahumada Gutiérrez

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

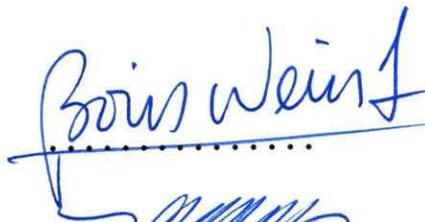
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

VÍCTOR EDUARDO BAHAMONDE PADILLA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 25 de noviembre del 2013

Director de Tesis:
Dr. Boris Weiss



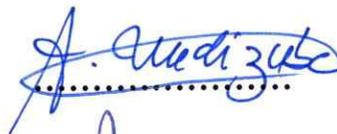
Co-Director de Tesis:
Dr. Hernán Ahumada



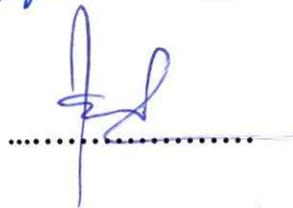
Comisión de Evaluación de la Tesis:
Dr. Eduardo Soto



Dr. Fernando Mendizábal



Dr. Hernán Pessoa



Dr. Danilo Gozález





Víctor Eduardo Bahamonde Padilla nació en la Región de Aysén, llevando a cabo su enseñanza básica y media en la ciudad de Coyhaique. El 2003 llega a Santiago a estudiar Licenciatura en Educación Química y Pedagogía en Química en la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación. El 2008 entra al programa de Doctorado en Química de la Universidad de Chile, obteniendo el grado de Doctor en Química en enero del 2014.

Agradecimientos

A Dios por ayudarme a sacar adelante estos estudios.

A CONICYT por la beca de doctorado.

A FONDECYT por el financiamiento a esta tesis a través del proyecto 1095175.

Al Dr. Juan Guerrero por facilitarnos el acceso al equipo de RMN situado en la Universidad de Santiago de Chile

Dr. José Javier Lopez Cascales de la Universidad Politecnica de Cartagena, España, por su ayuda con los calculos de Umbrella Sampling.

Al Prof. Sergio Alegria por su apoyo en las mediciones de RMN

A mis compañeros de doctorado

A mis compañeros del laboratorio de Físicoquímica Molecular

A mi familia

Índice de Contenido

1	Introducción	5
1.1	Cristales Líquidos.....	8
1.2	Resonancia magnética nuclear.....	11
1.2.1	Interacción Cuadrupolar	21
1.3	Simulaciones computacionales.....	24
1.3.1	Mecánica Molecular.....	25
1.3.2	Dinámica Molecular.....	29
1.3.3	Trayectoria.....	30
1.3.4	Condiciones de borde periódico	31
1.3.5	Análisis de Resultados.....	33
1.3.5.1	Densidad de Masa.....	33
1.3.5.2	Densidad de Carga.....	34
1.3.5.3	Función de distribución radial.....	34
1.4	Calculo de energia libre en dinamica molecular	36
2	Hipótesis.....	38
3	Objetivos.....	38
3.1	Objetivos Generales.....	38
3.2	Objetivos Específicos.....	38
4	Locación, orientación y dinámica de dos moléculas con actividad mitocondrial, disueltas en liomesofaces aniónicas. Un Estudio en Base a 2H-NMR y Dinámica Molecular.....	39
4.1	Preparación de la Muestra.....	39
4.2	Determinación de las Señales.....	40
4.3	Dinámica Molecular.....	40
4.4	Resultados Experimentales y Dinámica Molecular.....	41
4.5	Discusión.....	46
4.6	Conclusiones.....	50
5	Efecto del contra-ion sobre cristales líquidos liótopos nemáticos discoidales formados por SDS y Decanol en solución de Na ₂ SO ₄ y NaHSO ₄ . Un estudio en base a 2H-NMR y Dinámica Molecular.....	51
5.1	Preparación de la Muestra.....	52

5.2	Determinación de las Señales.....	52
5.2.1	Asignaciones para las señales de SDS-d25 y Decanol-d2.....	52
5.3	Dinámica Molecular.....	55
5.4	Resultados Experimentales y Dinámica Molecular.....	56
5.5	Conclusiones.....	63
6	Distribución y dinámica de dos derivados de quinona sobre cristales líquidos liótropos. Un estudio en base a 2H-RMN y Dinámica Molecular.....	64
6.1	Preparación de la Muestra.....	65
6.2	Determinación de las Señales.....	65
6.2.1	Asignaciones para la Señales de I y II.....	65
6.3	Dinámica Molecular	66
6.4	Resultados Experimentales y Dinámica Molecular.....	68
6.5	Conclusiones.....	77
7	Apéndice.....	78
7.1	Sobre la actividad biológica de un conjunto de derivados de hidroquinonas que inhiben la respiración celular. Un estudio teórico.....	78
7.2	Portadas de publicaciones derivadas de esta tesis.....	80
7.3	Colaboraciones previas con el grupo de Trabajo.....	82
8	Referencias.....	85

Índice de Figuras

Figura 1.1: Diagrama de fase. En el centro tenemos un orden bidimensional (izquierda) y un orden mono dimensional (derecha).....	9
Figura 1.1.1: De izquierda a derecha: Fase nemática. Fase colestérica. Visión idealizada de la trayectoria helicoidal que siguen las capas en la fase colestérica. Fase esméctica.....	14
Figura 1.1.2: Izquierda: anfifilos bajo CMC. Derecha: micelas esféricas sobre la CMC, las cabezas polares (rojo) se encuentran en contacto con el agua e iones y las cadenas hidrofóbicas se encuentran hacia el interior del agregado.....	15
Figura 1.1.3: Izquierda: estructura de la fase hexagonal, formada por empaquetamiento de micelas cilíndricas; cada cilindro esta separado del otro por agua intersticial. Derecha: estructura de la fase lamelar., formada por bicapas cuasi-infinitas; al igual que en la fase hexagonal, cada bicapas esta separadas por agua intersticial.....	16
Figura 1.1.4: Regiones en un sistema de bicapa.....	16
Figura 1.2.1: Dos posibles orientaciones del momento magnético (μ), de un protón girando en torno a un campo magnético externo B_0	18
Figura 1.2.2: Efecto Zeeman nuclear. Izquierda: un núcleo con $I=1/2$. Derecha: un núcleo con $I=1$. Las flechas al lado de cada estado de espín indica la orientación del momento nuclear magnético en un campo magnético.....	20
Figura 1.2.3: Efecto Zeeman. Izquierda: ilustración de la orientación al azar del momento magnético nuclear en ausencia de un campo magnético externo. Centro y Derecha: precesión del momento magnético nuclear en torno al campo magnético externo.....	21
Figura 1.2.4: Precesión de un grupo de espín con $I=1/2$ alrededor de un campo magnético externo. M_z es la suma de todos los vectores individuales de momento magnético. Izquierda: instante antes de la exposición a B_1 . Centro: orientación del campo magnético B_1 . Derecha: durante la exposición con B_1	22
Figura 1.2.5: Un espín α (\uparrow) intercambia espontáneamente energía con un espín β (\downarrow). De esta forma, el espín α es convertido a un espín de alta energía β y viceversa, sin cambio neto de energía. Repeticiones de este proceso con otros pares de espín, tendrán el efecto de aleatorizar la coherencia de fase, llevando a cero la componente x,y ($M_{x,y}$) de M_z	24
Figura 1.2.6: Izquierda: serie de espectros obtenidos para el cálculo de T_1 . Cada pick representa una secuencia de pulso. Derecha: gráfica de los máximos de cada pick de la serie de	

espectros.....	28
Figura 1.2.7: Representación de la distribución de carga nuclear.....	29
Figura 1.2.8: Un cuadrupolo eléctrico interactúa con una gradiente de campo eléctrico. Para el deuterio ($I=1$), la gradiente es provista por los electrones del enlace carbono-deuterio.....	30
Figura 1.2.9: Esquema del desdoblamiento de la señal de RMN de un núcleo cuadrupolar, por ejemplo ^2H en un medio anisotrópico.....	31
Figura 1.3.1: Extensión del enlace vs. Energía Potencial.....	34
Figura 1.3.2: Vibración angular entre tres átomos contiguos y la representación de su potencial.....	35
Figura 1.3.3: Principio de ángulo diédrico impropio (o torsión fuera del plano). Izquierda: torsión fuera del plano para un anillo. Centro: sustituyentes, por ejemplo, para un anillo. Derecha: fuera del plano para un tetraedro. El ángulo impropio ϵ_i se define como el ángulo entre los planos (i,j,k) y (j,k,l) en todos lo casos.	35
Figura 1.3.4: diédrico propio (en forma trans) y la representación de su potencial.....	36
Figura 1.3.5: Esquema del Método de integración de Leap-Frog. Calculo de v y r en un desfase de tiempo igual a $t/2$	39
Figura 1.3.6: Representación tridimensional de CBP. Moléculas pueden entrar y dejar cada caja a través de cada borde. La densidad de la caja central no cambia.....	41
Figura 1.3.7: Izquierda: Representación gráfica del número de cortes en la caja de simulación en el cálculo de densidad de masa en GROMACS. La moléculas de agua están representadas por dos esferas blancas (hidrogeno) y una roja (Oxigeno). Derecha: perfil de densidad de masa para Agua (H_2O), Dodecilsulfato de Sodio (SDS) y Decanol (DeOH).....	42
Figura 1.3.8: Ejemplo de cálculo de densidad de carga en GROMACS.....	43
Figura 1.3.9: Calculo de la función de distribución radial.....	44
Figura 4.1: De izquierda a derecha: (1) 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-1,4,5,8-tetraidroantracén-1-ona (II), (2) 4,4-dimetil-1,4,9,10-tetraidroantracene-1,9,10-triona (III).....	49
Figura 4.3.1: De izquierda a derecha: espectro ^2H -RMN para III y II disuelto en la mesofase de CsDS. Inferior: Experimento para la medición de T_1 en la muestra de II. Los desdoblamientos cuadrupolares fueron medidos directamente desde los espectros para cada una de las moléculas.....	51
Figura 4.4.1: Caja de simulación de la dinámica molecular conteniendo II. El solvente (agua)	

es representado de color azul continuo, los sulfatos de color amarillo, los átomos de cesio como esferas plomas opacas, los CsDS en naranja y el DeOH en verde. En color azul están los carbonos de II, en color blanco los átomos de deuterio y los átomos de oxígeno en rojo.....52

Figura 4.4.2: Gráfico de densidades de masa para todos los componentes del sistema a lo largo del eje z de la caja de simulación. Para una mejor visualización de las gráficas, el CsDS y DeOH están divididos en 3 fragmentos cada uno, como se muestra en la figura.....53

Figura 4.4.3: Coordenada z para el centro de masa para II y III. Sólo los primeros 20ns son mostrados. La región acuosa e interfaz están puestas según los gráficos de densidad de masa promedio.....54

Figura 4.4.4: Histogramas de los ángulos entre el eje molecular corto (izquierda) y el eje molecular largo (derecha) de III con respecto al eje z de la bicapa, el cual es el eje normal al plano de la bicapa.....55

Figura 4.4.5: Histogramas de los ángulos entre el eje molecular corto (izquierda) y el eje molecular largo (derecha) de II con respecto al eje z de la bicapa, el cual es el eje normal al plano de la bicapa.....55

Figura 4.4.6: Histogramas para las distancias donador-aceptor correspondientes a la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo C=O en el carbono C9 de III y para el grupo OH en el carbono C10 de II con las moléculas de agua.....55

Figura 4.4.7: Función de distribución radial de las moléculas de agua rodeando a los átomos de oxígeno en el grupo C=O de III y del grupo OH para II.....56

Figura 5.3.1: superior:EXP1, inferior:EXP2. Sobre cada pick se han puesto los deuterios de los cuales proviene cada desdoblamiento, desde los primeros 9 CD2 cercanos a la señal del decanol hasta el doceavo carbono, 12CD3, cercano a la señal del agua deuterada.....65

Figura 5.4.1: Espectro ^2H -RMN de S1 y S2.....68

Figura 5.4.2: Diferencias de desdoblamiento cuadrupolar ($\Delta\nu_Q \text{ S1} - \Delta\nu_Q \text{ S2}$) vs. Número de Carbono de la cadena alifática del SDS.....69

Figura 5.4.3: Imagen de S2 a los 99ns de trayectoria. Los átomos de azufre están en amarillo, Na^+ verdes, Li^+ negro, oxígenos rojo y las cadenas alifáticas en azul claro.....71

Figura 5.4.4: Desdoblamientos cuadrupolares experimentales y calculados para S1 y S2.....72

Figura 5.4.5: Perfil de densidad de masa a lo largo del eje z de la caja para todos los componentes de S2.....74

Figura 5.4.6: Distribución de la densidad de carga para Na ⁺ , Li ⁺ , el azufre del SDS, el oxígeno adyacente al primer carbono del SDS(O5-SDS) y el Agua, a lo largo del eje z de la caja para la mesofase S2.....	74
Figura 6.1: De izquierda a derecha: 4,4-dimethyl-1,4,5,8,9,10-hexahydroanthracene-1,9,10-trione (I) y 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-1,4,5,8-tetrahydroanthracen-1-one (II).....	76
Figura 6.1.1: Síntesis de I y II.....	77
Figura 6.2.1: Superior: EXP A, Inferior:EXP B.....	78
Figura 6.4.1: Diferencia de desdoblamiento cuadrupolar en función del número de carbono de la cadena alifática del SDS para II.....	82
Figura 6.4.2: Diferencia de desdoblamiento cuadrupolar vs el número de carbono de la cadena alifática del SDS para I.....	82
Figura 6.4.3: Densidades de masa a lo largo del eje z. Superior: I, Inferior: II.....	85
Figura 6.4.4: Trayectorias de los centros de masa del grupo OH del decanol, I y II.....	86
Figura 6.4.5 Puentes de Hidrógeno entre I o II con decanol y agua.....	87
Figura 6.4.6 Formación de dímeros entre las hidroquinonas y la formación de puentes de hidrógeno entre los dímeros y decanol.....	87
Figura 6.4.7: Puentes de Hidrógeno entre II y decanol.....	88
Figura 6.4.8: Trayectoria iones sodio, sistema I y II.....	88
Figura 6.4.9 Perfil de energía libre para I y II.....	89

Índice de Tablas

Tabla 4.4.1: Desdoblamientos cuadrupolares y tiempos de relajación longitudinal para todos los enlaces CD en la muestra usando ^2H -RMN. Los errores en para DeOH es decon II y III y para DHO. Izquierda a derecha: Mesofase sin molécula, mesofase con III, mesofase con II, II en la fase desconocida.....	56
Tabla 5.2.1: SDS-h25: Dodecilsulfato de sodio no deuterado. SDS-d25:Dodecilsulfato de sodio deuterado a lo largo de toda la cadena. DeOH-d2: Decanol deuterado en el carbono adyacente al grupo hidroxilo. DHO: Agua deuterada. Na_2SO_4 : Sulfato de sodio anhidro.....	69
Tabla 5.3.1: Cargas Ab-Inicio 6-32G* y parámetros de Lennard-Jones empleados en esta simulación.....	73
Tabla 5.4.1: $\Delta\nu\text{Q}$ calculados y experimentales junto con los T_1 de DHO, SDS-d25 y DeOH- α -d2 en la mesofase de $\text{SDS}/\text{Na}_2\text{SO}_4$ y $\text{SDS}/\text{Li}_2\text{SO}_4$	74
Tabla 6.2.1: SDS-h25: Dodecilsulfato de sodio no deuterado. SDS-d25:Dodecilsulfato de sodio deuterado a lo largo de toda la cadena. DeOH-d2: Decanol deuterado en el carbono adyacente al grupo hidroxilo. DHO: Agua deuterada. Na_2SO_4 : Sulfato de sodio anhidro. II-h6: Hidroquinona no deuterada. II-d6: Hidroquinona deuterada. I-h4: Quinona no deuterada. I-d6: Quinona deuterada.....	86
Tabla 6.4.1: Desdoblamientos cuadrupolares y tiempos de relajación longitudinal para todos los experimentos realizados.....	89

Lista de Abreviaturas

SDS-h ₂₅	Dodecilsulfato de Sodio no Deuterado
I	4,4-dimetil-1,4,5,8,9,10-hexahidroantracén-1,9,10-triona
II	9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-1,4,5,8-tetrahydroanthracén-1-ona
III	4,4-dimetil-1,4,9,10-tetrahydroanthracén-1,9,10-triona
H ₂ O	Agua Destilada
DHO	Agua Deuterada
cl	Cristal(es) líquido(s)
DeOH	Decanol
DeOH-d ₂	Decanol Deuterado
Δv_Q	Desdoblamiento Cuadrupolar
CsDS	Dodecilsulfato de Cesio Deuterado
SDS-d ₂₅	Dodecilsulfato de Sodio Deuterado
² H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Deuterio
SDS-Na	Sistema SDS/DeOH/Na
Cs ₂ SO ₄	Sulfato de Cesio Anhidro
Li ₂ SO ₄ ·H ₂ O	Sulfato de Litio Monohidratado
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio Anhidro
T ₁	Tiempo de Relajación Longitudinal

Resumen

Hemos explorado, experimental y teóricamente, la distribución, orientación promedio, interacción y dinámica de 4,4-dimetil-1,4,5,8,9,10-hexahidroantraceno-1,9,10-triona (I), 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-1,4,5,8-tetrahidroantraceno-1-ona(II) y 4,4-dimetil-1,4,9,10-tetrahidroantraceno-1,9,10-triona (III), selectivamente deuteradas, disueltas en cristales líquidos nemáticos liótropos discoidales, hechos en base a decilsulfato de cesio o dodecilsulfato de sodio y decanol ($XDS/DeOH/M_2SO_4/H_2O$, $X=Na,Cs$, $M=Na^+,Cs^+,Li^+$). Estos sistemas fueron estudiados experimentalmente usando espectroscopía de resonancia magnética nuclear de deuterio (2H -RMN), a través de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y desdoblamientos cuadrupolares ($\Delta\nu_Q$), y teóricamente usando dinámica molecular (DM). A partir de estos resultados encontramos que las moléculas se encuentran distribuidas en la región interna de la interfase, modificando la orientación de sus componentes con respecto al campo magnético. La orientación promedio y movilidad de las moléculas dentro de la bicapa se ve fuertemente influenciada por los grupos funcionales presentes en su estructura; es así como II alcanza fácilmente el centro de la región hidrofóbica a través de la formación de dímeros, a diferencia de I y III donde no se observa la formación de dímeros.

Además, estudiamos el efecto del contra-ion en un cristal líquido liótropo nemático discoidal, formados por dodecilsulfato de sodio (3% SDS- d_{25}) y decanol (20% DeOH- d_2), en solución acuosa (0.1% D_2O) con Na_2SO_4 o Li_2SO_4 . A partir de este estudio encontramos que el reemplazo de Na_2SO_4 por Li_2SO_4 en la preparación del cristal líquido no modifica el tamaño de los agregados, si no que disminuye el alineamiento de las cadenas alifáticas con el campo magnético. Finalmente atribuimos las diferencias observadas a la diferencias en las distribuciones de litio y sodio en el sistema. Efectivamente, litio se reparte esencialmente en el entorno del sulfato orgánico en tanto que sodio se distribuye tanto en la interfase como en la región acuosa.

Abstract

We explored experimentally and theoretically, distribution, average orientation, interactions and dynamic of 4,4-dimethyl-1,4,5,8,9,10-hexahydroanthracene-1,9,10-trione (I), 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-1,4,5,8-tetrahydroanthracene-1-one (II) and 4,4-dimethyl-1,4,9,10-tetrahydroanthracene-1,9,10-trione (III), selectively deuterated, dissolved in discotic nematic lyotropic liquid crystals, made of cesium decylsulfate or sodium dodecylsulphate and decanol (XDS / DeOH / M_2SO_4/H_2O , X=Cs, Na M = Na⁺, Cs⁺, Li⁺). These systems were studied experimentally using deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy (²H-NMR), through longitudinal relaxation times (T_1) and quadrupole splittings ($\Delta\nu_Q$) and theoretically using molecular dynamics (MD). We found that the host molecules are distributed in the internal region of the interface, modifying the orientation of their components with the magnetic field. The average orientation and mobility of the molecules inside the bilayer is strongly influenced by the functional groups they possess; it is observed that II reaches the bilayer center easily through a dimer formation, whereas I and III do not show that capability.

We also study counterion effects in a lyotropic discotic nematic liquid crystals formed by sodium dodecyl sulphate (3% SDS- d_{25}) and decanol (20% DeOH- D_2), in an aqueous solution (0.1% D_2O) with either Na_2SO_4 or Li_2SO_4 . It is observed that substitution of Na_2SO_4 by Li_2SO_4 do not modify the size of the aggregate, but decreases the alignment of the aliphatic chains with the magnetic field. Finally, the observed differences are attributed to the distribution of the ions in the interface. Effectively, lithium is distributed only near the sulphate head group, whereas sodium is distributed in the interface as well as the aqueous region.

1 Introducción

El 14 de marzo de 1888 el Dr. Friederich Reinitzer, Botánico de la universidad de Praga, envió una carta de 16 páginas, escrita a mano, al Profesor Otto Lehmann en la Universidad de Aachen, Alemania, solicitando la confirmación de algunas observaciones atípicas que había encontrado en el comportamiento físico del benzoato de colesterilo. Reinitzer descubrió que el benzoato de colesterilo tenía interesantes propiedades. Encontró que al calentar la sustancia a 145°C, esta fundía para formar un líquido lechoso, y a 179°C el líquido repentinamente se tornaba totalmente transparente. Cuando la sustancia se enfriaba, se observa el proceso inverso. Reinitzer concluyó su carta con una disculpa por la molestia y expresó su más sincero agradecimiento al Dr. Lehmann por el trabajo tomado por la posible investigación de las sustancias. Este trabajo representa el primer informe de lo que hoy conocemos como un Cristal Líquido^{1 2}.

En lugar de cursar directamente del estado sólido al estado líquido, estos sistemas pasan por una fase intermedia, llamada líquido-cristalino. Esta fase posee algo de estructura de los sólidos (ordenamiento espacial) y algo de la libertad de movimiento que poseen los líquidos (fluidez), siendo a veces muy viscosos y con propiedades intermedias entre ambas fases, Figura 1.1.



Figura 1.1: Diagrama de fase. En el centro tenemos un orden bidimensional (izquierda) y un orden mono dimensional (derecha)

Además estas especies son capaces de rotar el plano de la luz polarizada, debido a su forma y ordenamiento preferencial en el espacio (anisotropía del sistema). La IUPAC define el estado líquido cristalino como un estado mesomórfico (o mesofase) que posee un orden de largo alcance en lo que respecta a la orientación molecular y un orden parcial, o bien desorden, en lo referente a la posición de las moléculas. Así mismo define a un estado mesomórfico como un estado de la materia en el cual el grado de orden molecular es intermedio entre el perfectamente ordenado en tres dimensiones y de largo alcance en cuanto a la orientación y posición que se encuentra en los sólidos cristalinos, y la ausencia de un orden de largo alcance que se encuentra en los líquidos isotrópicos, gases y sólidos amorfos³.

Dependiendo de la especie con que una mesofase es formada, los cristales líquidos pueden ser clasificados como termótrópicos o liótrópicos. Las mesofases termotrópicas están formadas por moléculas que son geométricamente anisótropas y la fase formada es dependiente de la temperatura. Generalmente se consiguen calentando ciertos sólidos a una temperatura característica para cada sustancia. Los cristales líquidos liótrópicos son normalmente mesofases formadas por moléculas anfifílicas o polímeros disueltos en un solvente, las que forman agregados moleculares, por ejemplo cilindros o bicapas⁴. Moléculas anfifílicas, como son los fosfolípidos en sistemas biológicos, poseen una parte hidrófila (que prefiere asociarse con el agua) y otra hidrófoba (que tiende a ser excluida de ella). La fuerza impulsora o energía, necesaria para provocar este ordenamiento, proviene de interacciones del tipo hidrófoba-hidrófila y la estructura de la mesofase formada depende fuertemente de la naturaleza y concentración de las moléculas, la temperatura, el solvente y la presión⁵.

Dentro de los tipos de fase cristal líquido liótrópicos, se encuentran los nemáticos discoidales⁶ que pueden ser empleados como modelos de membranas biológicas, y debido a la anisotropía que presenta, nos permite estudiar el comportamiento dinámico de estos agregados así como también de moléculas huéspedes disueltos en

ellos a través de resonancia magnética de deuterio (^2H -RMN). Recientemente, los cristales líquidos liótropos en combinación con un campo magnético, se han empleado como medio en la síntesis de estructuras de nanotubos de carbono con una orientación preferencial, donde la orientación es controlada por la capacidad de orientación de los cristales líquidos liótropos en un campo magnético⁷.

Como parte de la gama de moléculas con interés biológico, como pesticidas⁸⁻¹⁰, antidepresivos¹¹ o anticancerígenos¹², los compuestos antioxidantes siempre han recibido una especial atención debido al rol que tendrían en la protección de las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo. Algunos de estos compuestos, como derivados del tocoferol, flavonoides o ácidos fenólicos tiene en común ser compuestos con grupos hidroxilos responsables de su actividad antioxidante.¹³⁻¹⁵ También, derivados de quinonas e hidroquinonas, se encuentran dentro del potencial grupo de moléculas anti o pro oxidantes. La reducción u oxidación de estas moléculas por flavoproteínas para dar semiquinonas está relacionada con la capacidad de intervenir en procesos biológicos tales como citotoxicidad¹⁶ y actividad antitumoral^{13,17}. Si bien, la importancia de estas moléculas está en las reacciones químicas implicadas en la actividad biológica, parte importante del proceso para llegar a los objetivos finales es la interacción, acumulación y/o cruce de la membrana celular¹⁸. El transporte a través de la membrana puede involucrar variados procesos¹⁹ en los cuales la acumulación de substratos en la interfaz de la membrana podría ser un factor importante para su inserción a la célula²⁰ o su interacción con los componentes de ella²¹⁻²³. Por lo tanto, estudiar propiedades fisicoquímicas de la membrana o modelos de ella y entender las interacciones de los anfifilos que la componen con estos substratos, podría aportar información importante para la elucidación de los mecanismos de acción de estas moléculas y el desarrollo de nuevas drogas.

En esta tesis se estudiaron un grupo de moléculas, derivadas de quinonas e hidroquinonas, biológicamente activas, disueltas en un modelo de membrana. Todas de ellas han sido sintetizadas y estudiadas anteriormente por el grupo del profesor Ramiro Araya de la Facultad de Química y Farmacias de la universidad de Chile. Las moléculas a estudiar fueron 4,4-dimetil-1,4,5,8,9,10-hexahidroantraceno-1,9,10-triona (I), 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-1,4,5,8-tetrahydroantraceno-1-ona(II) y 4,4-dimetil-1,4,9,10-tetrahydroantraceno-1,9,10-triona (III), Figura 1.2.

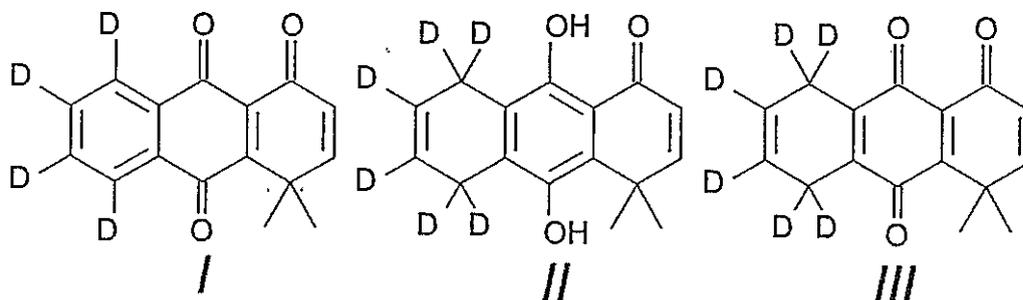


Figura 1.2: 4,4-dimetil-1,4,5,8,9,10-hexahidroantraceno-1,9,10-triona (I), 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-1,4,5,8-tetrahydroantraceno-1-ona(II) y 4,4-dimetil-1,4,9,10-tetrahydroantraceno-1,9,10-triona (III)

Antecedentes previos indican que I es permeable a la membrana plasmática de *Botrytis cinérea*, un hongo patógeno de especies vegetales, mostrando una alta actividad fungicida. A pesar de su permeabilidad, muestra una baja actividad antitumoral.

Compuesto	ED ₅₀ (µg/mL)
II	114.3±33.5
I	70.1±1.5

Tabla 1.1: Efecto de I y II en crecimiento micelar de *B. cinerea* in vitro.

Otros estudios muestran que II presenta una pequeña actividad fungicida, pero una interesante actividad antitumoral, inhibiendo la respiración mitocondrial en células carcinogénicas de ratón tipo TA3 y su variante TA3-MTX-R, a pesar de la similitud entre las estructuras II y I¹⁷.

Compuesto	IC50 (mM) TA3	IC50 (mM) TA3-MTX-R
I	0.3	0.34
II	0.080±0.01	0.070±0.01
III	0.22±0.02	0.17±0.02

Figura 1.3: Inhibición de la toma de oxígeno

El propósito final es buscar propiedades moleculares que podrían ser parcialmente responsables de las diferencias observadas en sus actividades biológicas.

1.1 Cristales Líquidos

Existen a lo menos dos clases de estructuras formadas por los cristales líquidos termótropos y liótropos, las fases nemática y esméctica²⁴. La fase nemática exhibe ordenamiento únicamente en una dirección. La dirección de la anisotropía es fija en el espacio cuando todas las moléculas adoptan una orientación similar. El centro de masa de las moléculas aun es capaz de moverse libremente en el espacio. En la fase nemática quiral, comúnmente conocida como fase colestérica, la dirección de la anisotropía (el vector de anisotropía) rota a través del espacio generando una hélice, como resultado de los centros quirales dentro de las moléculas constituyentes. La fase esméctica tiene dos grados de orden; no solamente las moléculas adoptan una orientación promedio, sino que también ellas mismas se ordenan en capas. El movimiento de los componentes prácticamente se restringe a los planos de estas capas. Este incremento en el orden, comparado con la fase nemática, exhibe un comportamiento más parecido al de un sólido (Figura 1.1.1).

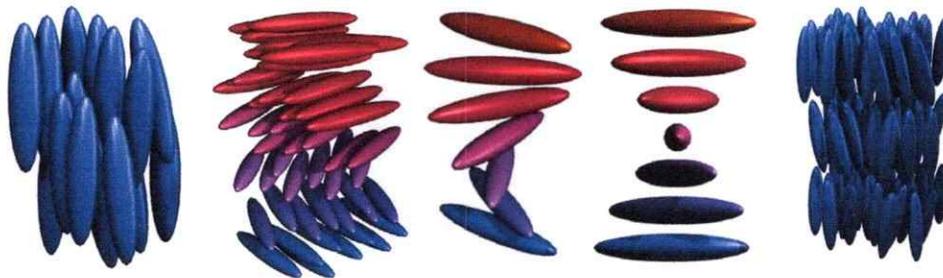


Figura 1.1.1: De izquierda a derecha: Fase nemática. Fase colestérica. Visión idealizada de la trayectoria helicoidal que siguen las capas en la fase colestérica. Fase esméctica.

Como ya lo hemos mencionado en la introducción, los cristales líquidos liótropos se forman al disolver ciertas cantidades de moléculas anfifílicas (y a veces sales) en agua, que dependiendo de su estructura y propiedades pueden generar diversos tipos de agregados moleculares, con estrecha dependencia de la temperatura, presión, y las concentraciones relativas de los diferentes componentes de la mezcla. Estos agregados moleculares constituyen la unidad básica de los cristales

líquidos liótropos.

El efecto hidrofóbico juega el papel más importante en estos sistemas²⁵. Debido a esto, especies anfifílicas, forman agregados moleculares, los cuales exponen la parte polar de su estructura ante el agua, y agrupan la estructura apolar de tal forma que no interactúa con el agua. Esto conlleva a que a distintas concentraciones de las especies anfifílicas, se logren distintos tipos de agregados moleculares. La primera estructura en formarse, es la micelar esférica. Esta se logra sobre la concentración micelar crítica (CMC), que es la mínima concentración a la cual las especies anfifílicas pueden ensamblarse o agruparse, Figura 1.1.2.

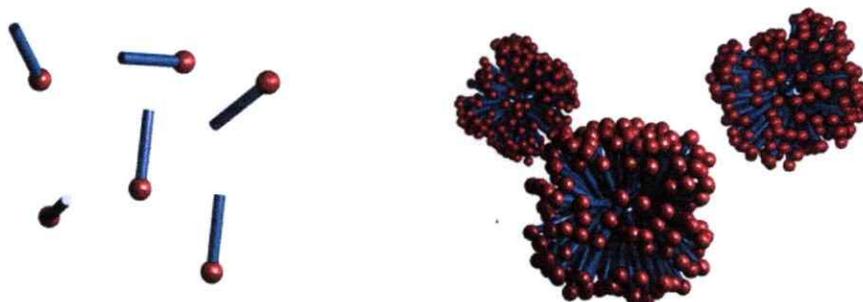


Figura 1.1.2: Izquierda: anfifilos bajo CMC. Derecha: micelas esféricas sobre la CMC, las cabezas polares (rojo) se encuentran en contacto con el agua e iones y las cadenas hidrofóbicas se encuentran hacia el interior del agregado.

Debido a que la forma de estos agregados es en promedio esférica, estas constituyen una solución micelar isotrópica. Al aumentar la concentración de especies, los agregados formados comienzan a tener un orden tridimensional, creando una solución, generalmente anisotrópica y viscosa. Se hace posible formar agregados cilíndricos empaquetados de forma hexagonal separados por agua intersticial. A diferentes concentraciones (por lo general mayores concentraciones) se establecen estructuras lamelares, las que se aproximan a bicapas lipídicas de sistemas biológicos.

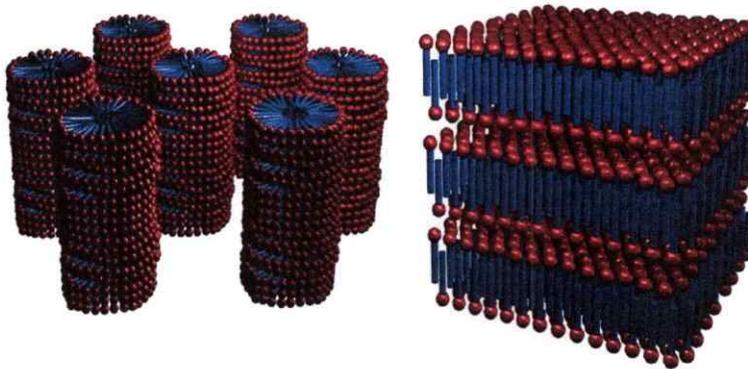


Figura 1.1.3: Izquierda: estructura de la fase hexagonal, formada por empaquetamiento de micelas cilíndricas; cada cilindro está separado del otro por agua intersticial. Derecha: estructura de la fase lamelar, formada por bicapas cuasi-infinitas; al igual que en la fase hexagonal, cada bicapas está separadas por agua intersticial.

En general, en estos tipos de agregados podemos distinguir tres regiones. La primera es la región hidrofóbica perteneciente a las cadenas hidrocarbonada de los anfifílos, donde no se encuentran moléculas de agua. La segunda parte corresponde a la región de la interfase, en donde la parte polar de los anfifílos está en contacto con las moléculas de agua, iones y otras moléculas que puedan estar en el sistema, produciéndose fuertes interacciones electrostáticas. La última región está formada por las moléculas de agua, iones, en la que podríamos llamar, la parte isotrópica del sistema, llamada región acuosa, Figura 1.1.4

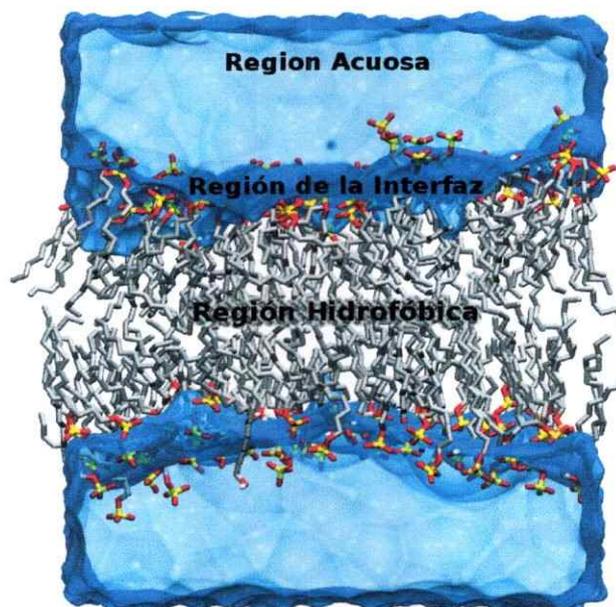


Figura 1.1.4: Regiones en un sistema de bicapa

1.2 Resonancia magnética nuclear

Toda partícula subatómica posee propiedades intrínsecas, como la masa o la carga eléctrica. Al igual que el electrón, núcleos con número cuántico de spin distinto de cero, poseen una rotación intrínseca. Estos núcleos poseen momento angular (distinto de cero), que viene dado por la resultante de los momentos angulares de espín de protones y neutrones que constituyen el núcleo. La magnitud del momento angular de espín está dada por la expresión²⁶:

$$I = [I(I+1)]^{1/2} \hbar \quad (1)$$

Donde I corresponde a la magnitud del momento angular total, I corresponde al número cuántico de espín nuclear y \hbar corresponde a la constante de Planck dividida por 2π . La proyección del momento angular sobre el eje z , I_z , viene dada por el número cuántico magnético, m_I .

$$I_z = m_I \hbar \quad (2)$$

Debido a que el núcleo es una partícula cargada, el momento angular del espín nuclear da lugar al momento magnético nuclear (al igual que el electrón) representado por el símbolo μ . Para diferenciar el estado de espín nuclear del estado de espín electrónico, adoptaremos la convención de anotar los estados de espín nuclear con el número cuántico magnético de espín nuclear m_I , que caracteriza la componente z de I . Como la componente de un vector no puede ser mayor, a lo sumo igual, a la magnitud del vector, m_I puede tomar valores que van desde $-I$ hasta $+I$, incrementando en una unidad de momento angular. Así por ejemplo, para el protón $I=1/2$ y m_I puede adoptar únicamente los valores $+1/2$ o $-1/2$ (ya que el protón posee carga opuesta al electrón, el estado de baja energía, para el núcleo, será con $m_I=+1/2$ lo que indica que está alineado con el campo magnético), Figura 1.2.1. Esto da cuenta de las dos posibles orientaciones del momento magnético del protón, cuando es sometido a un campo magnético

externo, B_0 , a lo largo del eje de aplicación o cuantización, por convención eje z. En el caso del deuterio, con $I=1$, existen 3 posibles orientaciones (estados) del espín nuclear ($m_I = -1, 0, 1$) frente a un campo magnético externo. En general, el número total de estados posibles para el espín nuclear, dados por el número cuántico magnético m_I , es conocido como multiplicidad y es determinado únicamente por I :

$$\text{Multiplicidad} = 2I + 1 \quad (3)$$

Cada uno de estos estados tiene su propio número cuántico magnético, m_I en el rango de $m_I = -I, -I+1, \dots, I-1, I$ (listado en orden decreciente de energía e incremento de estabilidad para el caso del espín nuclear).

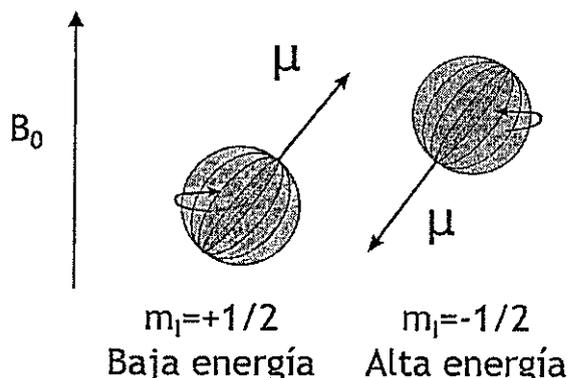


Figura 1.2.1: Dos posibles orientaciones del momento magnético (μ), de un protón girando en torno a un campo magnético externo B_0 .

Zeeman encontró que solo algunos isótopos poseían estados múltiples de espín nuclear, bajo la influencia de un campo magnético externo. Esto es debido a que solo los isótopos con un número impar de protones y/o un número impar de neutrones poseen un número cuántico de espín nuclear distinto de cero, ya que el espín de un protón solo puede ser cancelado con el espín de otro protón, pero no por el espín de un neutrón, y viceversa²⁷. Por lo tanto, núcleos con espín nuclear cero no poseen momento magnético nuclear y no pueden ser detectados por espectroscopía RMN.

El momento magnético de un núcleo es directamente proporcional a su

momento angular y la constante de proporcionalidad es conocida como la razón magnetogírica γ , que es característica para cada núcleo y corresponde al cociente entre el momento magnético y el momento angular, ecuación (4). γ describe cuanto la energía del estado de espín de un núcleo dado varia con cambios en el campo magnético externo. El momento magnético cuántico y su componente z son:

$$\begin{aligned}\vec{\mu} &= \gamma \hbar \vec{I} \\ \mu_z &= \gamma \hbar I_z\end{aligned}\quad (4)$$

Como hemos mencionado anteriormente, un núcleo con espín nuclear I adopta $2I+1$ orientaciones no degeneradas (del espín y por lo tanto del momento magnético) en presencia de un campo magnético aplicado (eje z). La energía de interacción mecano-clásica entre el momento magnético nuclear y el campo magnético externo aplicado es:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = |\mu| |B| \cos \theta \quad (5)$$

θ corresponde al ángulo formado entre los vectores de momento magnético y campo magnético aplicado. Si el campo magnético es aplicado en el eje z, la ecuación (5) se transforma en:

$$E = -\mu_z B_{0z} \quad (6)$$

La expresión mecano-cuántica para la energía de los estados de espín, E_i , es directamente proporcional al valor de m_i y a la fuerza del campo magnético B_0 :

$$E_i = -m_i \gamma B_0 \hbar \quad (7)$$

A esta separación de estados por efecto de un campo magnético es llamado efecto Zeeman nuclear. En ausencia de campo magnético externo, los estados de espín se encuentran degenerados.

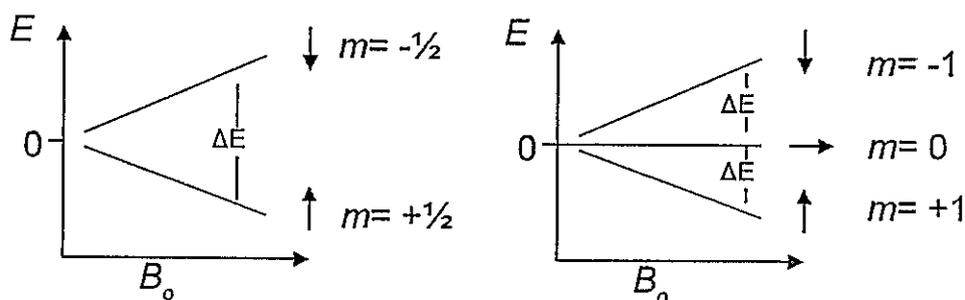


Figura 1.2.2: Efecto Zeeman nuclear. Izquierda: un núcleo con $I=1/2$. Derecha: un núcleo con $I=1$. Las flechas al lado de cada estado de espín indica la orientación del momento nuclear magnético en un campo magnético.

Debido al principio de incertidumbre de Heisenberg, el momento magnético no se alinea precisamente paralelo o antiparalelo al campo magnético, más bien, este se ve forzado a tener un cierto ángulo con el vector de campo magnético, describiendo un movimiento rotatorio en torno a la dirección del campo B_0 (eje z) a una frecuencia fija. Este movimiento es similar al de un trompo al girar, cuando su eje de rotación no es vertical. Este movimiento es conocido con el nombre de precesión. El momento magnético de un núcleo dado, solo precesará a una frecuencia angular determinada, y es llamada la frecuencia de Larmor, ω , que es función de γ y B_0 :

$$\Delta E = h\nu = h \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

$$\omega = \gamma B_0$$
(8)

Los electrones también poseen momento angular de espín y por lo tanto momento magnético. Por esta razón los electrones apantallan o desapantallan al núcleo, influyendo en su interacción con el campo magnético externo. Este fenómeno puede ser tomado en cuenta definiendo el campo magnético efectivo que actúa sobre el núcleo como:

$$B_{eff} = B_0 - B = B_0(1 - \sigma) \quad (9)$$

Donde B es el campo magnético generado por los electrones proporcional al campo magnético aplicado, y σ es la constante de proporcionalidad conocida como constante de apantallamiento.

La frecuencia angular de Larmor (ω) en unidades de radianes por segundo, puede ser transformada en frecuencia lineal, ν (recíproco de segundos o Hertz), dividiendo por 2π :

$$\nu = \frac{\gamma B_0(1 - \sigma)}{2\pi} \quad (10)$$

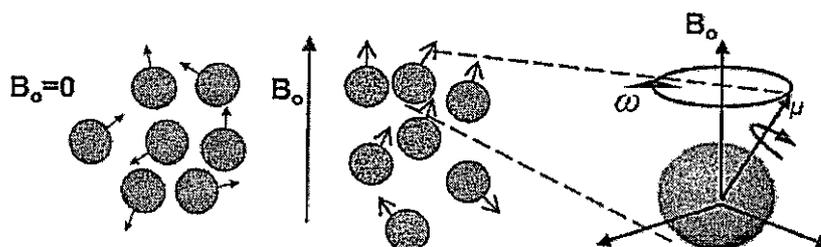


Figura 1.2.3: Efecto Zeeman. Izquierda: ilustración de la orientación al azar del momento magnético nuclear en ausencia de un campo magnético externo. Centro y Derecha: precesión del momento magnético nuclear en torno al campo magnético externo.

Importante es notar que la frecuencia de precesión es independiente de m_l , por lo que todas las orientaciones de espín de un núcleo dado precesarán a la misma frecuencia en un campo magnético fijo. Además, según el signo de γ , positivo o negativo, la dirección de precesión del espín nuclear es en el sentido o contra el sentido de los punteros del reloj (convención).

Cuando una partícula absorbe energía, la de un fotón, la energía asociada con la radiación electromagnética modifica las poblaciones de los estados de las partículas. En equilibrio térmico, ambos niveles (cuando $l=1/2$) están similarmente poblados, con un pequeño exceso de núcleos en el estado de menor energía ($m=+1/2$ o α)²⁸. En el caso del protón, existen dos estados de espín, $|\alpha\rangle$ ($+1/2$) y $|\beta\rangle$ ($-1/2$). La

energía absorbida por el protón causa una transición del estado de espín con menor energía al de mayor energía, Figura 1.2.4. En equilibrio, la población de núcleos se distribuye en los distintos estados de espín según la ley de distribución de Boltzmann. Este exceso de población en estado α , es el origen del vector de magnetización macroscópico (resultante de la suma vectorial de todos los momentos magnéticos individuales), M_z , cuya orientación está sobre el mismo eje z del campo magnético aplicado, por lo que no posee componentes en el plano x,y. Si ahora, aplicamos un pulso de radiofrecuencia o radiación electromagnética, en la práctica un campo magnético B_1 , perpendicular a B_0 , circularmente polarizado en el plano xy, oscilando exactamente a la misma frecuencia de los momentos magnéticos nucleares del sistema, provocará que estos se sitúen en fase (se enfoquen) y que M_z salga del eje z para formar un ángulo φ (esto es causado por el desequilibrio de las poblaciones de los estados de espín producido por B_1). El ángulo es determinado por la energía y duración de B_1 . Esto provoca la presencia de componentes en el plano x,y provenientes de M_z , Figura 1.2.4.

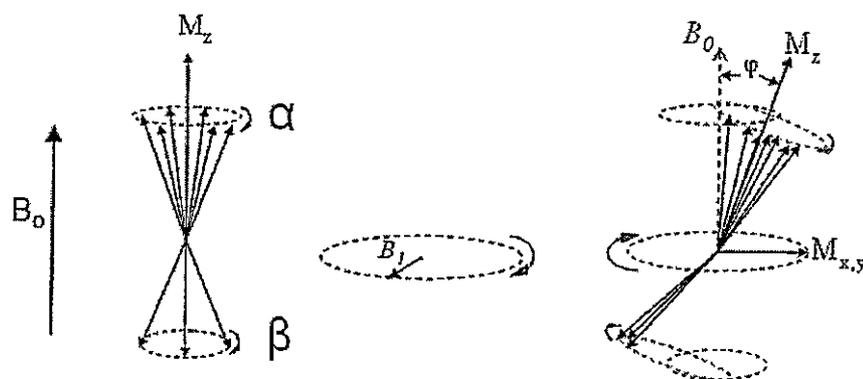


Figura 1.2.4: Precesión de un grupo de espín con $I=1/2$ alrededor de un campo magnético externo. M_z es la suma de todos los vectores individuales de momento magnético. Izquierda: instante antes de la exposición a B_1 . Centro: orientación del campo magnético B_1 . Derecha: durante la exposición con B_1 .

El retorno al equilibrio por parte de los espines nucleares, luego de suspender B_1 , está gobernado por una recuperación exponencial (ecuación (11)) caracterizado por el valor de T_1 , que determina el tiempo que tarda M_z en retornar a su posición de equilibrio después de haber aplicado el pulso de radiofrecuencia (B_1). Este proceso es denominado relajación longitudinal y la evolución de las poblaciones se

ajusta a la siguiente expresión²⁷:

$$\frac{P_{eq} - P_t}{P_{eq} - P_0} = e^{\frac{-t}{T_1}} \quad (11)$$

P_{eq} es la población en equilibrio de un estado dado, por ejemplo $m=+1/2$. P_t es la población del estado a un tiempo t . P_0 es referida a la población en el tiempo 0, por tanto P_{eq} es la población a $t=\infty$.

Después que la irradiación se suspende y B_1 desaparece, no solo las poblaciones de $m=+1/2$ y $m=-1/2$ regresan a la distribución de Boltzmann en equilibrio térmico, además, los momentos nucleares individuales comienzan a perder su coherencia de fase y retornan de una forma al azar alrededor del eje z. Este último proceso es llamado relajación transversal y causa el decaimiento o desfase de $M_{x,y}$ hasta su valor de equilibrio, 0.

Es importante mencionar algunos mecanismos de relajación del grupo de núcleos magnéticos luego del pulso de radiofrecuencia. Los mecanismos de relajación pueden causar dos tipos de efectos; el primero es causado por transiciones entre estados de espín que implican transferencia de energía entre el sistema de espines y su entorno ("la red") y el segundo es causa de modificaciones de las diferencias de energía entre los estados que afectan a las frecuencias de precesión, pero no implican cambios en las poblaciones y por tanto no suponen una transferencia neta de energía entre el sistema de espines y su entorno. Estas contribuciones se denominan adiabáticas (Figura 1.2.5).

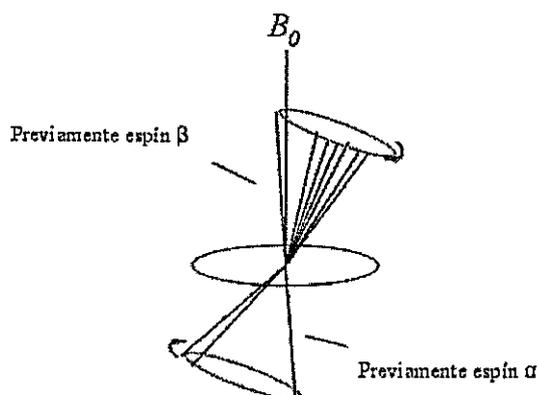


Figura 1.2.5: Un espín α (\uparrow) intercambia espontáneamente energía con un espín β (\downarrow). De esta forma, el espín α es convertido a un espín de alta energía β y viceversa, sin cambio neto de energía. Repeticiones de este proceso con otros pares de espín, tendrán el efecto de aleatorizar la coherencia de fase, llevando a cero la componente x,y ($M_{x,y}$) de M_z .

Si imaginamos un campo magnético fluctuante arbitrario en la posición del núcleo de interés, las fluctuaciones perpendiculares al campo magnético externo son las responsables de las transiciones entre estados, mientras que las fluctuaciones paralelas a dicho campo son las que proporcionan la contribución adiabática.

Las contribuciones adiabáticas dan lugar a la pérdida de coherencia dentro de un conjunto de espines y conduce a la relajación transversal pero no contribuye a restituir la distribución de Boltzmann. La pérdida de coherencia entre los espines también puede ser causada por transiciones esporádicas entre estados. Así como un pulso de radiofrecuencia sobre una muestra en equilibrio "sincroniza" el inicio de la precesión de todos los espines afectados, las transiciones esporádicas causadas por relajación "interrumpen" la precesión de forma aleatoria para los distintos espines de la muestra y dan lugar a la pérdida de coherencia de fase. En general, tendremos siempre que la velocidad de relajación transversal será siempre mayor o igual que la de la relajación longitudinal.

El origen de las interacciones fluctuantes puede encontrarse en el movimiento global de la molécula en la que se encuentre un determinado espín o en cambios en

su entorno local causados por movimientos internos producto de la agitación térmica de las moléculas en torno al núcleo. Como resultado de estos movimientos se generan pequeños campos magnéticos que perturban la interacción entre los núcleos magnéticos y B_0 . En otras palabras estos movimientos generan fluctuaciones locales del campo magnético experimentado en el núcleo con componentes perpendiculares a B_0 oscilando a la frecuencia de Larmor, induciendo el proceso de relajación, después de haber aplicado B_1 .

Estos movimientos son principalmente rotacionales, los que producen las fluctuaciones que relajan a los núcleos. Esta distribución de frecuencias que contiene componentes que oscilan a la frecuencia de Larmor (produciendo relajación), es denominada densidad espectral.

Para sistemas rígidos, las fluctuaciones que dan lugar a relajación provienen esencialmente de la reorientación de la molécula respecto al campo magnético externo. Contribuirán a la relajación aquellas interacciones que posean una dependencia angular. Para núcleos con espín $\frac{1}{2}$ los mecanismos de relajación más importantes son la interacción dipolo-dipolo y la anisotropía de apantallamiento químico.

El acoplamiento dipolar ocurre entre dos dipolos magnéticos a través del espacio. Como los núcleos alrededor del núcleo en estudio, están en constante movimiento (rotación y traslación), los campos magnéticos locales debido a los momentos magnéticos, también oscilarán a cierta frecuencia. Cuando la frecuencia de estos movimientos es comparable a la frecuencia de precesión de los núcleos en estudio, ellos pueden intercambiar energía sin cambio neto (Figura 1.2.5). Pero si estos núcleos no son idénticos, habrá un cambio neto de energía que acompañe el intercambio. Es decir, o se entregará energía a los núcleos del sistema (si el núcleo en cuestión pasa a un estado de baja energía) o se absorberá energía de los núcleos del sistema (si el núcleo en cuestión pasa de un estado de baja energía a uno de alta energía)²⁸. Este intercambio continúa a una razón gobernada por T_1 hasta que el equilibrio es restablecido. El mecanismo dipolo-dipolo anterior para la relajación

del espín con su entorno depende de las interacciones de los núcleos en estudio con el campo magnético B_l de los núcleos del sistema con momento magnético μ_l . La magnitud de B_l esta dada por la ecuación:

$$B_l = \frac{\mu_l(3 \cos^2 \theta - 1)}{r^3} \quad (12)$$

Donde θ es el ángulo formado entre eje del campo magnético externo B_0 y el vector r que conecta a los dos núcleos. Esta ecuación da cuenta que la relajación nuclear se incrementa mientras mayor sea μ_l y mientras mas cercanos estén los dipolos magnéticos (los núcleos con $I=1/2$), ya sea en la misma molécula (intramolecular o con su entorno, intermolecular).

Como hemos mencionado anteriormente, los campos electromagnéticos generados por los movimientos de rotación y traslación de los núcleos y electrones del sistema, son importantes a la hora de producir relajación. Estos no pueden ser muy rápidos ni muy lentos. Es común expresar la frecuencia de este tipo de movimientos en términos del llamado tiempo de correlación τ_c . Si la frecuencia angular rotacional es ω (en radianes por segundo) el tiempo de correlación rotacional será $1/\omega$, el tiempo requerido para una molécula (o parte de una molécula) rotar en 1 radian. Similarmente, el tiempo de correlación rotacional puede ser igualado al tiempo requerido para que una molécula se mueva a una distancia igual a un diámetro molecular. En ambos casos τ_c es una medida del promedio del tiempo que pueden permanecer dos dipolos magnéticos en una apropiada orientación para que puedan interactuar. T_1 es una función de τ_c de la siguiente forma (suponiendo que la correlación rotacional es exponencial):

$$\frac{1}{T_1} \propto \frac{\tau_c}{1 + (2\pi\nu_0\tau_c)^2} \quad (13)$$

Donde ν_0 es la frecuencia de Larmor del núcleo en estudio (por ejemplo ^1H). Esta ecuación nos dice que si el movimiento molecular es demasiado rápido (cuando $1 \gg (2\pi\nu_0\tau_c)^2$), $1/T_1$ es proporcional a τ_c . Es decir, cuando el tiempo de correlación

aumenta (movimiento molecular lento), el tiempo de relajación disminuye (el ritmo de la relajación se incrementa). Recíprocamente, para movimiento molecular lento (cuando $1 \ll (2\pi \nu_0 \tau_c)^2$), T_1 es directamente proporcional a τ_c . El mínimo de T_1 y donde se alcanza la mayor eficiencia en la relajación es cuando $\tau_c = (2\pi \nu_0)^{-1}$.

La liberación de energía por parte de los núcleos en relajación se manifiesta como un voltaje que decae a cero en el tiempo. Este decaimiento se conoce como “*free induction decay*” (FID), o decaimiento inducido libre; decaimiento hacia el equilibrio, inducido genera un voltaje en la bobina, libre de la influencia de la radiofrecuencia. Este observable es una señal generada por la magnetización de los espines de los núcleos que se encuentran fuera del equilibrio precesando alrededor del campo magnético B_0 . Como vimos, esta magnetización es generada por B_1 . Las componentes x,y del vector de magnetización macroscópica inducen un voltaje en una bobina que rodea a la muestra. Este voltaje en función del tiempo es digitalizado y el análisis de las frecuencias se realiza a través de la transformada de Fourier. Este procedimiento matemático consiste en transformar una función $f(x)$ al espacio inverso de la variable original. Como tiempo y frecuencia son variables inversas, la transformada de Fourier de la FID genera el espectro de frecuencias de RMN.

El método para medir T_1 es conocido como “*inversion-recovery sequence*” (secuencia de inversión-recuperación) y radica en una serie de pulsos de radiofrecuencia dados por la bobina que genera el campo magnético B_1 . Esta misma bobina recibe la corriente generada por el decaimiento al valor cero, de las componentes xy de la magnetización macroscópica.

Consiste en aplicar un primer pulso lo bastante largo, que rote el vector de magnetización microscópica, desde la posición de equilibrio en el eje z en 180° , al eje -z. Si el pulso es perfecto M_z será exactamente $-M_z$ y no habrá componentes en el plano xy y por lo tanto no se recibirá señal en la bobina emisora/receptora. No podemos ver de forma directa el efecto del pulso de 180° o π . Una vez que cesa el pulso de 180° , la magnetización $-M_z$ vuelve al equilibrio, $+M_z$, sin generar

componentes en el plano xy . Si queremos monitorear la relajación de la magnetización, debemos causar una componente en el plano xy . Esto se consigue mediante un segundo pulso de 90° (o $\pi/2$), que rotara la magnetización desde cualquiera de los ejes, z o $-z$, al plano xy , produciendo la señal. El pulso de 180° y 90° están separados por una variable de tiempo t , sobre la cual tenemos control.

La secuencia puede ser escrita como:

$$180 - t - 90^\circ - \text{adquisición de señal (FID)}$$

Si esperamos un tiempo del orden de 5 veces T_1 entre π y $\pi/2$, el sistema retornara al equilibrio cuando el pulso de $\pi/2$ es aplicado. La intensidad de la señal, I_0 , debería ser la misma como si el pulso de 180° no hubiese sido aplicado. Si esperamos un tiempo más corto T_1 , M_z posiblemente estará a lo largo de $-z$ antes del segundo pulso, y la señal detectada por la bobina receptora, aparecerá invertida en el espectro. El experimento es repetido varias veces, cada uno con distinto tiempo t entre cada pulso. La exponencial de recuperación de M_z tiene la forma²⁶:

$$A_t = A_0 \left(2 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \quad (14)$$

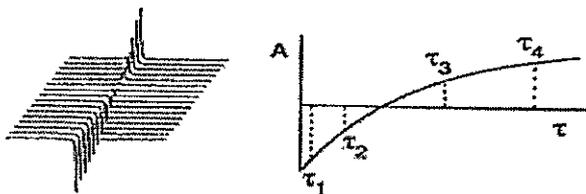


Figura 1.2.6: Izquierda: serie de espectros obtenidos para el cálculo de T_1 . Cada pick representa una secuencia de pulso. Derecha: gráfica de los máximos de cada pick de la serie de espectros.

1.2.1 Interacción Cuadrupolar

Los núcleos que poseen número cuántico de espín nuclear mayor o igual a 1, poseen momento cuadrupolar eléctrico. Este es un parámetro que describe la forma del elipsoide de distribución de la carga nuclear. Un momento cuadrupolar Q , distinto de cero, indica que la distribución de carga no es esféricamente simétrica. Por convención, el valor de Q es positivo si el elipsoide posee forma de prolato y negativo si tiene forma de oblato²⁶.

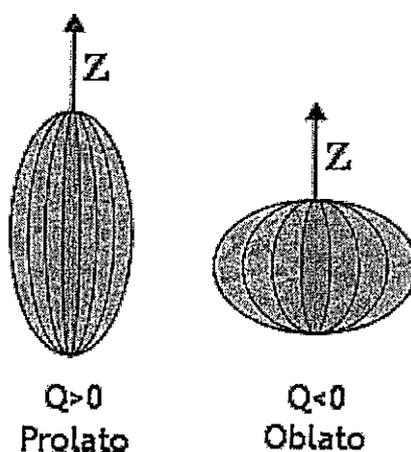


Figura 1.2.7: Representación de la distribución de carga nuclear

Un cuadrupolo eléctrico interactúa con una gradiente de campo eléctrico, debido a la distribución de cargas que lo rodean. Para el deuterio ($I=1$), en un enlace C-D del tipo sigma, la gradiente de campo eléctrico esta provista por los electrones del enlace formado entre el deuterio y un átomo, por ejemplo el carbono. La gradiente es prácticamente colineal con el enlace σ entre los dos átomos. La interacción cuadrupolar depende del promedio de un ángulo θ formado por la gradiente de campo eléctrico y el campo magnético B_0 , z por convención.

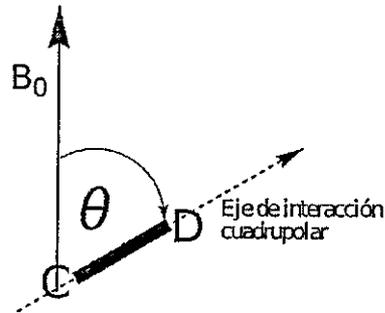


Figura 1.2.8: Un cuadrupolo eléctrico interactúa con un gradiente de campo eléctrico. Para el deuterio ($I=1$), el gradiente es provisto por los electrones del enlace carbono-deuterio

En un medio anisotrópico, las transiciones entre $m_I=1$ y $m_I=0$ y entre $m_I=0$ y $m_I=-1$ no son energéticamente iguales lo cual se manifiesta en el espectro como la aparición de dos señales. La separación entre estas dos señales se conoce como desdoblamiento cuadrupolar $\Delta\nu_Q$. El desdoblamiento de la señal es debido a que la energía total depende de dos factores (a) la interacción Zeeman (E_z) y (b) la energía de interacción cuadrupolar:

$$E_z^{m_I} = -m_I \gamma \hbar B_0 \quad (15)$$

$$E_{Q(m_I)} = \frac{\hbar \omega_Q (3 \cos^2 \theta - 1)(m_I^2 - a/3)}{4} \quad (16)$$

En un medio isotrópico, las moléculas poseen libre rotación por lo que el ángulo θ está presente, con igual probabilidad, en todas direcciones por lo que el valor $\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle$ es igual a cero y la energía depende solo del término E_z por lo que aparece solo una señal en el espectro. Si la molécula está en un medio anisotrópico, la energía E_Q no promedia a cero. Si evaluamos la diferencia entre los niveles energéticos para $m = -1, 0, 1$ tenemos entre $+1$ y 0

$$E_T^0 = E_z + E_Q = -\gamma \hbar B_0(0) + K((0)^2 - 2/3) = -2/3K \quad (17)$$

Entre $m_I = 0$ y $m_I = +1$

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 - K \quad (18)$$

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 + K \quad (19)$$

Donde K es igual a:

$$K = \frac{\hbar \omega_Q (3 \cos^2 \theta - 1)}{4\pi} \quad (20)$$

Lo que conlleva a un desdoblamiento de la señal que se conoce como desdoblamiento cuadrupolar.

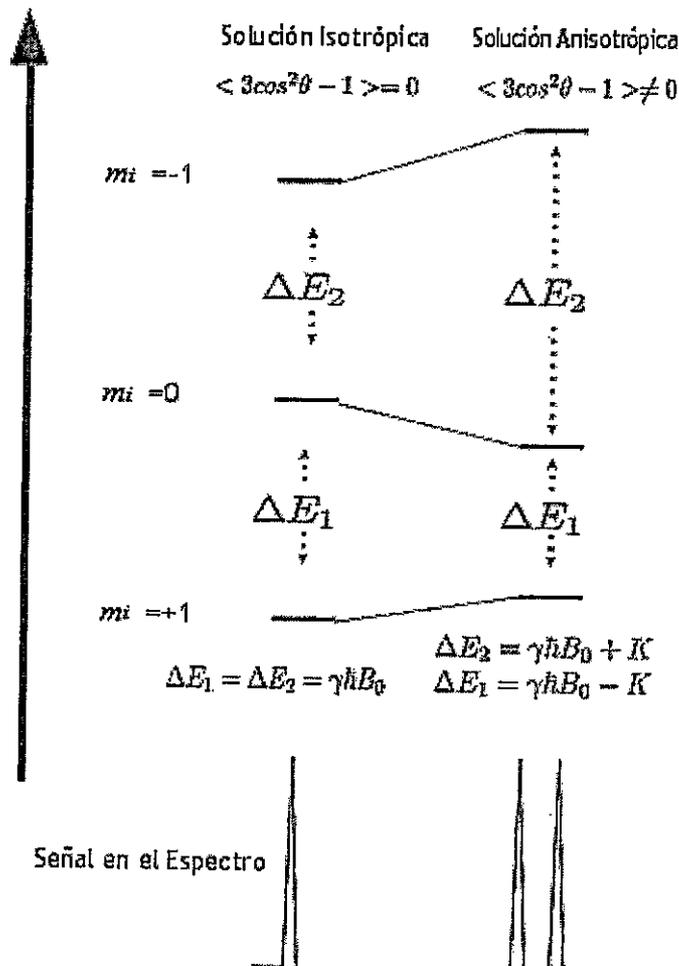


Figura 1.2.9: Esquema del desdoblamiento de la señal de RMN de un núcleo cuadrupolar, por ejemplo $2H$ en un medio anisotrópico.

1.3 Simulaciones computacionales

El desarrollo de los computadores, a partir de la década de los años 50 ha permitido aplicar la computación a la resolución de problemas científicos muy complejos. El objetivo de la simulación computacional empleando dinámica molecular es resolver numéricamente las ecuaciones involucradas en modelos teóricos relacionados con la problemática en estudio. En el ámbito de la física, las simulaciones computacionales, fueron usadas en sus inicios por Metropolis y col.²⁹ para tratar sistemas de muchos cuerpos. En el caso de la química, la simulación computacional nos permite modelar sistemas moleculares pequeños ocupando modelos teóricos complejos basados en la aplicación de la mecánica cuántica, y por otra parte, también es posible modelar sistemas moleculares complejos conformados por miles de átomos, usando modelos teóricos más simples, basados en las leyes de la mecánica clásica. Además se han desarrollado metodologías que permiten emplear una mezcla de ambas formulaciones. La simulación computacional se ha constituido en una herramienta de cálculo esencial, tanto para experimentalistas como para teóricos. Mediante un buen modelo computacional no sólo se pueden reproducir experimentos de laboratorio, sino que además, gracias a que se pueden variar libremente los parámetros usados, permite probar (o falsear) modelos teóricos existentes en rangos de parámetros imposibles de alcanzar experimentalmente por ahora, resolviendo así conflictos entre explicación teórica y observación. Un papel fundamental también lo juega hoy día la visualización de los resultados obtenidos. No solo se obtienen datos numéricos que pueden ser contrastados con los experimentos, sino también una imagen gráfica del proceso en cuestión.

Así, se han logrado estudiar sistemas altamente complejos, como es el caso de estudios de estructura de proteínas en disolución y su interacción con bicapas lipídicas³⁰, así como también, estudios de sistemas líquido-cristalinos³¹.

1.3.1 Mecánica Molecular

La mecánica molecular utiliza las leyes de la física clásica para predecir estructuras y propiedades moleculares. Este método está caracterizado por:

1. Un campo de fuerza (FF) particular, compuesto por un conjunto de ecuaciones que define como varía la energía potencial con la posición de los átomos en el espacio.
2. Una serie de átomos tipo que definen las características de un elemento en un contexto químico específico. Por ejemplo, el átomo de carbono en un carbonilo es tratado de diferente forma al átomo de carbono enlazado a tres hidrógenos. Por tanto, el tipo de átomo depende de su hibridación, carga y naturaleza de los átomos a los que se encuentra enlazado.
3. Un conjunto de parámetros que ajustan las ecuaciones y tipos de átomos a ciertos datos experimentales. Estos parámetros están definidos como *constantes de fuerza*, las cuales dan los valores utilizados en las ecuaciones que relacionan las características atómicas con las componentes de energía y la data estructural como longitudes y ángulos de enlace.

El campo de fuerza gobierna tanto las interacciones enlazantes (como estiramientos de enlace, ángulos de enlace y ángulos de torsión) como las no enlazantes (interacciones electrostáticas y de van der Waals) de los átomos constituyentes del sistema. La mecánica molecular ignora la existencia de los electrones pero está optimizada en el cálculo basado en la forma de la función potencial de los enlaces químicos y en las distintas interacciones de pares no enlazantes. Es decir, los efectos electrónicos se encuentran implícitos en los campos de fuerza. La energía del sistema se calcula en función solo de la posición nuclear de los átomos. Esto hace que sea muy eficiente computacionalmente, al solo contemplar el término de energía potencial, y pueda ser utilizada para hacer cálculos en moléculas muy grandes, pero no da ninguna información del detalle de

la distribución electrónica del sistema, ni de propiedades que dependan del movimiento molecular al no contemplar el término de energía cinética del sistema.

La Mecánica Molecular se basan en un modelo simple que describe todas las interacciones dentro del sistema, a través de una función potencial. La función que se usa para describir la energía potencial del sistema tiene la siguiente forma:

$$\begin{aligned}
 V(r^N) = & \left\{ \sum_{\text{Enlaces}} \left(\frac{k_i}{2} (r_i - r_i^0)^2 \right) + \sum_{\text{Angulos}} \left(\frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_i^0)^2 \right) \right. \\
 & \sum_{\text{Impropios}} (k_i (\epsilon_i - \epsilon_i^0)^2) + \sum_{\text{Torsiones}} \left(\frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))^2 \right) \\
 & \left. + \left(\sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \right) + \left(\sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right) \right\} \quad (21)
 \end{aligned}$$

$V(r^N)$ corresponde a la energía potencial del sistema en función de las posiciones (r) de las N partículas. Un esquema presentado por las siguientes figuras muestra cada una de las interacciones del potencial $V(r^N)$.

El primer término de la ecuación representa la interacción entre pares de átomos enlazados. Ésta interacción, una por cada enlace, esta modelada por una función potencial armónica cuya variable es la longitud de enlace, r_{ij} , con respecto a la posición de equilibrio, r_i^0 .

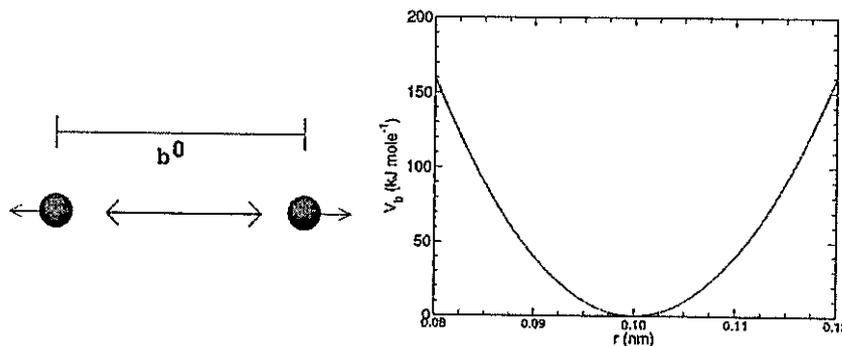


Figura 1.3.1: Extensión del enlace vs. Energía Potencial.

El segundo término corresponde a la variación de los ángulos entre tres átomos

con respecto a la posición de equilibrio (θ_i^0). Se considera la suma de las energías potenciales para la deformación de cada ángulo de enlace en la molécula.

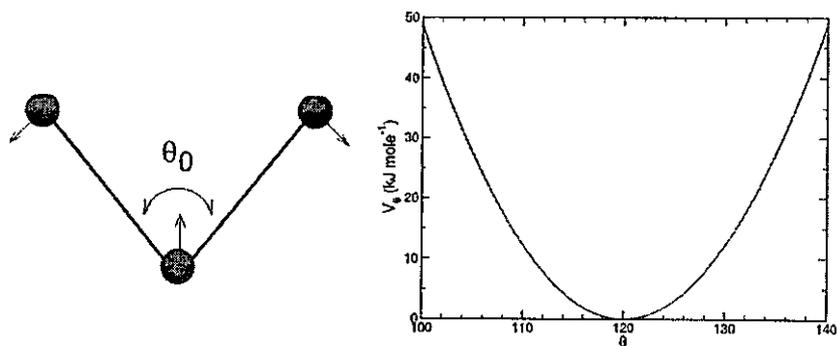


Figura 1.3.2: Vibración angular entre tres átomos contiguos y la representación de su potencial.

El tercer término describe las variaciones en los ángulos diédricos impropios o deformaciones fuera del plano, presentes en los átomos con hibridación sp^2 de la molécula, a través de un potencial armónico. Mantienen grupos de átomos con hibridación sp^2 , como anillos aromáticos y otros, en el plano. También se utiliza en la descripción de moléculas quirales, para prevenir que cambien a su imagen especular.

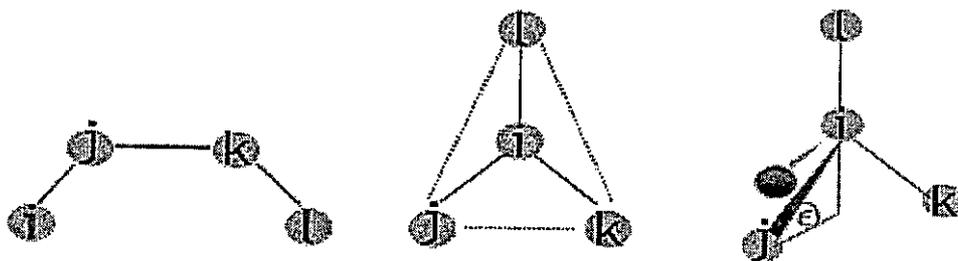


Figura 1.3.3: Principio de ángulo diédrico impropio (o torsión fuera del plano). Izquierda: torsión fuera del plano para un anillo. Centro: sustituyentes, por ejemplo, para un anillo. Derecha: fuera del plano para un tetraedro. El ángulo impropio se define como el ángulo entre los planos (i, j, k) y (j, k, l) en todos los casos.

El cuarto término corresponde a los ángulos diédricos propios, con la definición usual para un ángulo de torsión y representados por potenciales periódicos dados por series de Fourier. Esto es la suma sobre todos los pares de átomos alrededor del enlace $i-j$ en una secuencia de cuatro átomos $i-j-k-l$. Por ejemplo, para el etano

$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_3$, cada hidrógeno en el carbono de la izquierda tiene una relación 1-4 con cada uno de los hidrógenos en el carbono de la derecha. El parámetro n , en la función que describe las torciones, presente en la ecuación (21), determina la periodicidad. Por ejemplo, $n=1$ describe una rotación que es periódica en 360° , cuando $n=2$ la periodicidad es en 180° , y así sucesivamente. V_n determina el tamaño de la barrera rotacional alrededor del enlace i - j y depende del tipo de los átomos. γ determina el ángulo de mínimo energía.

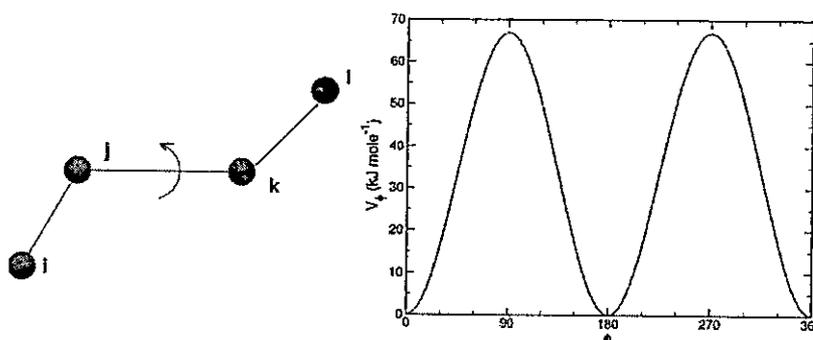


Figura 1.3.4: diédrico propio (en forma trans) y la representación de su potencial.

El quinto y sexto término corresponde a las interacciones no enlazantes del tipo electrostática y van der Waals, respectivamente, para cada par de átomos no enlazados presente en el sistema. El término electrostático se toma como suma de las interacciones electrostáticas que involucran todos los pares de átomos excepto los pares con relaciones de un enlace entre dos átomos adyacentes y dos enlaces entre átomos que forman un ángulo. Este potencial se calcula usando la expresión de la energía de interacción electrostática (coulómbica) donde ϵ_0 es la constante dieléctrica del medio y r_{ij} es la distancia entre los átomos. El término de van der Waals es la suma de la atracción debida a las fuerzas de dispersión de London y de repulsión de Pauli. Los campos de fuerza calculan el potencial de van der Waals utilizando el potencial de Lennard-Jones 12-6, donde σ_{ij} es el parámetro de colisión

(la separación para la cual la energía es cero), ϵ_{ij} el mínimo de potencial. El término de repulsión es proporcional a r_{ij}^{12} y el término atractivo es proporcional a r_{ij}^{-6} ^{32,33}. Las interacciones de van der Waals y electroestáticas entre átomos con una relación 1-2 y 1-3 se consideran incluidas en forma implícitamente en los parámetros de estiramiento y ángulos (deformación).

La mecánica molecular nos permite calcular propiedades físicas microscópicas como por ejemplo la estructura espacial de una molécula en un medio minimizando la energía de un sistema. Sin embargo para obtener propiedades dinámicas, como por ejemplo viscosidad de líquidos, procesos de difusión en membranas o tiempos de relajación, es necesario introducir la variable tiempo. La Dinámica Molecular es capaz de proveer información acerca de propiedades dinámicas de los sistemas moleculares.

1.3.2 Dinámica Molecular

Dinámica Molecular (DM), a diferencia de la mecánica molecular, es una técnica de simulación dependiente explícitamente del tiempo, al contemplar no solo la energía potencial, si no que además la energía cinética del sistema, en la que se permite que átomos y moléculas interactúen y modifiquen sus posiciones por un cierto periodo de tiempo. En general, los sistemas moleculares son complejos y consisten de un gran número de partículas, por lo cual, en la práctica, sería imposible encontrar sus propiedades de forma analítica. Para evitar este problema, utiliza métodos numéricos. Representa un punto intermedio entre los experimentos y la teoría, y puede ser entendida como un experimento en la computadora.

En DM, las configuraciones sucesivas del sistema son generadas por la integración de las leyes del movimiento de Newton. El resultado es una trayectoria que especifica como las posiciones y las velocidades de una partícula en el sistema varían con el tiempo. Recordando las leyes de Newton, tenemos que:

1. Un cuerpo sigue avanzando en línea recta a velocidad constante a menos que una fuerza actúe sobre este
2. Fuerza es igual al cambio en el momento lineal con respecto al tiempo
3. Para toda acción hay una reacción igual y opuesta

El método de Dinámica Molecular resuelve la ecuación de movimiento de Newton (segunda ley de Newton) para un sistema de N átomos interactuantes, obteniendo de esta forma la trayectoria o configuraciones sucesivas del sistema en el tiempo:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i \quad i=1 \dots N \quad (22)$$

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

$$F_i = -\nabla V(r) = -\left(i \frac{\partial V}{\partial x} + j \frac{\partial V}{\partial y} + k \frac{\partial V}{\partial z}\right) \quad (23)$$

Sabiendo las coordenadas y velocidades iniciales de las partículas del sistema, se calculan las fuerzas experimentadas por cada partícula en el sistema, y resolviendo la ecuación diferencial de segundo orden de la segunda ley de Newton con respecto al tiempo, obtenemos nuevas posiciones y con ellas nuevas fuerzas y luego, nuevas posiciones y fuerzas, y así sucesivamente. Este conjunto de datos de coordenadas en el tiempo es llamado trayectoria. Con esta información podemos calcular, para el sistema, propiedades tanto en equilibrio como dependientes del tiempo.

1.3.3 Trayectoria

La trayectoria contiene toda la información del sistema. Para realizar la integración numérica y así generar las trayectorias, el paquete de programas GROMACS ocupa el algoritmo de Leap-Frog³⁴. Este usa las posiciones r a tiempo t y, debido a que la integración es numérica, para calcular la aceleración, primero calcula las velocidades v a tiempo $t-\Delta t/2$. Este último paso actualiza las posiciones y velocidades usando F_i determinado por las posiciones a tiempo t :

$$v_{(t+\frac{\Delta t}{2})} = v_{(t-\frac{\Delta t}{2})} + \frac{F(t)}{m} \Delta t \quad (24)$$

$$r_{(t+\Delta t)} = r_{(t)} + v_{(t+\frac{\Delta t}{2})} \Delta t \quad (25)$$

Se calcula primero $v_{(t+\frac{\Delta t}{2})}$ a partir de las velocidades $v_{(t-\frac{\Delta t}{2})}$ y la aceleración a tiempo t . Las posiciones $r_{(t+\Delta t)}$ son deducidas a partir de las velocidades simplemente calculado junto con las posiciones a un tiempo $r(t)$. La velocidad a tiempo t se puede calcular como:

$$v_{(t)} = \frac{1}{2} [v_{(t-\frac{\Delta t}{2})} + v_{(t+\frac{\Delta t}{2})}] \quad (26)$$

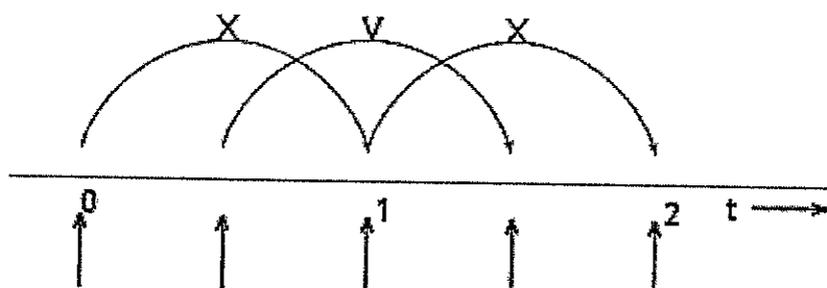


Figura 1.3.5: Esquema del Método de integración de Leap-Frog. Cálculo de

$v_{(t-\frac{\Delta t}{2})}$ y $r_{(t+\Delta t)}$ en un desfase de tiempo igual a $\frac{\Delta t}{2}$.

1.3.4 Condiciones de borde periódico

El mayor obstáculo de una simulación es la gran fracción de moléculas que se encuentran en los bordes o superficies del sistema. Dado que el sistema a simular, en una DM, está encerrado en una caja tridimensional, la razón entre el número de moléculas en los bordes de la caja y en el seno de la solución es mucho mayor que en la situación experimental. Coloquemos como ejemplo un vaso precipitado de agua donde la razón entre el número de moléculas que interactúan con las paredes (o bordes) del vaso es mucho menor que en el interior. De esta forma la contribución a la energía de las fuerzas que las moléculas experimentan con la pared del vaso se vuelven despreciables, no así en un cálculo de dinámica molecular. El problema del efecto de la superficie puede ser superado implementando condiciones de borde periódico (CBP). La caja cúbica es replicada a través del espacio, en las tres dimensiones. En el transcurso de la simulación, una molécula que se mueve en la caja original, tendrá una imagen periódica que se mueve en la misma dirección en las cajas vecinas virtuales. Así, una molécula que se mueve fuera de la caja original del sistema, una de sus imágenes entrará a través del lado opuesto de la cara de la caja. No hay paredes en la caja central bajo CBP, y por lo tanto no existen moléculas en superficie. La Figura 1.3.6 muestra un esquema de CBP. Una molécula de SDS con sus imágenes periódicas; si esta se mueve a través del borde, sus imágenes también se mueven a través de sus correspondientes bordes. Por lo tanto, la densidad de la caja central se mantiene constante.

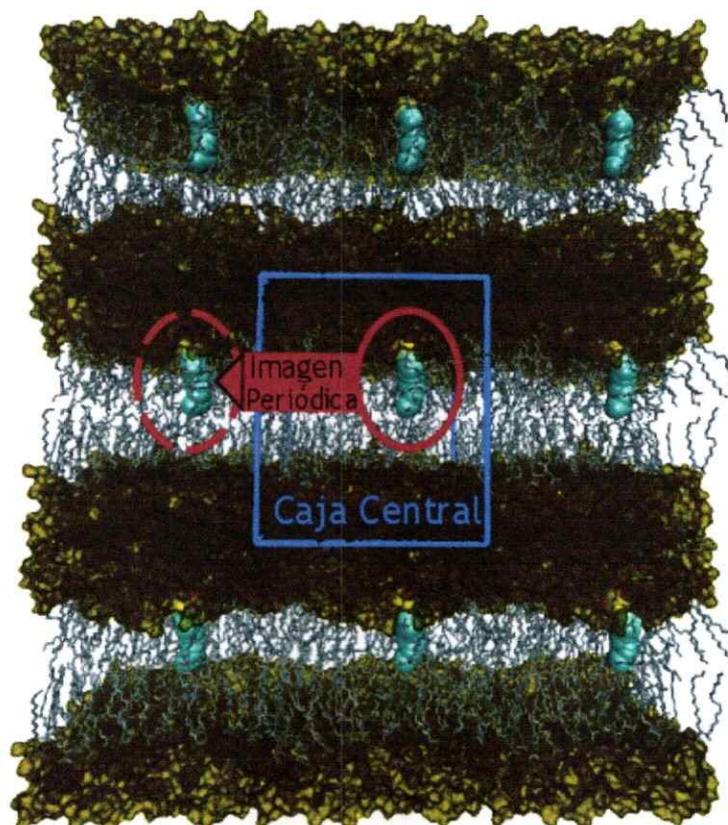


Figura 1.3.6: Representación tridimensional de CBP. Moléculas pueden entrar y dejar cada caja a través de cada borde. La densidad de la caja central no cambia.

1.3.5 Análisis de Resultados

GROMACS trae implementado una serie de programas con los cuales podemos extraer información de la trayectoria obtenida empleando dinámica molecular. A continuación explicaremos en breve algunas de las herramientas más usadas para explicar fenómenos de distribución de las moléculas en el sistema y asociaciones debidas a afinidad electroestática.

1.3.5.1 Densidad de Masa

El paquete de programas GROMACS nos permite calcular la densidad de masa de cada especie a lo largo del eje z de la caja, con lo cual podemos tener la distribución de las moléculas en el sistema y ver como se agrupan entre ellas. El eje z es el eje normal a la bicapa. La caja del sistema se divide en secciones perpendiculares al eje z y se calcula la densidad de masa de las moléculas del sistema, en cada una de estas capas.

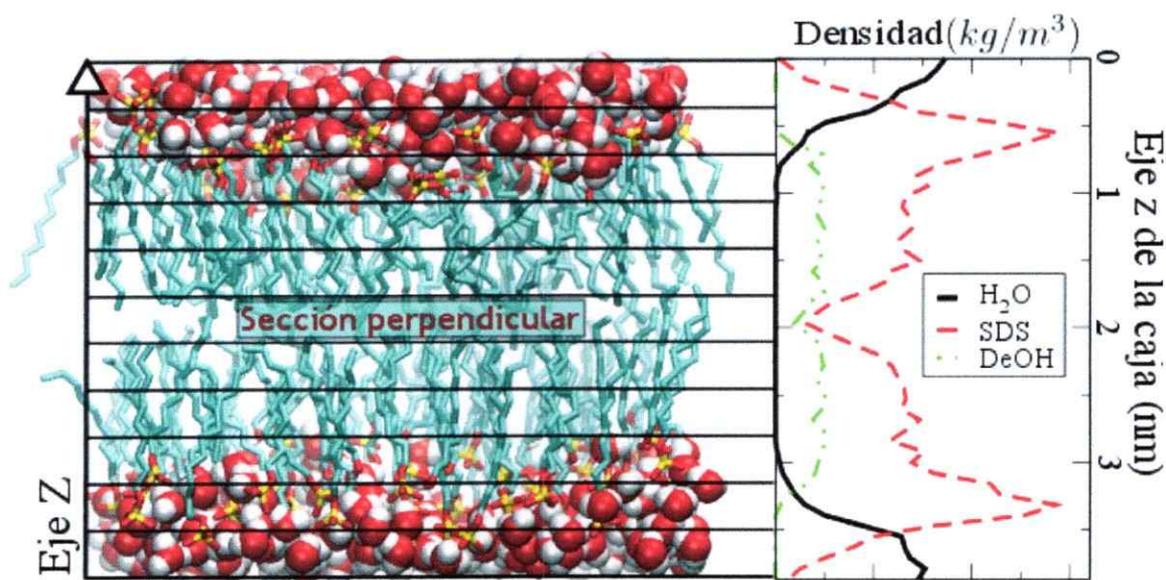


Figura 1.3.7: Izquierda: Representación gráfica del número de cortes en la caja de simulación en el cálculo de densidad de masa en GROMACS. La moléculas de agua están representadas por dos esferas blancas (hidrogeno) y una roja (Oxigeno). Derecha: perfil de densidad de masa para Agua (H_2O), Dodecilsulfato de Sodio (SDS) y Decanol (DeOH)

1.3.5.2 Densidad de carga

Además de poder realizar el cálculo de la densidad de masa, GROMACS nos permite calcular la densidad de carga en el sistema. Este cálculo es muy parecido al perfil de densidades de masa. También se divide la caja en capas perpendiculares al eje normal de la bicapa y se suman la carga total de todos los átomos de los grupos,

por cada corte y se gráfica un promedio en el tiempo de las cargas en función de las posición del centro de masa de cada uno de los grupos a lo largo del eje Z.

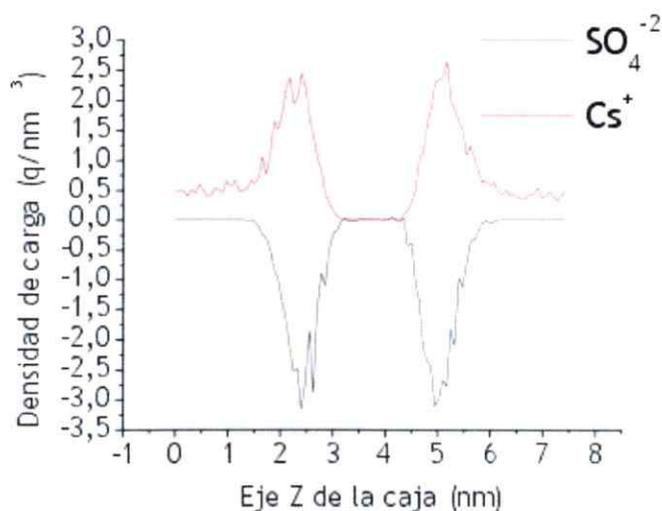


Figura 1.3.8: Ejemplo de cálculo de densidad de carga en GROMACS.

1.3.5.3 Función de distribución radial (rdf)

La función de distribución más importante en la teoría del estado líquido es la función de distribución de pares, $g^{(2)}(\vec{r}^2, \vec{\omega}^2)$, que representa la probabilidad de encontrar dos partículas cualquiera en dos puntos específicos cualquiera en el espacio con dos orientaciones específicas cualquiera. Para un fluido homogéneo isotrópico, tal como los líquidos moleculares, $g^{(2)}(\vec{r}^2, \vec{\omega}^2)$ se vuelve invariante a la elección de la posición y orientación de la primera molécula y es suficiente expresar la función de distribución de a pares como $g^{(2)}(\vec{r}_{12}^2, \vec{\omega}^2)$ donde \vec{r}_{12}^2 es el vector de separación entre las moléculas 1 y 2, y $\vec{\omega}^2$ representa la orientación de la segunda molécula. Es de entender que \vec{r}_{12}^2 y $\vec{\omega}^2$ expresan la posición y orientación de la segunda molécula respecto a la de la primera.

Para líquidos atómicos con interacciones que implican simetrías esféricas, la

función de distribución de pares no contendrá una dependencia angular y por lo tanto la estructura en el sistema (a nivel de pares) esta completamente dada por la función de distribución radial, $g(r)$, donde $r=|\vec{r}|$ es simplemente la magnitud de la separación entre los dos átomos.

En general, en una simulación computacional, el calculo de esta función entre dos partículas A y B, donde A puedes estar rodeada de partículas B (y otras partículas), comienza dividiendo un intervalo radial entre $r=0$ (donde esta el átomo central) y $r=r_{max}$ (donde $r=r_{max}$ por lo general es la mitad de la caja) en N_r intervalos de tamaño Δr , Figura 1.3.9. Luego para cada intervalo, se calcula la función de distribución radial. La función de distribución radial corrige la densidad macroscópica para describir la densidad local. Esta relación esta descrita por:

$$g_{AB} = \frac{\langle \rho_{B(r)} \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \quad (27)$$

Donde $\langle \rho_{B(r)} \rangle$ es la densidad de la partícula B a una distancia r al rededor de la partícula A y $\langle \rho_B \rangle_{local}$ es la densidad de la partícula B promediada en todas las esferas al rededor de la partícula A con radio máximo r_{max} .

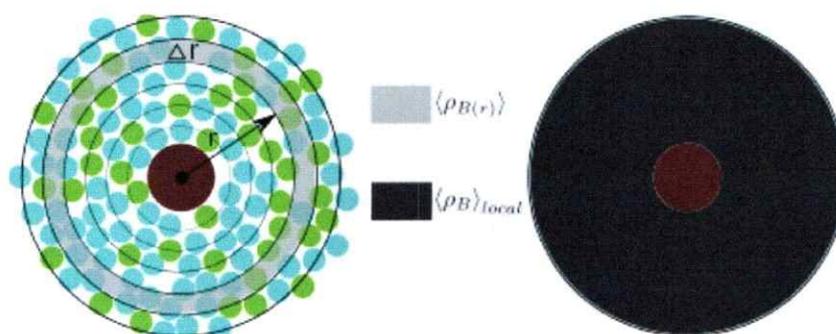


Figura 1.3.9: Calculo de la función de distribución radial



1.4 Calculo de energía libre en dinámica molecular

La diferencia de energía libre entre dos estados A y B se puede obtener fácilmente a partir de una simulación mediante el cálculo de la distribución de probabilidad a lo largo de la coordenada de reacción de unión de estos estados:

$$\Delta G = G_B - G_A = k_B T \ln \frac{P_A}{P_B} \quad (28)$$

donde P_A y P_B son las probabilidades de encontrar el sistema en el estado A y B respectivamente. Estas probabilidades son directamente proporcionales al tiempo que el sistema gasta en cada estado durante una simulación. Sin embargo, si los dos estados están separados por una gran barrera, es probable que una simulación de partida en el estado A muestre sólo el espacio de configuración en torno al estado A. Como no habrá un muestreo representativo de estado B, P_B se verá seriamente subestimada. Cuando se utiliza la técnica Umbrella Sampling³⁵ un potencial de sesgo fijo se añade al Hamiltoniano del sistema para conectar los estados A y B. De esta forma el sistema puede muestrear todo el espacio de configuración. El potencial de sesgo puede ser restado de la energía libre resultante para obtener la energía libre no restringida. A pesar de que es posible construir el potencial de umbrella sampling de tal manera que ambos estados pueden ser muestreados en una única simulación, en las aplicaciones prácticas por lo general es más eficiente dividir la ruta en múltiples ventanas o simulaciones de muestreo. Cada ventana posee un potencial de umbrella sampling en torno a un valor específico de la coordenada de reacción $\xi(r)$ donde en cada una de estas ventanas se genera un histograma de configuraciones. Hecho esto, la probabilidad P como función de la coordenada de reacción y la energía libre F_i para cada simulación es calculado usando el método WHAM³⁶ siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$P(x) = \frac{\sum_{i=1}^{N_{sims}} n_i(x)}{\sum_{i=1}^{N_{sims}} N_i e^{\left(\frac{F_i - U_{sesg}(x)}{k_B T}\right)}} \quad (29)$$

$$F_i = -k_B T \ln \left(\sum_x P(x) e^{\frac{-U_{sesg,i}(x)}{k_B T}} \right) \quad (30)$$

$$U_{sesg,i}(x) = \frac{1}{2} k \left(\frac{x - a_i}{2} \right)^2 \quad (31)$$

Donde N_{sims} es el numero total de simulaciones, N_i da el numero total de conteo en la simulación i , y n_i es el numero de repeticiones que caen en la región centrada en a_i en la simulación i . k_B es la contante de Boltzmann y T es la temperatura. $U_{sesg,i}(x)$ es el potencial de sesgo aplicado. $P(x)$ y F_i son resueltos de forma iterativa hasta alcanzar una convergencia satisfactoria. Por ultimo, el calculo de la energía libre asociada a una coordenada de reacción (como es el eje z de la caja de simulación) conocida como el potencial de fuerza media, se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$W(x) = \Delta G(x) = -k_B T \ln P(x) \quad (32)$$

2 Hipótesis

La actividad biológica de las moléculas que serán estudiadas en este trabajo, dependería, entre otras variables, de la distribución, orientación promedio, interacciones, dinámica y capacidad de cruce de las moléculas a través de la membrana celular. Diferencias en la estructura de la molécula huésped modificaría las propiedades antes mencionadas y en consecuencia, afectaría la actividad biológica.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Generales

1. Relacionar propiedades fisicoquímicas moleculares con la actividad biológica en un modelo de membrana.
2. Validar el uso de estos modelos de bicapas en el estudio del reparto de moléculas biológicamente activas entre el agua y el interior de la membrana.

3.2 Objetivos Específicos

1. Síntesis de las moléculas deuteradas a ser disueltas en los miméticos de membrana.
2. Preparación de los cl, medición de T_1 y desdoblamientos cuadrupolares provenientes del agua deuterada, decanol deuterado en C1 y SDS-d₂₅, en muestras sin huésped y con la molécula huésped.
3. Montaje y cálculo de trayectorias mediante dinámica molecular, empleando el ensamble (N,P,T) para los sistemas estudiados experimentalmente.
4. Cálculo de propiedades medidas experimentalmente, tales como parámetros de orden y tiempos de relajación longitudinal. Cálculo de densidades de carga, densidades de masa, funciones de correlación rotacional, funciones de distribución radial, coeficientes de difusión, puentes de hidrógeno e interacciones

electrostáticas, entre otras, a partir de las trayectorias calculadas empleando dinámica molecular.

4 Localización, orientación y dinámica de dos moléculas con actividad mitocondrial, disueltas en liomesofases aniónicas. Un Estudio en Base a $^2\text{H-NMR}$ y Dinámica Molecular

A continuación presentamos el estudio comparativos acerca de la orientación promedio, distribución y dinámica de dos moléculas estructuralmente similares llamadas II y III, selectivamente deuteradas en las posiciones 5,6,7 y 8 (Figura 4.1), disueltas en un cristal liquido líotropo nemático discoidal formado por CsDS/DeOH (20% DeOH- d_2)/Cs $_2$ SO $_4$ /H $_2$ O (0,1% v/v DHO). A pesar de su aparente similitud estructural, estas dos moléculas muestran diferentes actividades anti-cancerígenas: como inhibidor de la respiración de células tumorales, II es dos o tres veces mas activa que III ($^1\text{IC}_{50}$ II = $0.22 \pm 0.02\text{mM}$ y IC_{50} III = $0.08 \pm 0.01\text{mM}$ contra la línea celular TA3; IC_{50} II = $0.17 \pm 0.02\text{mM}$ y IC_{50} III = $0.07 \pm 0.01\text{mM}$ contra la variante TA3-MTX-R)^{17 37}.

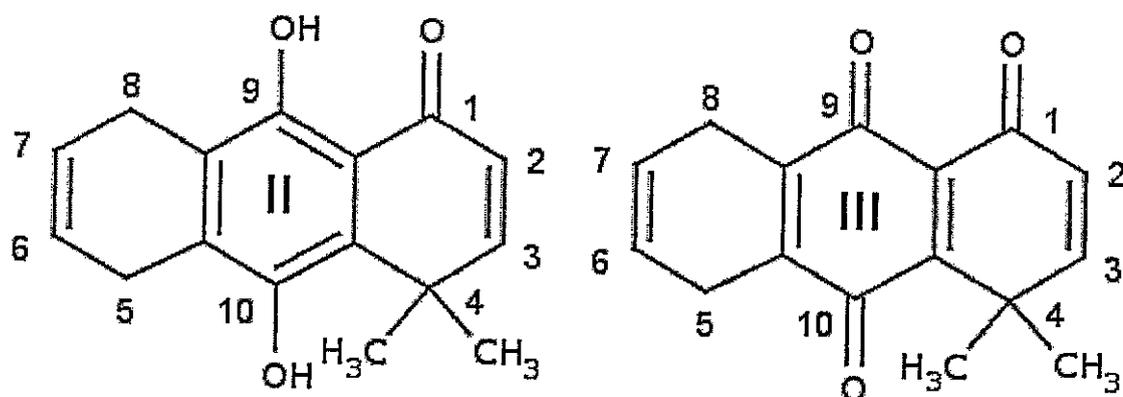


Figura 4.1: De izquierda a derecha: (1) 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-1,4,5,8-tetraidroantracene-1-ona (II), (2) 4,4-dimetil-1,4,9,10-tetraidroantracene-1,9,10-triona (III)

¹ El IC_{50} miden la concentración de una sustancia necesaria para inhibir un proceso biológico a la mitad (50%)

4.1 Preparación de la Muestra

La síntesis de las moléculas deuteradas fueron realizadas mediante metodología ya descrita¹⁷, reemplazando el 1,3-butadieno por uno completamente deuterado, disponible comercialmente en el catálogo Aldrich. El CsDS fue preparado desde una reacción entre ácido sulfúrico y decanol, seguido de la neutralización de la solución con CsOH. Finalmente fueron realizadas 3 recristalizaciones (etanol/agua) para la purificación del cristal, antes de ser usado. La solución de cristal líquido fue preparada disolviendo 2.4044g de CsDS, 0,5969g de Cs₂SO₄ y 314uL de DeOH (20% DeOH-d₂) en 2,5mL de agua (0,1% v/v DHO). De esta solución se separaron tres porciones iguales de 0,8mL y a una de ellas fue agregada 5mg de III, a otra muestra II, y la tercera muestra fue usada como referencia.

4.2 Determinación de las Señales

Las señales para DeOH-d₂ y DHO ya han sido estudiadas por nuestro grupo³⁸. Para asignar las señales de los derivados deuterados de quinona, se tomaron en cuenta sus intensidades y los desplazamientos químicos con respecto a las moléculas no deuteradas. Todos los espectros de RMN fueron obtenidos a una frecuencia de 64.1MHz y 300 K en un espectrómetro Bruker Avance 400, ubicado en la Universidad Santiago de Chile. Los valores de T₁ fueron medidos usando la secuencia de pulsos T1IR.

4.3 Dinámica Molecular

La Mesofase de CsDS ha sido previamente construida y estabilizada³⁸. Se calcularon 300ns de trayectoria usando un ensamble N,P,T para cada sistema. El cálculo y todos los análisis fueron hechos empleando el paquete de programas GROMACS v4.5³⁴. Las cargas de todas las especies fueron calculadas desde una optimización de geometría 6-31G*, usando el programa Gaussian³⁹, ajustando las cargas al potencial electrostático. El programa VMD⁴⁰ fue usado para la visualización

de la trayectoria y para la obtención de las imágenes mostradas en este trabajo. La aproximación de átomos unidos fue empleada para todos los hidrógenos alifáticos. En nuestras simulaciones, el campo de fuerza empleado fue GROMOS⁴¹. Las distancias de enlace fueron ajustadas a un valor fijo usando LINCS⁴². Se usó el potencial de Ryckaert-Bellemans⁴³ para las cadenas hidrocarbonadas de los anfifilos, en lugar de los parámetros del campo de fuerza GROMOS, debido a que este campo de fuerza reproduce la estadística de las transiciones cis-trans a lo largo de las cadenas mucho más preciso que el campo de fuerza GROMOS. Los parámetros de Cs⁺ fueron transferidos desde el campo de fuerza OPLS^{44,45}. Se usó 1 nm de cut-off para el potencial de Lennard-Jones. Para las interacciones electrostáticas de corto y largo alcance se empleó PME⁴⁶. El algoritmo de Berendsen fue empleado para mantener la temperatura a 300 K y la presión a 1 atmósfera, con las constantes de 0,1ps y 1ps respectivamente⁴⁷. El tiempo de integración para el cálculo de la trayectoria fue de 2fs.

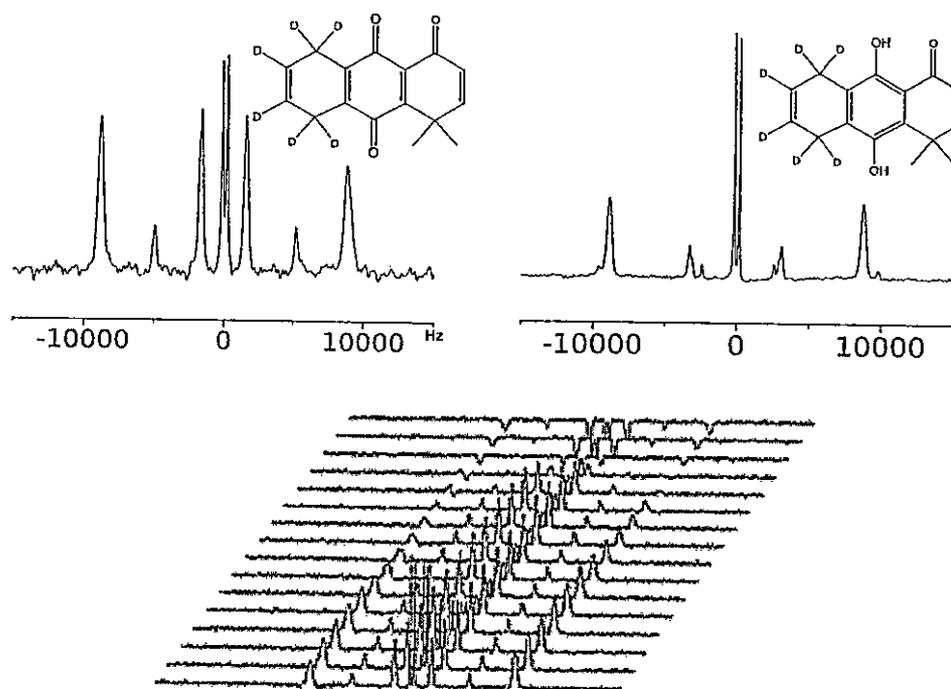


Figura 4.3.1: De izquierda a derecha: espectro ^2H -RMN para III y II disuelto en la mesofase de CsDS. Inferior: Experimento para la medición de T_1 en la muestra de II. Los desdoblamientos cuadrupolares fueron medidos directamente desde los espectros para cada una de las moléculas.

	Mesofase pura	Mesofase+III	Mesofase+II	II otra fase
Δv_Q (Hz) DeOH- d_2	16991	17636	17682	17682
Δv_Q (Hz) HDO	330	340	348	348
Δv_Q (Hz) CD	-	10134	6037	19410
Δv_Q (Hz) CD_2	-	3444	6397	5002
T_1 (ms) DeOH- d_2	96	98	96	96
T_1 (ms) HDO	492	451	456	456
T_1 (ms) CD	-	15	10	9
T_1 (ms) CD_2	-	12	11	11

Tabla 4.4.1: Desdoblamientos cuadrupolares y tiempos de relajación longitudinal para todos los enlaces CD en la muestra usando 2H -RMN. Los errores en Δv_Q para DeOH es de ± 30 Hz con II y III y ± 3 Hz para DHO. Izquierda a derecha: Mesofase sin molécula, mesofase con III, mesofase con II, II en la fase desconocida.

La Figura 4.4.1 muestra una imagen de la caja de simulación para el sistema II

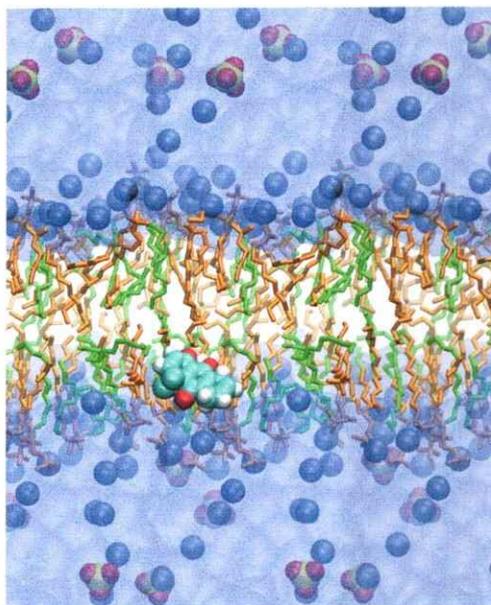


Figura 4.4.1: Caja de simulación de la dinámica molecular conteniendo II. El solvente (agua) es representado de color azul continuo, los sulfatos de color amarillo, los átomos de cesio como esferas plomas opacas, los CsDS en naranja y el DeOH en verde. En color azul están los carbonos de II, en color blanco los átomos de deuterio y los átomos de oxígeno en rojo.

La Figura 4.4.2 muestra los perfiles de densidades de masa a lo largo del eje z en cada una de las simulaciones realizadas para II y III.

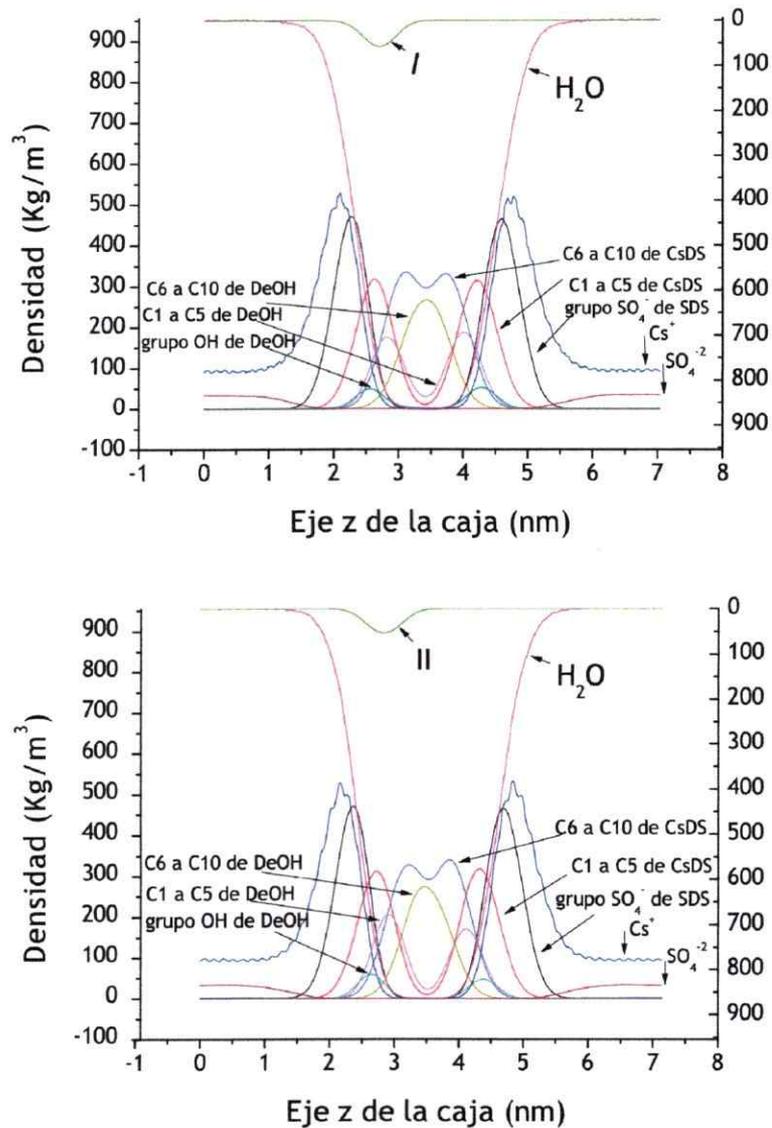


Figura 4.4.2: Gráfico de densidades de masa para todos los componentes del sistema a lo largo del eje z de la caja de simulación. Para una mejor visualización de las gráficas, el CsDS y DeOH están divididos en 3 fragmentos cada uno, como se muestra en la figura

La Figura 4.4.3 la evolución temporal del centro de masa para la coordenada z de II y III.

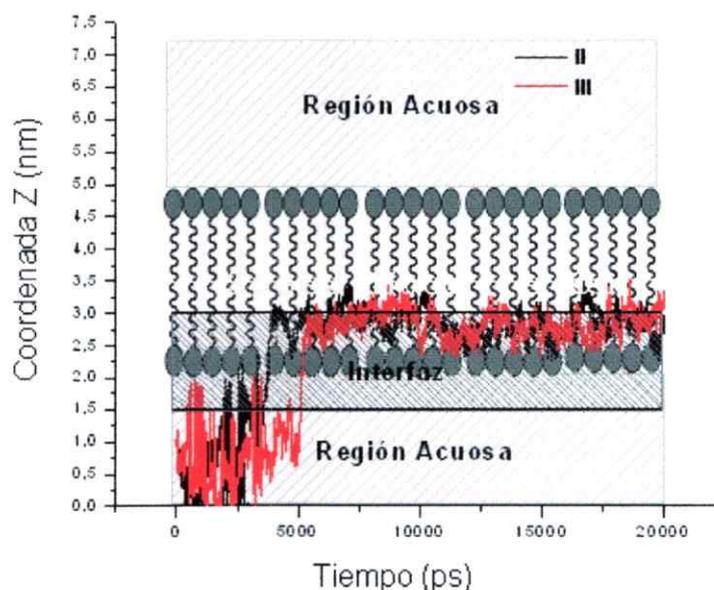


Figura 4.4.3: Coordenada z para el centro de masa para II y III. Sólo los primeros 20ns son mostrados. La región acuosa e interfaz están puestas según los gráficos de densidad de masa promedio.

Para una mejor visualización de CsDS y DeOH en la Figura 4.4.2, estas dos moléculas fueron divididas en tres fragmentos cada una, de la siguiente manera: el primer fragmento contiene el grupo cabeza sulfato o hidroxilo, el segundo fragmento incluye los primeros 5 carbonos, y el tercer fragmento incluye el resto de los carbonos en la cadena carbonada. Los grupo de estas moléculas están indicados en la gráfica. Cada uno de los perfiles de densidad están calculados con respecto a los centros de masa de cada uno de los grupos presentados en los gráficos.

Es posible calcular la orientación, de forma completa, de estas moléculas planas en el sistema de bicapa, empleando 2 ángulos ortogonales. Las Figuras 4.4.4 y 4.4.5 muestran los histogramas de los ángulos entre 2 ejes moleculares y la normal al plano de la bicapa.

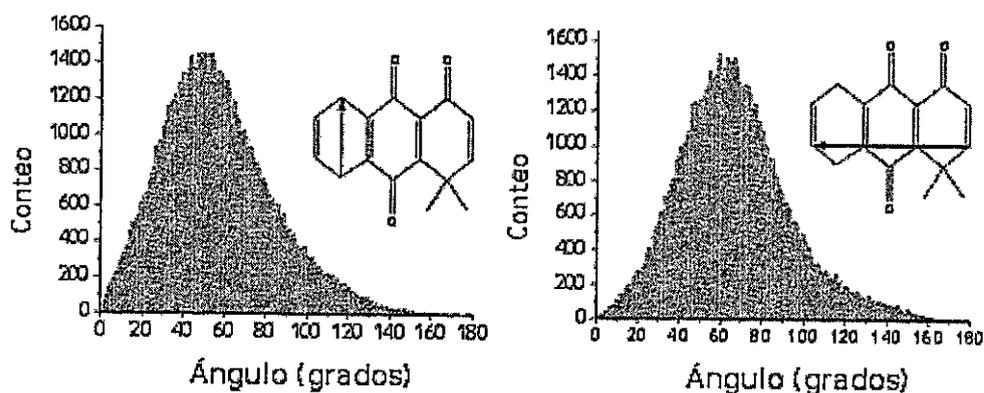


Figura 4.4.4: Histogramas de los ángulos entre el eje molecular corto (izquierda) y el eje molecular largo (derecha) de III con respecto al eje z de la bicapa, el cual es el eje normal al plano de la bicapa.

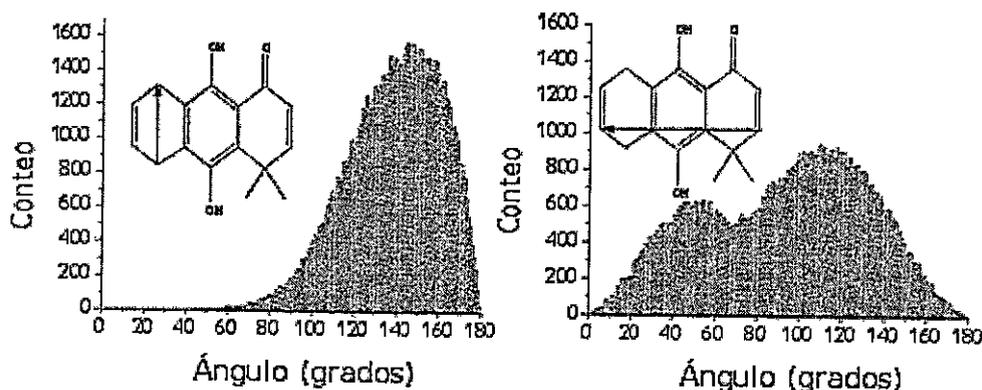


Figura 4.4.5: Histogramas de los ángulos entre el eje molecular corto (izquierda) y el eje molecular largo (derecha) de II con respecto al eje z de la bicapa, el cual es el eje normal al plano de la bicapa.

Finalmente, para ver la existencia de enlaces de hidrógeno, se realizaron histogramas de las distancias donor-aceptor entre el grupo OH y el grupo C=O de II y III con el solvente y funciones de distribución radial de los centros de masa para los grupos anteriores mencionados con respecto al agua. La Figura 4.4.7 presentan estos resultados. Solo se observa puentes de hidrógeno y estructuras de solvatación en los átomos que se muestran en estas figuras, en el caso de los restantes grupos funcionales no se observan estas interacciones.

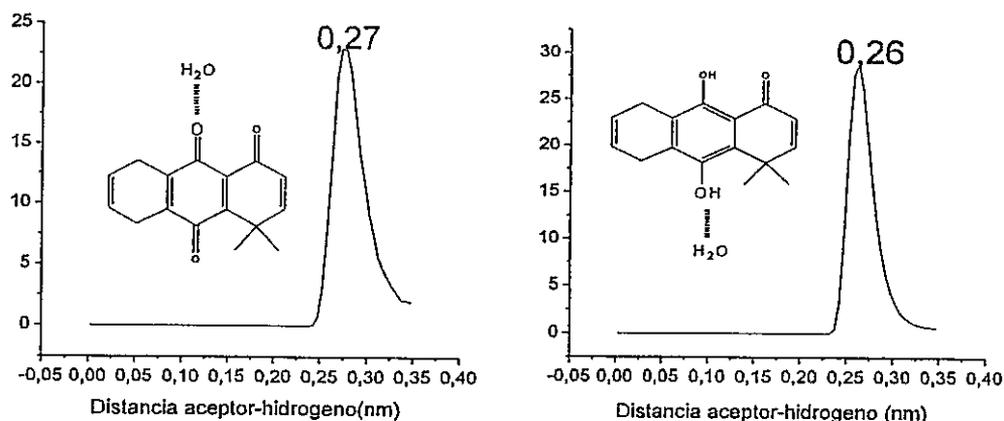


Figura 4.4.6: Histogramas para las distancias donador-aceptor correspondientes a la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo C=O en el carbono C9 de III y para el grupo OH en el carbono C10 de II con las moléculas de agua.

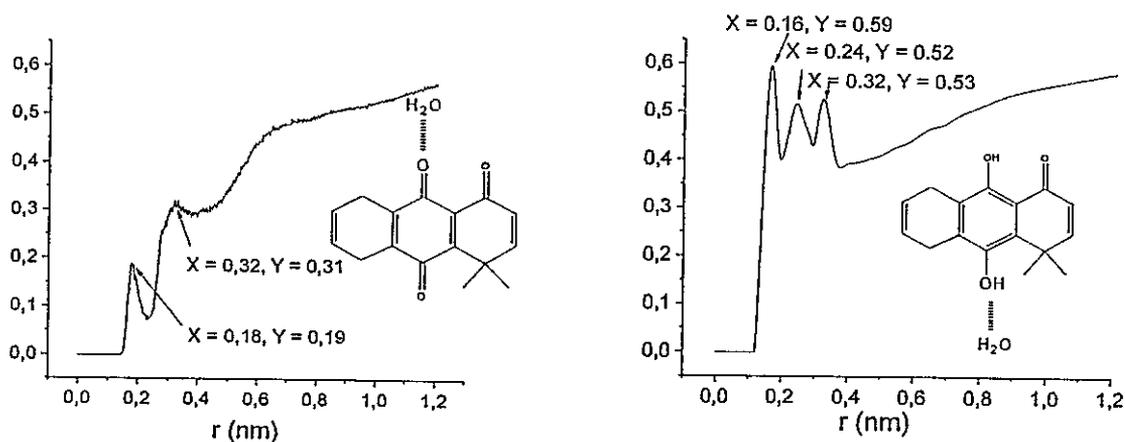


Figura 4.4.7: Función de distribución radial de las moléculas de agua rodeando a los átomos de oxígeno en el grupo C=O de III y del grupo OH para II.

4.5 Discusión

El espectro de la muestra de II muestra cuatro desdoblamientos cuadrupolares distintos, el más grande proviene del DeOH-d_2 , los próximos 2 desdoblamientos provienen de la molécula huésped, asignados a CD y CD_2 basados en la intensidad de las señales y sus integrales(1:2). La señal más intensa y de desdoblamiento más pequeño corresponde a DHO. Por otro lado, el espectro para la muestra III muestra 12 señales, atribuibles a 6 desdoblamientos. Una simple comparación con la muestra II permite asignar los desdoblamientos para DeOH-d_2 y DHO. Debido a que una muestra sin molécula huésped muestra sólo estos desdoblamientos, proponemos, en este trabajo, que existe una fuerte interacción entre II y los componentes de la mesofase, induciendo la formación y coexistencia de una segunda mesofase. De esta forma, II está repartida entre estas dos fases pero con diferente alineamiento con respecto al campo magnético, resultando 2 desdoblamientos extras. Para realizar una asignación, esto es, determinar que señales provienen de la molécula disuelta en el cl y cual proviene de la mesofase desconocida, preparamos una muestra significativamente más diluida con respecto a la concentración de II (1.5mg II/1mL de mesofase). Suponiendo que la cantidad de segunda fase formada es proporcional a la cantidad de II disuelta, una simple comparación entre las razones de las integrales de las diferentes señales, permite concluir que el desdoblamiento más pequeño y el más grande, ambos provienen de II disuelta en la fase desconocida, debido a que solo ellas decrecen en intensidad relativa al bajar la concentración de huésped. Por lo tanto, las otras dos señales, muy cercanas entre ellas, provienen de II disuelta en cl, la fase de interés. La tabla 1 incluye los desdoblamientos cuadrupolares y T_1 de II disuelta en la fase inducida; este valor para T_1 apoya la idea de que estas señales provienen de una molécula pequeña.

La Figura 4.3.1 muestra que los desdoblamientos cuadrupolares de II son muy similares, mientras que los desdoblamientos para III son significativamente diferentes. Además, para III, el desdoblamiento para el grupo CD es relativamente

menor que el desdoblamiento para el grupo CD_2 , opuesto a lo observado para II. Una inspección a la tabla 1 indica que, a pesar de las diferencias observadas, los valores para los desdoblamiento de II y III sugieren que estas moléculas se encuentran incorporadas en el agregado molecular. Debido a que el desdoblamiento cuadrupolar es una propiedad que depende de la orientación y la movilidad, el origen de las diferencias no es fácilmente observable desde los espectros y podrían provenir de cualquiera de estas dos variables o una combinación de ellas. Medidas de T_1 dan información acerca de la dinámica reorientacional del cuadrupolo eléctrico. Cuando el movimiento molecular es más rápido que la frecuencia de Larmor, $1/\tau_c \gg \omega_0$, (τ_c el tiempo de correlación rotacional y ω_0 la frecuencia de resonancia), T_1 es aproximadamente proporcional a $1/\tau_c$ para el correspondiente enlace C-D⁴⁸ y por lo tanto proporcional a la movilidad. De los datos de la tabla 1 para II y III se observa que ambas fases muestran, dentro de la condición señalada anteriormente, valores similares de T_1 , para todos los núcleos. Esto evidencia sugiere que II y III tendrían distintas orientaciones promedio dentro del agregado molecular.

Trabajos previos de nuestro grupo evidencian que el DeOH es un componente integral de la bicapa, y su señal que proviene del carbono adyacente al grupo OH, cercano a la interfase, nos da una medida de la dinámica de la interfaz en el sistema. Una inspección de la tabla 1 revela que la adición de cualquiera de las dos moléculas incrementa el valor del desdoblamiento de la señal para DeOH. Considerando que la orientación del agregado no es modificada, esto revela que ambas moléculas, cuando son disueltas en la mesofase, incrementan el grado de alineación de los componentes de la interfase con el campo magnético, haciendo más rígida la interfaz.

El desdoblamiento para el solvente proviene de las moléculas de DHO en la interfaz del sistema, que están en un intercambio rápido con las moléculas en la región isótropa del sistema (región acuosa), por lo tanto la señal observada corresponde a un promedio entre ambas situaciones. El incremento observado en el

desdoblamiento de la señal del DHO (tabla 1) con la adición de los derivados, podría provenir de una disminución en la movilidad de las moléculas de agua en la interfaz, de modificaciones en su orientación promedio o de un incremento en la cantidad de moléculas de solvente en la interfaz. Posiblemente el aumento observado proviene de modificaciones en la dinámica del solvente en la interfase, aumentando la rigidez de esta zona. Esto está apoyado por la disminución en el valor de T_1 para DHO, después de añadir cualquiera de las dos moléculas, II o III. Esto sugiere la existencia de una fuerte interacción entre las moléculas huésped y el solvente en la interfase.

Para dar una interpretación microscópica de las observaciones experimentales, hemos empleado simulaciones de Dinámica Molecular. Se han estudiado la orientación promedio, distribución, interacción y dinámica de ambas moléculas disueltas en un modelo de bicapa del agregado molecular. Se calcularon 300ns de trayectoria para cada sistema. Una inspección visual de la trayectoria muestra que la integridad de la bicapa se mantiene a lo largo de todo el tiempo calculado. Todas las propiedades fueron calculadas luego de que el sistema alcanzó un valor de energía total constante. Como se observa en la Figura 4.4.3, ambas moléculas fueron originalmente posicionadas en la región acuosa del sistema, permitiéndoles moverse libremente hasta que alcanzaran su posición de equilibrio. Esta figura muestra que II y III, espontáneamente difunden hacia el agregado, alcanzando su posición de equilibrio entre la interfaz y la región hidrofóbica.

La Figura 4.4.2 muestra los perfiles de densidades de masa para todos los componentes del sistema a lo largo del eje z de la caja de simulación, incluyendo II y III respectivamente. Estas figuras corroboran que ambas moléculas están efectivamente asociadas al agregado, en acuerdo con la magnitud de los desdoblamientos cuadrupolares, localizado al interior, cercanos a la interfase, como sugieren los datos experimentales. De estas figuras, podemos claramente distinguir la estructura de bicapa hecha por DeOH y CsDS, con una región hidrofóbica de ancho 10Å. Podemos notar que la densidad de iones Cs^+ es más grande cercano a las

cabezas polares del CsDS que la región acuosa del sistema, introduciendo una polarización de cargas cercano a la interfaz, como es de esperar.

Para determinar la orientación promedio de las moléculas en la bicapa, se calcularon los ángulos entre 2 ejes moleculares seleccionado, (a lo largo del carbono C5 y C8, y a lo largo del carbono C3 y C6) y la normal de la bicapa, el eje z de la caja de simulación. Histogramas de la distribución de estos dos ángulos son mostrados en la Figura 4.4.4 y Figura 4.4.5. Estos dos ángulos son suficientes para describir de forma completa la orientación de las moléculas huésped en la bicapa. De estos gráficos podemos observar que III esta oscilando esencialmente alrededor de una orientación fija, con ambos ángulos alrededor de 50° a 70° . Por otra parte II esta orientada en su eje pequeño con un ángulo de 150° y en el eje mas largo con dos posibles ángulos preferenciales, alrededor de 50° y 70° , fluctuando entre ambos. Por lo tanto, ambas moléculas muestran orientaciones preferenciales y dinámica reorientacional diferentes. Usando estos valores promedio podemos posicionar la molécula en el espacio y concluir que las orientaciones promedio de III en la bicapa es con el grupo gem-dimetil apuntando hacia la región hidrofóbica, sugiriendo la existencia de puentes de hidrógeno entre el C=O en el C9 y el solvente. Por otro lado, II aparece orientado con el grupo gem-dimetil apuntando hacia la interfaz del sistema, sugiriendo la existencia de puentes de hidrógeno entre el grupo OH en el C10 con las moléculas de solvente. Para probar esta hipótesis, se calcularon histogramas de distancias donador-aceptor entre los grupos C=O de III y el grupo OH de II con moléculas de solvente; las gráficas para estos datos se muestran en la Figura 4.4.6. Sólo son mostrados los resultados obtenidos para grupos orientados hacia la interfase, C=O en C9 para III y el grupo OH en C10 para II, los otros grupos muestran histogramas sin un máximo definido, evidenciando la ausencia de interacción. La Figura 4.4.6 muestra distancias preferenciales a $2,7\text{\AA}$ y $2,6\text{\AA}$ para III y para II respectivamente. Entonces la diferencia entre las orientaciones esta relacionada con la formación de puentes de hidrógeno con el solvente. En el caso de III, el puente de hidrógeno a través de C=O en C9 esta mas favorecido que en la posición C10 debido al impedimento estérico

por la presencia de grupo gem-dimetil y por la hidrofobicidad de este. Por otra parte, el puente de hidrógeno con el grupo OH en C10 esta favorecido sobre el OH en C9 debido a que este ultimo ya estaría formando un punte de hidrógeno intramolecular con el grupo C=O en C1. La evidencian experimental para esto proviene del desplazamientos químico para este protón en RMN, alrededor de 13 ppm a campo bajo de TMS, donde la asignación de todas las señales de RMN ya han sido hechas¹⁷. Finalmente la Figura 4.4.7 muestra las distribuciones radiales de moléculas de solvente en torno al centro de masa del grupo OH en la posición C10 y para el átomo de oxígeno en la posición C9, calculando esta función desde el origen del grupo de referencia (OH, O) hasta la mitad de la distancia mínima de la imagen periódica del sistema. En estos sistemas, el agua de la interfase posee características orientacionales completamente diferentes del agua en una solución isótropa, donde todas las orientaciones son igualmente probables. Este ordenamiento en la interfase debería posibilitar la formación de más de una esfera de solvatación en torno al átomo central. Estas figuras revelan la presencia de esferas de solvatación en ambos casos, sin embargo el numero acumulativo de los máximos de la rdf de II son 1, 1 y 2 moléculas de agua, en tanto que para III esto es 0,3 y 2,5. Estos valores pequeños de los números acumulativos reflejan la baja densidad de agua en al región interna de la interfase. Además, para II la rdf es significativamente más definidas, sugiriendo una fuerte interacción de II con las moléculas de solvente en la interfase. Estas figuras también evidencian una distancia de 1,6Å desde el centro de masa del grupo OH en C10 de II y la primera esfera de solvatación. Esta interacción debería ser suficientemente fuerte para inducir la coexistencia de una segunda fase.

4.6 Conclusiones

La simulaciones de dinámica molecular han sido muy útiles para interpretar los resultados experimentales. Ambas moléculas se encuentran fuertemente unidas al agregado del cl y localizadas en el interior de la bicapa, cercanas a la interfase, sin

embargo ellas presentan diferentes orientaciones promedios. La inclusión de ambas moléculas incrementan el alineamiento de todos los componentes de la interfase con el campo magnético, sugiriendo un aumento de la rigidez del agregado. Los cálculos predicen una fuerte interacción entre las moléculas huésped y el solvente, a través de puentes de hidrógeno. Se observa la existencia de esferas de solvatación bien definidas en torno a ambas moléculas. En el caso de II, esta interacción es lo suficientemente fuerte para introducir la coexistencia de 2 fases formadas.

5 Efecto del contra-ion sobre cristales líquidos liótropos nemáticos discoidales formados por SDS y Decanol en solución de Na_2SO_4 y Li_2SO_4 . Un estudio en base a $^2\text{H-NMR}$ y Dinámica Molecular

Este trabajo estudia el efecto del contra-ion en cristales líquidos nemáticos discoidales, formados por dodecilsulfato de sodio (3% SDS- d_{25}) y decanol (20% DeOH- d_2), en solución acuosa (0.1% D_2O) con Na_2SO_4 (S1) o Li_2SO_4 (S2). El tamaño promedio del agregado fue estimado usando un experimento de fluorescencia en colaboración con el doctor Rodrigo Montesinos, de la Universidad Católica de Chile, y la dinámica fue estudiada experimentalmente empleando RMN- ^2H , midiendo los desdoblamientos cuadrupolares ($\Delta\nu_Q$) y tiempos de relajación longitudinal T_1 para todas las especies. Con el fin de proporcionar una interpretación a nivel atómico, llevamos a cabo una simulación computacional del sistema empleando dinámica molecular. El remplazo de Na_2SO_4 por Li_2SO_4 disminuye el alineamiento de los componentes del agregado con el campo magnético, preferencialmente afectando los primeros átomos de carbono cercanos a la interfaz.

El tamaño de los agregados es insensible al reemplazo de Na_2SO_4 por Li_2SO_4 . Las diferencias observadas provienen de las diferencias en la dinámica interna de los agregados. Excelente acuerdo se encuentra entre los $\Delta\nu_Q$ experimentales y calculados para S1 y S2. Se encontraron diferencias significativas entre las distribuciones de interacciones calculadas para Na^+ y Li^+ . Las repulsiones de Li^+ y los solventes (orientados) en la interfaz del sistema y el incremento en las repulsiones entre los grupos sulfato del SDS podrían ser responsables de los resultados observados.

5.1 Preparación de la Muestra

Tanto SDS- h_{25} (>99%) como SDS- d_{25} fueron adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich) y usados directamente. El agua para preparar las muestras fue adquirida de Merck para uso HPLC. La fase de liquido cristal con Na_2SO_4 fue preparada disolviendo 0,514g de SDS, 0,010g de SDS- d_{25} , 0,0473g de Na_2SO_4 i, y 0,108 ml de decanol en 1 ml de agua (S1). La segunda muestra fue preparada reemplazando el Na_2SO_4 por 0.0433g de $Li_2SO_4 \cdot H_2O$ (S2). Ambas mesofases fueron equilibradas a lo menos 24 horas a 310K antes de realizar las mediciones.

Todas las mediciones de RMN fueron llevadas a cabo a 310K a una frecuencia de 64.1MHz en un espectrómetro Bruker Avance 400, ubicado en la Universidad Santiago de Chile. Los valores de T_1 fueron medidos usando la secuencia de pulsos T1IR. El pulso de 90° fue de $19\mu s$ y mas de 1000 escanes fueron acumulados en un archivo de 32KB, con una ventana espectral de 40kHz.

5.2 Determinación de las Señales

5.2.1 Asignaciones para las señales de SDS- d_{25} y Decanol- d_2

Con el fin de poder asignar inequívocamente los desdoblamientos cuadrupolares a partir del espectro 2H -RMN, se realizaron cuatro experimentos bajo las mismas condiciones. El primer experimento fueron asignadas las señales para DeOH y H_2O empleando sus componentes deuterado (EXP 1). En el segundo experimento se empleo SDS- d_{25} asignandose las señales para toda la cadena hidrocarbonada del SDS (EXP 2).

La Tabla 5.2.1 muestra los componentes de los 2 experimentos.

EXP 1	EXP 2	<i>Tabla 5.2.1: SDS-h_{25}: Dodecilsulfato de sodio no deuterado. SDS-d_{25}: Dodecilsulfato de sodio deuterado a lo largo de toda la cadena. DeOH-d_2: Decanol deuterado en el carbono adyacente al grupo hidroxilo. DHO: Agua deuterada. Na_2SO_4: Sulfato de sodio anhidro.</i>
SDS- h_{25}	SDS- d_{25}	
DeOH- d_2	DeOH- d_2	
DHO	DHO	
Na_2SO_4	Na_2SO_4	

La Figura 5.3.1 (pp. 63) muestra los espectros provenientes de estos experimentos. En azul se muestra la señal proveniente del decanol; en rojo la señal para el agua y en negro las señales provenientes del dodecilsulfato de sodio.

Para diferenciar las señales provenientes de cada metileno y el metilo final del SDS, tomamos en cuenta la movilidad del sistema y las integrales de cada señal. Dentro de un sistema de bicapa, la movilidad se incrementa a medida que nos acercamos al interior de la zona hidrofóbica, por lo tanto, desde el metilo (interior de la bicapa, C12) hasta el primer metileno (zona adyacente los grupos hidrofílicos, C1) de la cadena de SDS, los desdoblamientos cuadrupolares se incrementan y los tiempos de relajación longitudinal disminuyen. De acuerdo al valor de las integrales, para los C12, C11, C10 y C9, es posible hacer una asignación individual, sin embargo las señales provenientes de C1 a C8, se encuentran muy cercanas entre sí, produciéndose un importante recubrimiento, dificultando la asignación individual. Sin embargo, empleando el valor relativo de las integrales de las señales recubiertas, es posible asignarlas a grupos de átomos de la cadena. Por lo tanto, el $\Delta\nu_Q$ del C8 fue asignado a un hombro interior; para los carbonos C1-C7 (14 deuterios) no existen muchas posibilidades concordantes con los tres máximos observados, por lo que la asignación es C1-C4 al $\Delta\nu_Q$ más grande y C5-C7 al siguiente.

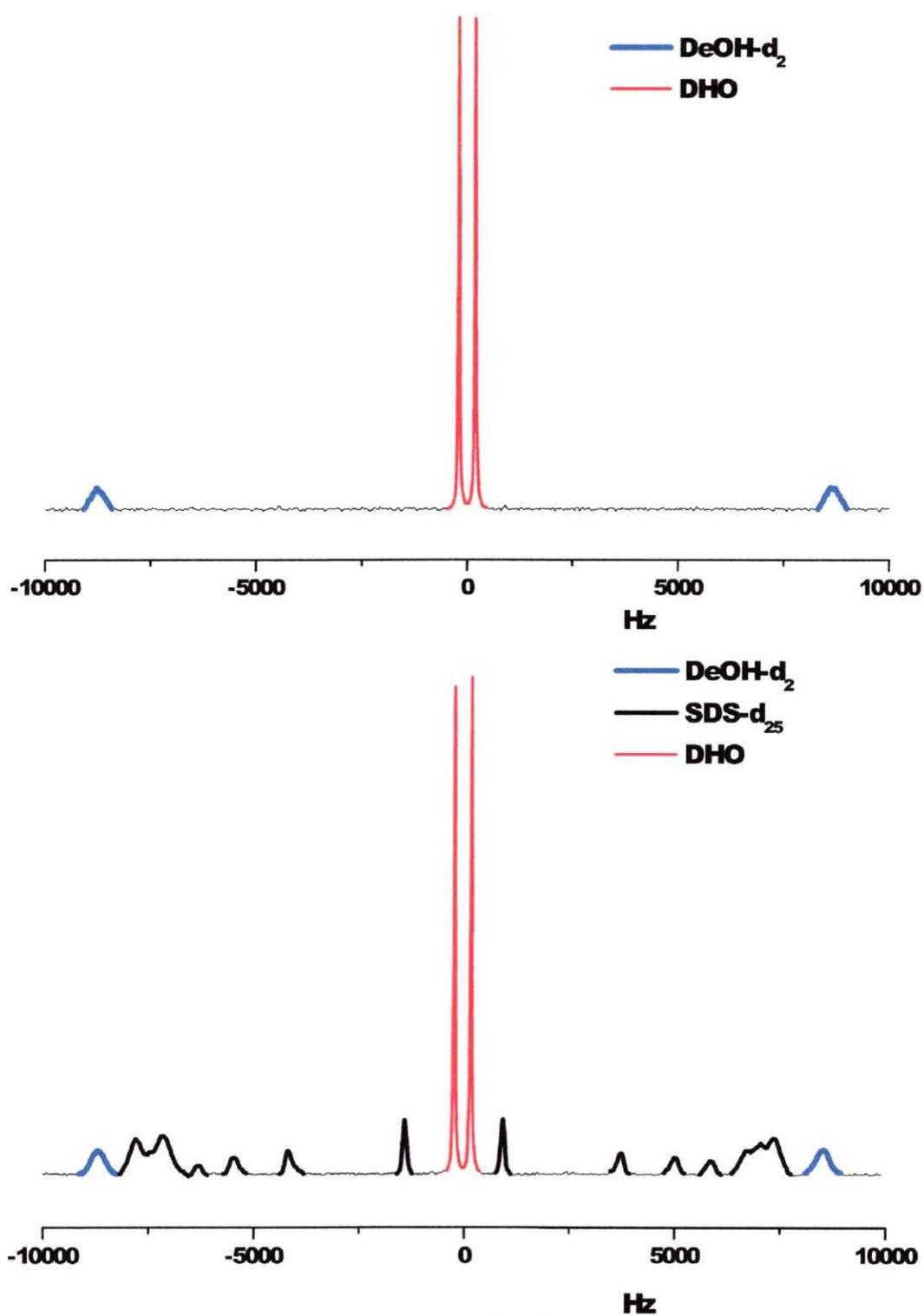


Figura 5.3.1: superior: EXP1, inferior: EXP2. Sobre cada pick se han puesto los deuterios de los cuales proviene cada desdoblamiento, desde lo primeros 9 CD₂ cercanos a la señal del decanol hasta el doceavo carbono, 12CD₃, cercano a la señal del agua deuterada.

5.3 Dinámica Molecular

El cálculo de la trayectoria y todos los análisis posteriores fueron hechos empleando el paquete de programas GROMACS v4.5³⁴. Se calcularon 300ns de trayectoria usando el colectivo N,P,T para cada sistema. La caja de simulación consistió en una bicapa con 156 moléculas de SDS, incluyendo el respectivo contra-
ion Na^+ , 40 DeOH, 2633 H_2O y 40 unidades de Na_2SO_4 o Li_2SO_4 .

El programa VMD⁴⁰ fue usado para la visualización de la trayectoria y para la obtención de las imágenes mostradas en este trabajo. La aproximación de átomos unidos fue empleada para todos los hidrógenos alifáticos. Se empleo el campo de fuerza GROMOS⁴¹ en todas las simulaciones. Las distancias de enlace fueron ajustadas a un valor fijo usando LINCS⁴². Se uso el potencial de Ryckaert-Belleman⁴³ para las cadenas hidrocarbonadas de los anfifilos, en lugar de los parámetros del campo de fuerza GROMOS, debido a que este campo de fuerza reproduce la estadística de las transiciones cis-trans a lo largo de las cadenas mucho más preciso que el campo de fuerza GROMOS. Los parámetros de Lennard-Jones para el litio fueron tomados de la literatura⁴⁹. Se usó 1 nm de cut-off para el potencial de Lennard-Jones. Las interacciones electrostáticas fueron calculadas con PME⁴⁶. El algoritmo de Berendsen fue empleado para mantener la temperatura a 300 K y la presión a 1 atmósfera, con las constantes de 0,1ps y 1ps respectivamente⁴⁷ El tiempo de integración para el cálculo de la trayectoria fue de 2fs.

La Tabla 5.3.1 muestra los parámetros de Lennard-Jones empleados y las cargas empleadas para todas las especies. Sin embargo, para lograr la estabilidad de la caja y la estabilidad de la bicapa, las cargas de todas las especies fueron divididas a la mitad. Existen variadas razones para esta modificación y algunas de ellas ya han sido antes discutidas. La ausencia de polarizabilidad en todas las especies, particularmente sobre los sulfatos, el uso de la permitividad en el vacío, y la planaridad de la interfase calculada, cuando es comparada con la interfaz del agregado, la cual posee mayor curvatura que la simulada, todo contribuye a la

sobre estimación de los valores de las interacciones electrostáticas.

SDS		Carga (e)	DeOH		Carga (e)
1	OM	-0,415	1	H	0,852
2	OM	-0,415	2	OS	-1,444
3	OM	-0,415	3	CH2	0,658
4	S	0,450	4	CH2	-0,066
5	OS	-0,286	5	CH2	0,000
6	CH2	0,108	6	CH2	0,000
7	CH2	-0,028	7	CH2	0,000
8	CH2	0,000	8	CH2	0,000
9	CH2	0,000	9	CH2	0,000
10	CH2	0,000	10	CH2	0,000
11	CH2	0,000	11	CH2	0,000
12	CH2	0,000	12	CH3	0,000
13	CH2	0,000		Na ⁺	1,0
14	CH2	0,000		Li ⁺	1,0
15	CH2	0,000		S(SO ₄ ²⁻)	1,504
16	CH2	0,000		O(SO ₄ ²⁻)	-0,876
17	CH3	0,000			

Atom type	C6	C12
OM	2,36210E-003	1,59E-001
S	9,98440E-003	0,13078E-04
OS	2,26170E-003	0,74158E-06
CH2	5,86160E-003	2,26E+000
CH3	8,79230E-003	3,39E+000
Na ⁺	7,20590E-005	0,21014E-07
Li ⁺	1,41800E-003	1,9233E-008
H	0	0

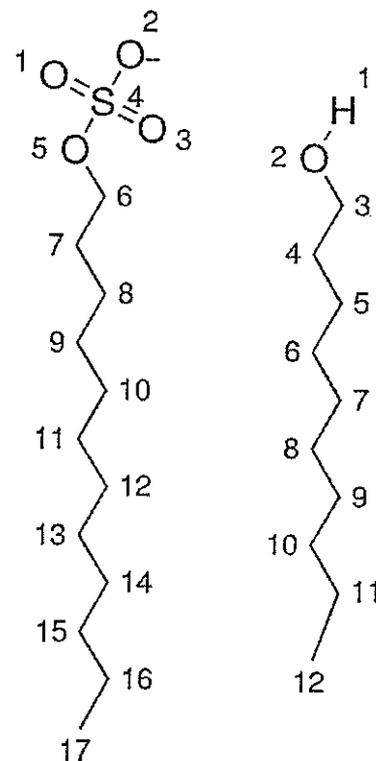
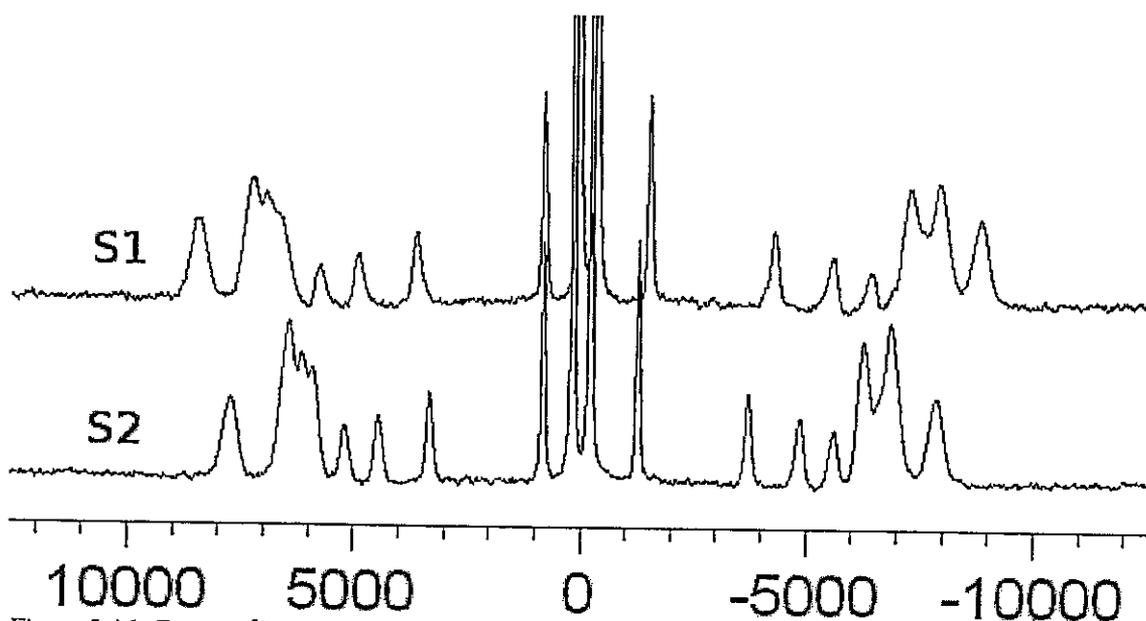


Tabla 5.3.1: Cargas Ab-Initio 6-32G* y parámetros de Lennard-Jones empleados en esta simulación

5.4 Resultados Experimentales y Dinámica Molecular

La Figura 5.4.1 muestra los espectros de RMN-²H. El desdoblamiento mas pequeño proviene de DHO y el desdoblamiento mas grande proviene del DeOH-d₂. Estos $\Delta\nu_Q$ medidos directamente del espectro, fueron asignados basados en las intensidades relativas y el hecho que el enlace C-D más móvil posee el $\Delta\nu_Q$ más pequeño y el T₁ más largo. Para las señales del SDS-d₂₅ se encontró una superposición significativa en los primero 8 carbonos. La Tabla 5.4.1 contiene todos los resultados experimentales, tanto $\Delta\nu_Q$ como T₁, para SDS, DeOH y H₂O, como los resultados de dinámica molecular.

Figura 5.4.1: Espectro ^2H -RMN de S1 y S2.

	Δv_Q S1 EXP. SDS/ Na_2SO_4	Δv_Q S1 SIM. SDS/ Na_2SO_4	T_1 S1 SDS/ Na_2SO_4	Δv_Q S2 EXP. SDS/ Li_2SO_4	Δv_Q S2 SIM. SDS/ Li_2SO_4	T_1 S2 SDS/ Li_2SO_4	$\Delta(\Delta v_Q)$ $\Delta v_{S1} - \Delta v_{S2}$
DHO	393 \pm 4		432 \pm 5	395 \pm 4		432 \pm 5	
C ₁₂	2337 \pm 10		388 \pm 5	2113 \pm 10		373 \pm 4	224
C ₁₁	7891 \pm 40	6604,5 \pm 64	149 \pm 5	7144 \pm 30	5482 \pm 64	175 \pm 5	747
C ₁₀	10496 \pm 40	9218,25 \pm 1275	113 \pm 7	9446 \pm 30	7905 \pm 77	139 \pm 5	1050
C ₉	12191 \pm 60	11067 \pm 77	102 \pm 7	11045 \pm 60	9690 \pm 77	113 \pm 8	1146
C ₈	13868 \pm 70	12533,25 \pm 464	98 \pm 11	12597 \pm 70	11092 \pm 77	74 \pm 11	1271
C ₇	13868 \pm 70	13387,5 \pm 179	98 \pm 11	12597 \pm 70	11985 \pm 77	74 \pm 11	1271
C ₆	14500 \pm 60	14063,25 \pm 166	85 \pm 11	13263 \pm 60	12750 \pm 77	69 \pm 12	1237
C ₅	14500 \pm 60	14280 \pm 179	85 \pm 11	13263 \pm 60	13132 \pm 127	69 \pm 12	1237
C ₄	15142 \pm 60	14445,75 \pm 242	55 \pm 15	13593 \pm 60	13387 \pm 64	59 \pm 14	1549
C ₃	15142 \pm 60	13961,25 \pm 217	55 \pm 15	13593 \pm 60	13005 \pm 102	59 \pm 14	1549
C ₂	15142 \pm 60	13999,5 \pm 242	55 \pm 15	13593 \pm 60	13132 \pm 77	59 \pm 14	1549
C ₁	15142 \pm 60	14573,25 \pm 128	55 \pm 15	13593 \pm 60	13770 \pm 64	59 \pm 14	1549
DeOH	17385 \pm 50		81 \pm 10	15816 \pm 50		142 \pm 10	

Tabla 5.4.1: Δv_Q calculados y experimentales junto con los T_1 de DHO, SDS-d25 y DeOH- α -d2 en la mesofase de SDS/ Na_2SO_4 y SDS/ Li_2SO_4

Una inspección de la Tabla 5.4.1 revela que en ambas mesofases, existen regiones de igual alineación a lo largo de las cadenas alifática del SDS, esto es, regiones con movilidad similar. Desde el carbono 1(C1) al carbono 4 (C4) encontramos la región más rígida de la bicapa, desde C5 al C6 y C7 a C8 la movilidad se incrementa y la alineación del resto de la cadena decrece sistemáticamente desde C9 a C12. Además, la Tabla 5.4.1 muestra que los Δv_Q para S1 son aproximadamente un 10% mas pequeños que para S1. El cambio de Na_2SO_4 por Li_2SO_4 disminuye el alineamiento de toda la cadena alifática de SDS con respecto al campo magnético. La Figura 5.4.2 muestra un gráfico de la diferencia ($\Delta v_Q(S1) - \Delta v_Q(S2)$) contra en número de carbono del SDS. Este muestra una clara discontinuidad que va desde C4 a C5. Esta observación sugiere fuertemente que el principal efecto del Li^+ sobre la estructura de la bicapa esta manifiesta en la movilidad de los primeros carbonos de la cadena del SDS, cercanos a la interfaz. Este resultado no es tan sorprendente, considerando que en este tipo de sistemas los contra-iones están distribuidos significativamente en la región de la interfaz. El Δv_Q para el DeOH también disminuye, mientras que el Δv_Q para el agua permanece constante.

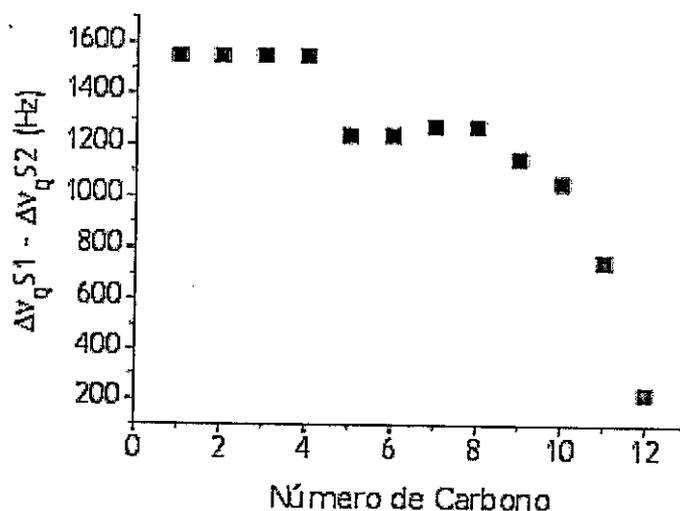


Figura 5.4.2: Diferencias de desdoblamiento cuadrupolar ($\Delta v_Q S1 - \Delta v_Q S2$) vs. Número de Carbono de la cadena alifática del SDS.

Estas observaciones concuerdan bien con un estudio previo acerca de los efectos del Li^+ en eritrocitos humanos y modelos de membrana en base a dimistioilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE)⁵⁰. Este trabajo muestra que Li^+ induce importantes perturbaciones estructurales sobre las cabezas polares de las bicapas de DMPC y DMPE, donde Li^+ interactúa con la región polar de la membrana incrementa la movilidad de las cadenas alifáticas.

Por otro lado, la incorporación de Li^+ en bicapas de dialquilfosfatidilserina (DPPS) induce la formación de micro-cristales de DPPS, aumentando significativamente la entalpía y la temperatura de transición desde la fase cristalina a una fase más desordenada de cristal líquido⁵¹.

Para la mesofase de este estudio, el reemplazo parcial de Na^+ por Li^+ disminuye el alineamiento general con el campo magnético. Esto, a lo menos, tiene dos orígenes diferentes: i) Modificaciones de la dinámica interna del agregado, o ii) diferencias en el tamaño de la micela. Para investigar como el reemplazo de Na_2SO_4 por Li_2SO_4 afecta el tamaño promedio de los agregados, en colaboración con el doctor Rodrigo Montesinos, de la Universidad Católica, se realizaron medidas del apagamiento de la fluorescencia, añadiendo pireno a diferentes concentraciones de N,N-dimetilanilina. Estos experimentos permiten estimar el número de agregación promedio de cada unidad del cristal líquido, esto es, el número de SDS y DeOH que forman la micela discoidal. Los resultados de estos experimentos son 246 ± 22 unidades para S1 y 227 ± 26 unidades para S2. Las diferencias observadas en el tamaño de estos agregados están dentro del error experimental. Esto sugiere fuertemente que las diferencias observadas en los Δv_Q no provienen de diferencias en los tamaños, si no a diferencias atribuidas a comportamientos dinámicos internos distintos en los agregados, debido, posiblemente, a interacciones diferentes entre el Li^+ y Na^+ con los componentes de la interfase, como sugiere la Figura 5.4.2.

Para buscar una origen a las diferencias observadas a nivel atómico, se realizaron cálculos de dinámica molecular para los sistemas S1 y S2. La Figura 5.4.3

muestra una imagen del sistema a los 99ns de trayectoria.

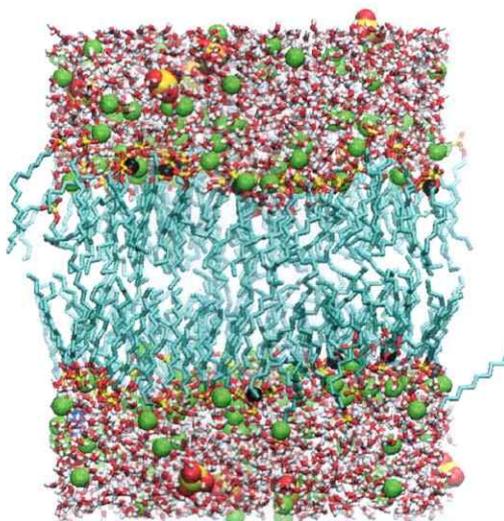


Figura 5.4.3: Imagen de S2 a los 99ns de trayectoria. Los átomos de azufre están en amarillo, Na^+ verdes, Li^+ negro, oxígenos rojo y las cadenas alifáticas en azul claro.

La primera propiedad calculada fueron los parámetros de orden, S_{CD} , que fueron obtenidos según:

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle \quad (33)$$

Donde θ corresponde al ángulo entre el enlace C-D y el campo magnético, y el promedio es sobre todas las orientaciones posibles. Así, el parámetro de orden obtenido de la simulación permite una comparación directa con los $\Delta\nu_Q$ obtenidos de las mediciones de RMN- ^2H a través de la expresión:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} A S_{CD} \quad (34)$$

Donde A es la constante cudrupolar y S_{CD} el parámetro de orden. La Tabla 5.4.1 contiene todos los desdoblamientos cudrupolares calculados. Ya que en la

simulación se ha empleado el modelo de átomos unidos para las cadenas alifáticas, el parámetro de orden de carbono 12 no es posible calcularlo, debido a que los átomos de hidrógeno (o deuterio) de las cadenas alifáticas están representados por un modelo conocido como “*attached atoms*”, estos se consideran formando parte de un sólo átomo con masa 14g/mol para el caso de un CH₂. Para el cálculo de los parámetros de orden, se hace necesario generar un vector que represente adecuadamente la movilidad de estos protones o deuterios. Para esto se utilizan los dos átomos inmediatamente vecinos al CH₂ en cuestión.. La Figura 5.4.4 muestra un gráfico con los desdoblamientos cuadrupolares calculados y medidos, a lo largo de la cadena hidrocarbonada para el SDS. Es de apreciar que el acuerdo entre los datos experimentales y teóricos es bastante satisfactorio. No solamente la tendencia de los valores experimentales está bien representada, sino que también la disminución general en la alineación, tanto para S1 como para S2. Estos resultados validan las simulaciones hechas y justifican el uso de propiedades que no han sido medidas experimentalmente, como forma de caracterizar el sistema y encontrar el origen de las diferencias observadas experimentales.

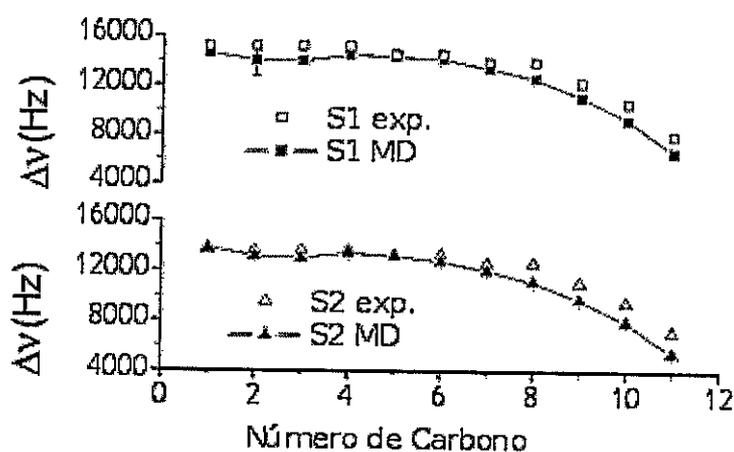


Figura 5.4.4: Desdoblamientos cuadrupolares experimentales y calculados para S1 y S2

La Figura 5.4.5 muestra la distribución de masa de S2. La densidad de todas las especies, incluyendo Na⁺ se encuentra en la escala de la izquierda, mientras que la

densidad de Li^+ , significativamente más pequeña, se encuentra en la escala de la derecha. De esta figura podemos apreciar que Li^+ está localizado mucho más al interior de la interfaz que Na^+ , incluso podemos ver como el litio no alcanza a distribuirse en la región acuosa. Una vez que está allí, el potencial generado por los otros contra-iones se opone a la difusión a la región acuosa, y se acumula. Por otro lado, Na^+ está distribuido tanto en la región de la interfaz como en la región acuosa. Por lo tanto, el origen de las diferencias observadas entre S1 y S2 deberían provenir de diferencias en las interacciones electrostáticas que ocurren entre los contra-iones y los componentes de la interfaz. Consecuentemente calculamos la distribución de las densidades de carga a lo largo del eje z de la caja, incluyendo el momento dipolar de las moléculas orientadas. Estos resultados se muestran en la Figura 5.4.6. Esta figura muestra un solapamiento entre la distribución del Li^+ y el lado positivo del momento dipolar de las moléculas de agua orientadas. La interacción electrostática repulsiva entre estas dos especies debería incrementar la energía del sistema. En efecto, los valores calculados para las interacciones electrostáticas de Coulomb de corto alcance para $\text{Li}^+\text{-H}_2\text{O}$ (1 nm de cut-off) es +183kJ/mol, dando una interacción repulsiva. Por otro lado, la distribución de Na^+ incluye la región acuosa y la interacción $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$ calculada es de -9115kJ/mol, atractiva. Además, las interacciones electrostáticas para SDS-ion es de -3079kJ/mol para Na^+ y -1699kJ/mol para Li^+ . Por lo tanto, el reemplazo de Na_2SO_4 por Li_2SO_4 incrementa las repulsiones electrostáticas en la interfaz, disminuyendo el alineamiento de los componentes del agregado con el campo magnético. Estas observaciones sugieren fuertemente que estas interacciones electrostáticas repulsivas deberían ser las responsables para las diferencias observadas.

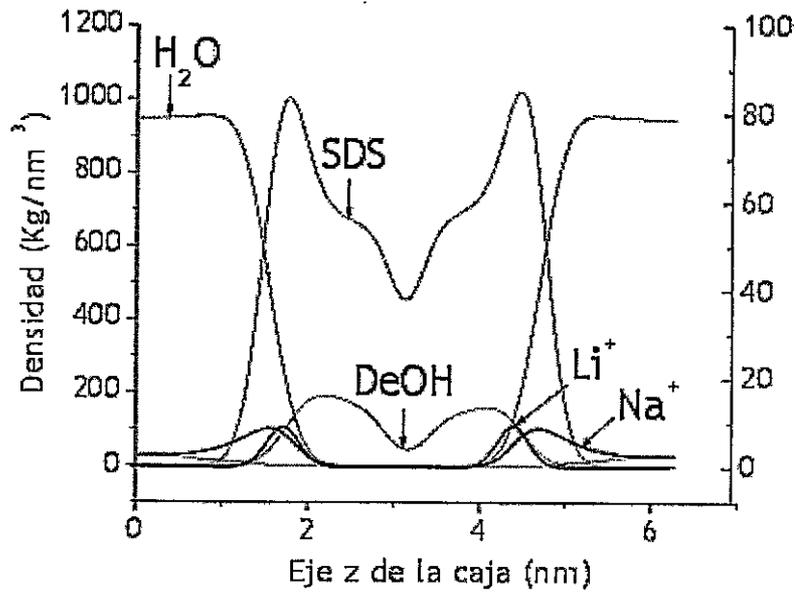


Figura 5.4.5: Perfil de densidad de masa a lo largo del eje z de la caja para todos los componentes de S2.

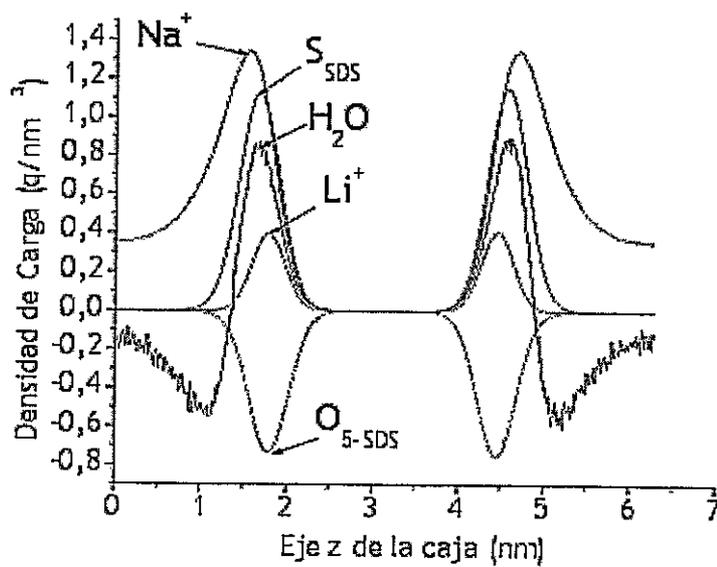


Figura 5.4.6: Distribución de la densidad de carga para Na^+ , Li^+ , el azufre del SDS, el oxígeno adyacente al primer carbono del SDS ($\text{O}_{5\text{-SDS}}$) y el Agua, a lo largo del eje z de la caja para la mesofase S2.

5.5 Conclusiones

El reemplazo de Na_2SO_4 por Li_2SO_4 no modifica el tamaño de los agregados, si no que disminuye el alineamiento de las cadenas alifáticas con el campo magnético. Mientras el Na^+ está distribuido en la región acuosa y la interfaz, Li^+ se acumula profundamente en el interior de la interfaz, interactuando con el lado positivo del momento dipolar de las moléculas de agua, orientadas en esta región. Además, las repulsiones entre las cabezas polares de los SDS son mucho mayores en presencia de Li^+ , introduciendo mayor desorden.

6 Distribución y dinámica de dos derivados de quinona sobre cristales líquidos liótropos. Un estudio en base a ^2H -RMN y Dinámica Molecular.

En este trabajo presentamos un estudio en base a ^2H -NMR y dinámica molecular, acerca de la orientación, dinámica y distribución de dos derivados de quinona, la 4,4-dimethyl-1,4,5,8,9,10-hexahydroanthracene-1,9,10-trione(I) y la 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-1,4,5,8-tetrahydroanthracen-1-one(II), selectivamente deuteradas (Figura 6.1), sobre el cristal líquido liotropico nematico discoidal hecho en base a dodecilsulfato de sodio, decanol y Na_2SO_4 disuelto en agua. Se realizaron medidas de desdoblamiento cuadrupolares ($\Delta\nu_Q$) y tiempos de relajación longitudinal (T_1) de deuterio usando ^2H -RMN. De éstos valores fue posible observar que ambas moléculas posee diferentes desdoblamiento cuadrupolares entre ambos sistemas. Considerando que los tiempos de relajación longitudinal son los mismos para ambas y que la mayor contribución a esta propiedad es el movimiento molecular, logramos concluir que las diferencias en los desdoblamiento cuadrupolares provienen de diferentes orientaciones promedio en el sistema. Por ultimo, para obtener información a nivel atómico, realizamos cálculos de dinámica molecular empleando el software GROMACS 4.5. A partir de estos resultados, concluimos que II interactúa fuertemente con el agregado a través de la formación de puentes de hidrógeno con el decanol, desplazándolo hacia el interior del agregado y permitiéndole mayor movilidad, lo cual esta en concordancia con el aumento de T_1 medido experimentalmente. Además, esta interacción favorece la difusión de iones Sodio hacia el interior de la mesofase.

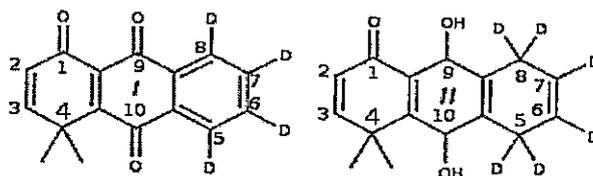


Figura 6.1: De izquierda a derecha: 4,4-dimethyl-1,4,5,8,9,10-hexahydroanthracene-1,9,10-trione (I) y 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-1,4,5,8-tetrahydroanthracen-1-one (II).

6.1 Preparación de la Muestra

La síntesis de las moléculas deuteradas fueron realizadas mediante una metodología ya descrita¹⁷, remplazando el 1,3-butadieno por uno completamente deuterado, disponible comercialmente (Sigma-Aldrich). La ruta sintética es resumida en la Figura 6.1.1. Tanto SDS-h₂₅ como SDS-d₂₅ fueron adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich) y usados directamente.

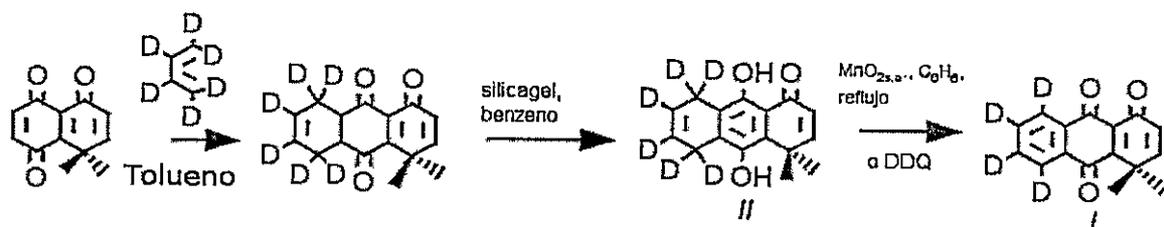


Figura 6.1.1: Síntesis de I y II

La mesofase fue preparada mezclando 47,3 mg de Na₂SO₄, 0,5140 g de SDS-h₂₅, 0,010 mg de SDS-d₂₅, 108 µL de DeOH (20% v/v DeOH-d₂), 1 mL de H₂O (0,2% v/v de DHO). Esta mezcla fue separada en tres partes, una sin molécula huésped (S2), una contenido a II (S3), la otra a I (S4). Estas muestras fueron agitadas hasta lograr una solución homogénea de apariencia uniforme, la que fue caracterizada empleando microscopía de luz polarizada.

6.2 Determinación de las Señales

6.2.1 Asignaciones para la Señales de I y II

Para estudiar el comportamiento de los huéspedes en el agregado y su efecto sobre la integridad de la mesofase, es necesario asignar inequívocamente las señales de las moléculas agregadas. Para esto es recomendable evitar el recubrimiento de las señales provenientes de las moléculas I o II deuteradas, y las demás señales del espectro. Con este propósito se prepararon 2 muestras, una conteniendo SDS-d₂₅ y molécula huésped sin deuterar y la otra conteniendo SDS-h₂₅ y molécula huésped deuterada, evitando así el recubrimiento de las señales interés. La Tabla 6.2.1 resume este procedimiento.

Realizando mediciones de la razón de integrales entre un espectro concentrado y uno diluido, y suponiendo que la cantidad formada de la fase inducida es proporcional a la cantidad de *II* agregada, fue posible asignar los desdoblamientos adecuadamente. Para diferenciar entre los deuterios en posiciones orto y meta del anillo deuterado, recurrimos a las integrales bajo la curva de los espectros correspondientes a la muestra con *II*. Para asignar los desdoblamientos cuadrupolares de la quinona *I* se emplearon los desplazamientos químicos provenientes del espectro $^1\text{H-RMN}$, que deberían comportarse de manera análoga al espectro $^2\text{H-RMN}$ debido a que poseen la misma densidad electrónica. La Figura 6.2.1 muestra los espectros para los experimentos de *II*.

EXP A	EXP B
SDS-d ₂₅	SDS-h ₂₅
II-h ₆ o I-h ₄	II-d ₆ o I-d ₄
DeOH-d ₂	DeOH-d ₂
DHO	DHO
Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄

Tabla 6.2.1: SDS-h₂₅: Dodecilsulfato de sodio no deuterado. SDS-d₂₅: Dodecilsulfato de sodio deuterado a lo largo de toda la cadena. DeOH-d₂: Decanol deuterado en el carbono adyacente al grupo hidroxilo. DHO: Agua deuterada. Na₂SO₄: Sulfato de sodio anhidro. II-h₆: Hidroquinona no deuterada. II-d₆: Hidroquinona deuterada. I-h₄: Quinona no deuterada. I-d₆: Quinona deuterada.

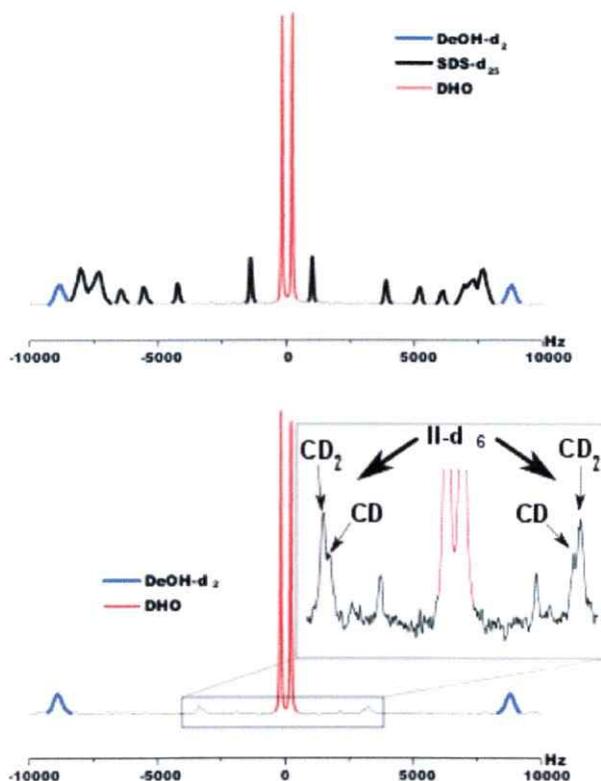
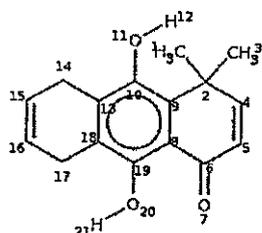


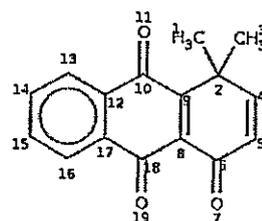
Figura 6.2.1: Superior: EXP A, Inferior: EXP B

6.3 Dinámica Molecular

Para los cálculos de trayectoria en equilibrio, se emplearon los mismos parámetro y coordenadas iniciales empleadas en la dinámica molecular para el sistema con el contra-ion Sodio del Capítulo 5. A estos sistemas se agregaron 6 moléculas de *I* o *II*, 3 por cada monocapa. Las cargas empleadas para cada molécula se obtuvieron de un calculo ab initio Hartree Fock con una base 6-31G. Estas se muestran a continuación:



Carga parcial			
1	0,083	11	-0,788
2	-0,071	12	0,461
3	0,082	13	-0,002
4	0,096	14	0,012
5	-0,045	15	0,002
6	0,587	16	0,015
7	-0,65	17	0,088
8	-0,227	18	-0,09
9	-0,015	19	0,424
10	0,3	20	-0,787
		21	0,525



Carga parcial			
1	-0,104	10	0,652
2	0,544	11	-0,52
3	-0,105	12	-0,114
4	-0,019	13	0,048
5	-0,235	14	0,008
6	0,765	15	0,038
7	-0,542	16	0,043
8	-0,275	17	-0,135
9	-0,214	18	0,657
		19	-0,492

Para calcular el potencial de fuerza media (PFM), se uso el método de Umbrella Sampling³⁵. En el método de Umbrella Sampling la energía se obtiene desde un conjunto de simulaciones en equilibrio. Un potencial armónico externo o potencial de sesgo actúa sobre el centro de masa de un átomo o molécula, para restringir un cierto grado de libertad. En cada dinámica, llamadas ventana, la molécula huésped es restringida a permanecer a una cierta distancia desde el centro de la bicapa. El potencial de sesgo usado para restringir la molécula en cada ventana o dinámica fue de $3000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$. La distancia entre la molécula huésped y el centro de la bicapa fue cambiada $0,1 \text{ nm}$ de forma sucesiva de ventana en ventana. La variación de la distancia fue desde la región acuosa ($3,1 \text{ nm}$) hasta el centro de la bicapa (0 nm). Para combinar los resultados de todas las simulaciones y producir el perfil de

energía libre, se empleo el método WHAM³⁶. Para realizar este calculo se emplearon 31 simulaciones.

6.4 Resultados Experimentales y Dinámica Molecular

Carbono	S2 sin II		S3 con II		Diferencia		S2 sin II		S3 con II		Diferencia	
	$\Delta\nu_Q$	Err \pm	$\Delta\nu_Q$ (Hz)	Err \pm	S3-S2	Err \pm	T_1	Err \pm	T_1	Err \pm	S3-S2	Err \pm
1	15142	50	15720	50	578	100	55	15	63	14	8	29
2	15142	60	15720	50	578	110	55	15	63	14	8	29
3	15142	60	15720	50	578	110	55	15	63	14	8	29
4	15142	60	15720	60	578	120	55	15	63	14	8	29
5	14234	60	14659	60	425	120	85	11	76	12	-9	23
6	14234	60	14659	60	425	120	85	11	76	12	-9	23
7	14234	70	14659	60	425	130	85	11	76	11	-9	22
8	13868	70	14282	70	414	140	98	11	88	11	-10	22
9	12191	60	12609	60	418	120	102	7	105	8	3	15
10	10496	40	10799	40	303	80	113	7	128	5	15	12
11	7891	40	8143	40	252	80	149	5	164	5	15	10
12	2337	10	2409	10	72	20	388	5	394	4	6	9
DeOH	17285	50	17714	50	429	100	102	10	126	11	24	21
HDO	393	5	400	5	7	10	432	5	433	5	1	10
II (2)			6271	15					9,4	12		
II (4)			6601	20					11,2	10		

Carbono	S2 sin I		S4 con I		Diferencia		S2 sin I		S4 con I		Diferencia	
	$\Delta\nu_Q$	Err \pm	$\Delta\nu_Q$ (Hz)	Err \pm	(S4-S2)	Err \pm	T_1	Err \pm	T_1	Err \pm	(S4-S2)	Err \pm
1	15560	50	16087	50	527	100	66	15	57	14	-9	29
2	15560	60	16087	60	527	120	66	15	57	14	-9	29
3	15560	60	16087	60	527	120	66	15	57	14	-9	29
4	15560	60	16087	60	527	120	66	15	57	14	-9	29
5	14524	60	14780	60	256	120	72	11	65	12	-7	23
6	14524	60	14780	60	256	120	72	11	65	12	-7	23
7	14524	70	14780	70	256	140	72	11	65	11	-7	22
8	14302	70	14526	70	224	140	90	11	75	11	-15	22
9	12490	60	12701	60	211	120	107	7	88	8	-19	15
10	10734	40	10918	40	184	80	144	7	114	5	-30	12
11	8096	40	8211	40	115	80	169	5	157	5	-12	10
12	2391	10	2431	10	40	20	377	5	402	4	25	9
DeOH	17601	50	17853	50	252	100	110	10	113	11	3	21
HDO	411	5	410	5	-1	10	426	5	438	5	12	10
I externo			14387	5					9,8	12		
I interno			7652	50					10,6	10		

Tabla 6.4.1: Desdoblamientos cuadrupolares y tiempos de relajación longitudinal para todos los experimentos realizados

La tabla 6.4.1 resume los valores medidos de desdoblamiento cuadrupolar y tiempos de relajación longitudinal para las especies deuteradas, SDS, DeOH, H₂O, I y II. La columna llamada diferencia es la resta entre los desdoblamientos cuadrupolares del sistema con y sin molécula. A partir de estos datos podemos observar que al agregar cualquiera de las dos moléculas en estos sistemas, aumenta el valor de desdoblamiento cuadrupolar para SDS y DeOH, mas no así para el agua. La Figura 6.4.1 muestra el gráfico de la diferencia entre los $\Delta\nu_Q$ para el sistema con

y sin *II* en función del número de carbono del SDS. Este gráfico muestra una notoria discontinuidad que va desde el carbono C4 al C5. A partir de este resultado observamos que el efecto de *II* es sobre toda la cadena del SDS, pero con mayor intensidad en los primeros 4 carbonos. Por lo tanto, podemos decir que esta molécula no solo se encontraría en zonas de la interfaz del sistema si no que logra introducirse hasta regiones un poco más internas del agregado.

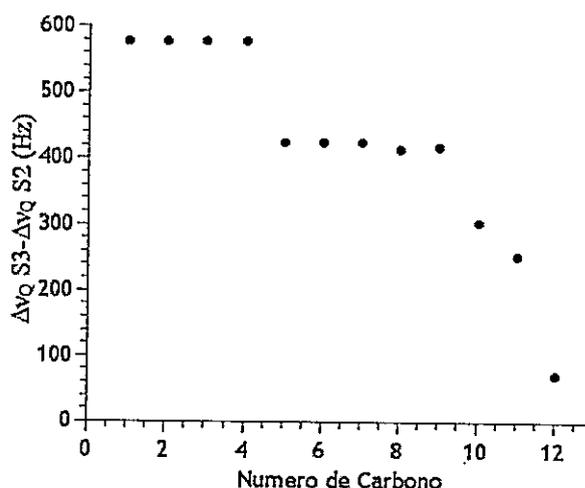


Figura 6.4.1: Diferencia de desdoblamiento cuadrupolar en función del número de carbono de la cadena alifática del SDS para *II*.

La Figura 6.4.2 muestra los resultados de las diferencias entre los desdoblamientos cuadrupolares para el sistema sin *I* y el sistema con *I*. Podemos ver que la diferencia entre el carbono 4 y 5 es mucho más grande que para *II*, reflejando, específicamente, una marcada perturbación de estos primeros cuatro

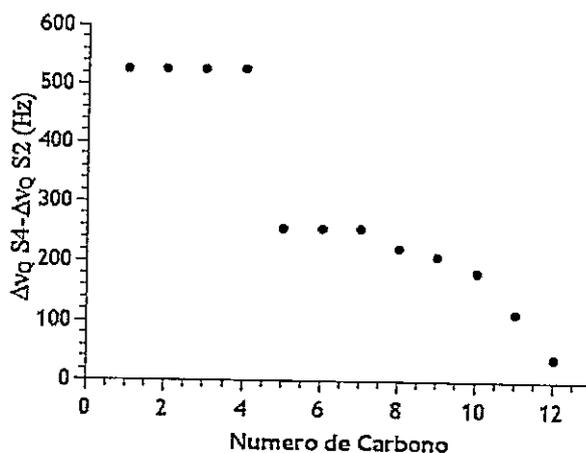


Figura 6.4.2: Diferencia de desdoblamiento cuadrupolar vs el número de carbono de la cadena alifática del SDS para *I*.

carbonos. Por otro parte, al comparar la magnitud en los incrementos de $\Delta\nu_Q$ provocados por la inserción de cualquiera de las moléculas huésped, *II* en comparación con *I*, provoca mayores aumentos en los desdoblamientos cuadrupolares, provocando una perturbación generalizada mucho más notoria sobre los componentes de la membrana. Este último resultado expresa la posibilidad de hallar, en el seno de la región hidrofóbica, muchas más especies de *II* que de *I*. Además, dado que *II* causa un mayor aumento en los desdoblamientos cuadrupolares, podemos decir que esta molecular provoca un mayor incremento en el grado de alineación de los componentes de la bicapa con el campo magnético.

Para estimar la movilidad de las especies deuteradas, se midieron los tiempos de relajación longitudinal. La Tabla 6.4.1 muestra estos resultados. A partir de los resultados de las diferencias en los T_1 , para SDS no podemos precisar una diferencia clara debido a que muchos de estos valores se encuentran dentro del error experimental; al agregar *I* observamos diferencias reales en los últimos cuatro carbonos donde vemos una disminución de T_1 exceptuando el último metilo de la cadena alifática. Para *II* los efectos reales son observables en los últimos tres carbonos donde notamos un leve incremento en el valor de T_1 a medida que nos acercamos al último metilo. A partir de esto podemos ver que ambas moléculas tendrían efectos contrarios sobre la movilidad interna del mismo agregado molecular, donde una estaría incrementando la movilidad (*II*) y la otra la estaría disminuyendo (*I*).

El desdoblamiento cuadrupolar depende de la orientación y la movilidad del eje principal del gradiente de campo eléctrico, en nuestro caso el enlace C-D a través de la ecuación $\Delta\nu = (3/2)Q \cdot S_a$ donde Q es la constante de acoplamiento cuadrupolar, cuyo valor para enlaces C-D de cadenas alifáticas es de 170kHz y S_a es el parámetro de orden el cual depende tanto de la movilidad como del ángulo que forma el enlace C-D con el campo magnético y cuya fórmula es $S_a = 1/2 \langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle$. Si consideramos un cálculo de la variación del ángulo θ a partir de los $\Delta\nu_Q$ del SDS en presencia y en ausencia de *II*, nos da como resultado un cambio de $-0,003^\circ$ para C1

y $-0,0004^\circ$ para C12. Este resultado refleja como pequeñas variaciones en el ángulo θ , al agregar II, provocan fácilmente diferencias en los $\Delta\nu_Q$ de hasta 500 Hz.

Ahora, observemos los cambios que produce I y II en los T_1 del agua y DeOH. La Tabla 6.4.1 resume los resultados para este experimento. Podemos observar que II incrementa el valor de T_1 para DeOH traduciéndose en un aumento de la movilidad de este, mas no así para el agua. Como DeOH es un componente interno de la bicapa, estos resultados confirman la presencia de II en regiones anisotropicas del sistema, como es la interfaz y el interior de la membrana, y su fuerte interacción con decanol. Para que decanol aumente su valor de T_1 debe moverse a zonas con mayor movilidad, como es el interior de la bicapa, por que lo que II no solo interactúa fuertemente con DeOH, si no que induciría el desplazamiento de DeOH hacia zonas más internas del agregado.

Los resultados para I muestran un efecto contrario a II, donde observamos una variación en el T_1 del agua, mas no para el decanol. Estos resultados indican que la posición más estable de I estaría en la región de la interfaz, donde tiene mayor probabilidad de interactuar con el agua. Además, de estos resultados se desprende que I se encontraría en zonas de baja concentración de decanol y en zonas de alta concentración de SDS, debido a los cambios de T_1 observados para esta ultima especie. La causa de este comportamiento la podemos encontrar en las distintas capacidades que cada molécula tiene para formar puentes de hidrógeno. I solo tiene la posibilidad de aceptar protones a través de sus grupos carbonilos, a diferencia de II que posee la capacidad de ser tanto aceptor como donador de protones a través de sus dos grupos OH.

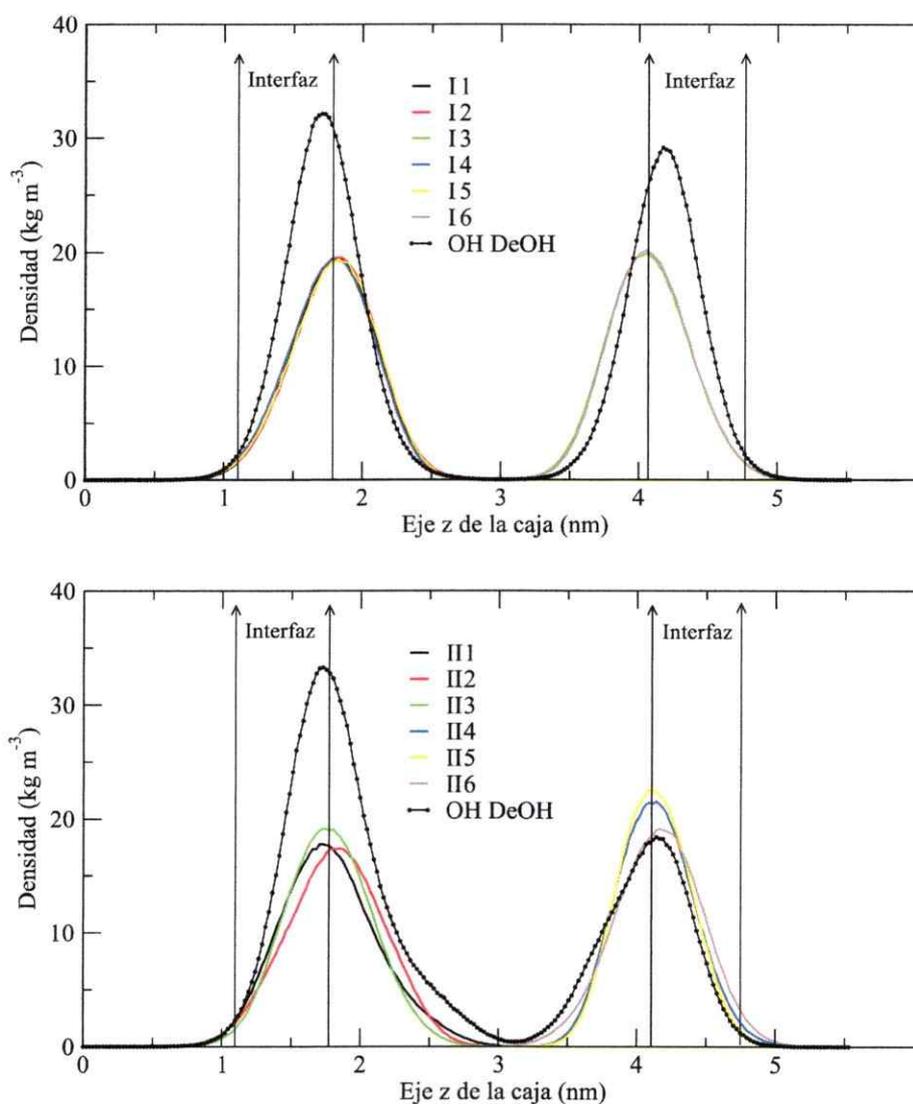


Figura 6.4.3: Densidades de masa a lo largo del eje z. Superior: I, Inferior: II.

En orden de buscar un origen a las diferencias observadas a nivel atómico, se realizaron cálculos de dinámica molecular para los sistemas S3 y S4 con I y II respectivamente. La Figura 6.4.3 muestra un gráfico de las densidades de masa para cada una de las moléculas huésped y para el grupo OH del decanol. Podemos ver que ambas moléculas se encuentran distribuidas entre la región de la interfaz y el interior de la membrana ambas por su carácter anfipático, dado por los momentos dipolares de sus grupos funcionales. Para decanol podemos observar diferencias en su distribución hacia el interior de la membrana, donde es posible

apreciar que en el caso de *II*, la densidad del grupo OH en el centro de la bicapa no decae a cero.

La Figura 6.4.4 muestra la trayectoria a lo largo del eje *z* para cada una de las moléculas y el grupo OH del decanol. Podemos observar diferencias clara sobre el efecto que tiene cada una de las moléculas sobre el sistema. Para *I*, la movilidad a lo largo del eje *z* del sistema es prácticamente constante, dentro de una región acotada donde no existen mayores fluctuaciones en la movilidad (entre 1,5-2,1nm y 3,8-4,3nm a lo largo del eje *z* de la bicapa), en acuerdo con los resultados experimentales. Así también, vemos cómo el grupo OH del decanol se mueve dentro de un intervalo constante a lo largo del eje *z* (entre 1,5-2,1nm y entre 3,6-4,6nm). Para el caso de *II* podemos observar un movimiento sincronizado con DeOH y un desplazamiento conjunto hacia regiones internas de la membrana (estos rangos de

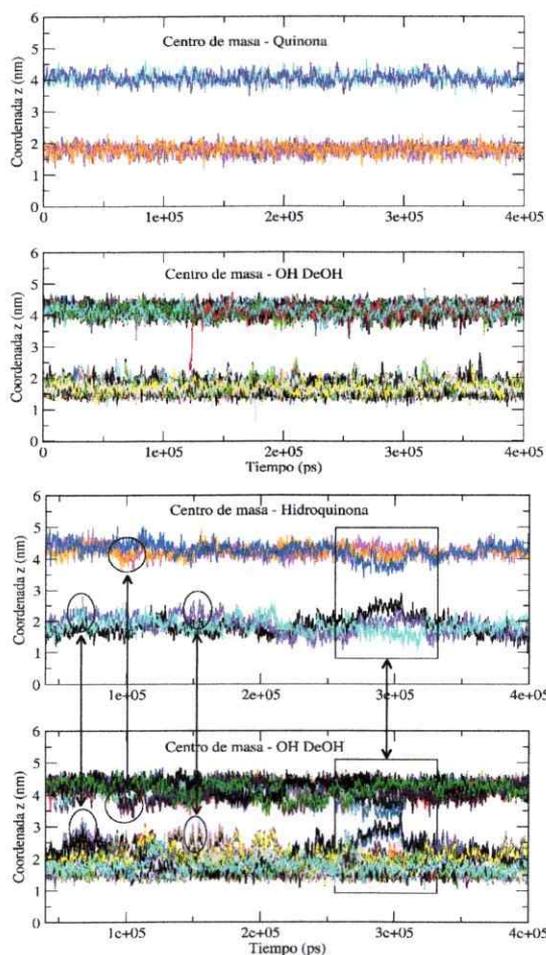


Figura 6.4.4: Trayectorias de los centros de masa del grupo OH del decanol, *I* y *II*

tiempos se muestran señalados a través de flechas).

Por otra parte hemos calculado el número de veces que se repite la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas huésped con el agua y decanol, y estos resultados los hemos expresado en términos de porcentajes, donde el 100% es el número total de frames o cuadros de la trayectoria. Esto se muestra en la Figura 6.4.5.

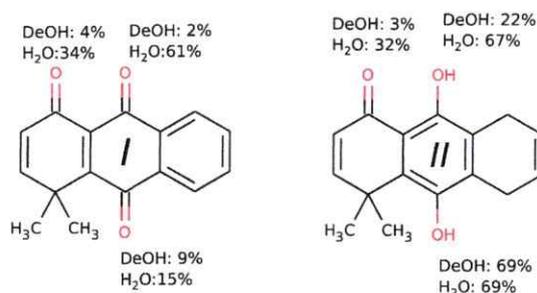


Figura 6.4.5 Puentes de Hidrógeno entre I o II con decanol y agua

A partir de estos resultados encontramos que las interacciones más relevantes se encuentran entre los OH de II con el decanol y agua, y que para I solo son relevantes las interacciones con el agua. Además observamos la formación de dímeros entre las hidroquinonas y la formación de puentes de hidrógeno entre los

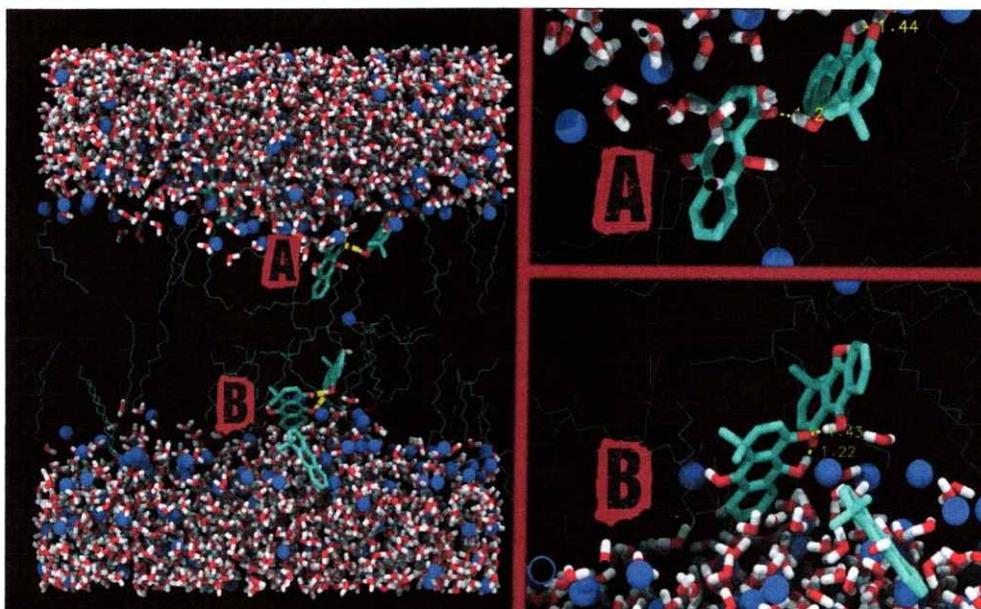


Figura 6.4.6 Formación de dímeros entre las hidroquinonas y la formación de puentes de hidrógeno entre los dímeros y decanol

dímeros y decanol, Figura 6.4.6. Estas interacciones son las que dan pie a la sincronía en la movilidad que observamos entre decanol y II. La formación del dímero, sumada la interacción con decanol a través de puentes de hidrógeno no solo provoca una mayor perturbación en la bicapa, si no que hace mucho mas fácil la difusión de iones sodio hacia el interior de esta. La Figura 6.4.7 muestra los puentes de hidrógeno en los que participa II junto al decanol.

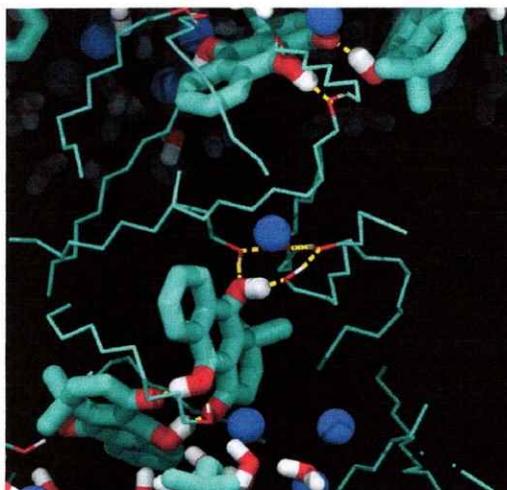


Figura 6.4.7: Puentes de Hidrógeno entre II y decanol.

La Figura 6.4.8 muestra la trayectoria de todos los iones sodio a lo largo del eje z de la caja de simulación. En el caso del sistema con II, observamos la

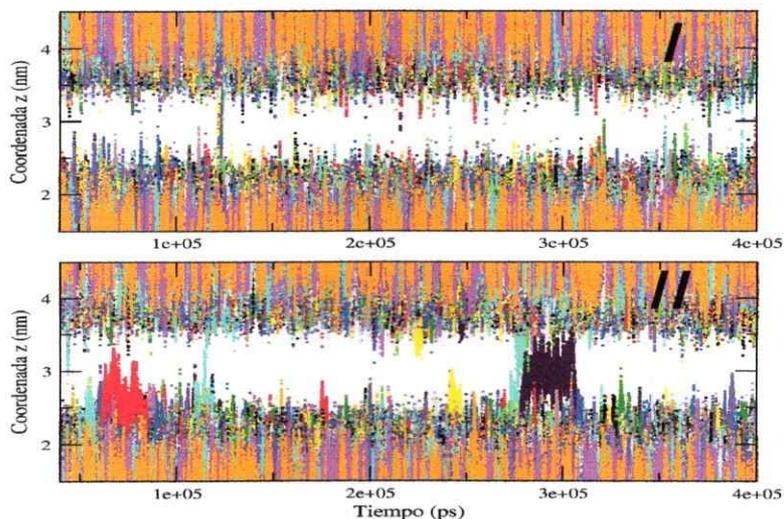


Figura 6.4.8: Trayectoria iones sodio, sistema I y II

existencia de intervalos de tiempo donde Na^+ permanece en el interior de la bicapa, coincidiendo con el desplazamiento de *II* hacia zonas internas del agregado junto con decanol (Figura 6.4.4). A partir de la Figura 6.4.7 podemos observar que esta difusión del sodio hacia el interior de la bicapa esta facilitada por la interacción del sodio con los oxígenos del decanol y con el dímero, que además logra introducir a las hidroquinonas hasta el interior de la bicapa.

Con el fin de estimar el potencial de cruce de la membrana por parte de *I* y *II*, cada una por separado, hemos realizado cálculos de energía libre de Gibbs a través de la técnica Umbrella Sampling³⁵, implementada en el programa GROMACS. La Figura 6.4.9 muestra los perfiles de energía libre. El gráfico superior es el perfil de energía libre con respecto a la posición del centro de masa de cada molécula a lo largo del eje *z* del sistema (eje normal al plano de la bicapa), donde el valor cero corresponde al centro de la bicapa. El gráfico inferior es el perfil de densidad de masa para SDS. El primer mínimo observable se encuentra a 1,4 nm del centro de la bicapa correspondiente a *I* y su valor es de -28,5 kJ/mol. El segundo mínimo es de -29,1 kJ/mol a 1,2 nm del centro de la bicapa y corresponde a *II*. Por otra parte, ambas moléculas presentan un máximo de energía libre en el centro de la bicapa; +2,77 kJ/mol para *I* y +3,54 kJ/mol para *II*. A partir de estos resultados podemos apreciar que ambas moléculas, en el equilibrio, llegaran a regiones cercanas a la interfaz y el centro hidrofóbico, siendo capaces, perfectamente, de afectar a los primeros 4 carbonos de la membrana.

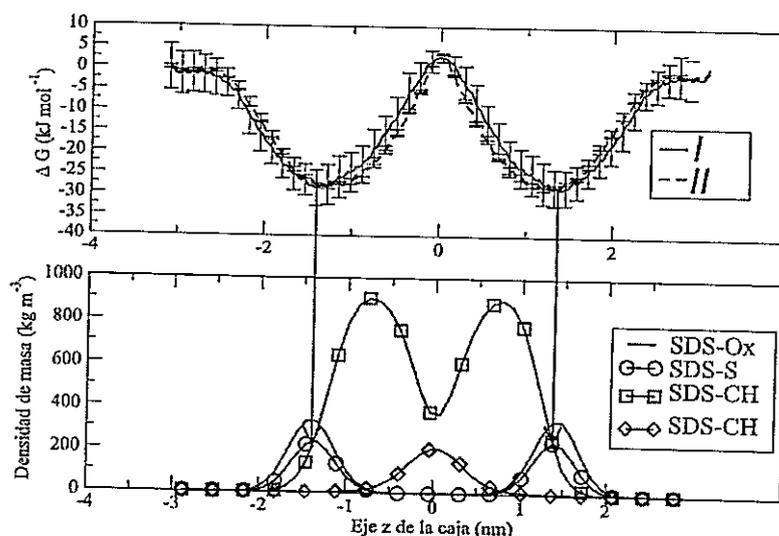


Figura 6.4.9 Perfil de energía libre para *I* y *II*

6.5 Conclusiones

Ambas moléculas se encuentran en regiones anisotrópicas del sistema, entre la región de la interfaz y la zona hidrocarbonada. *I* permanece mucho más estable dentro de la región de la interfaz interactuando con el agua a través de puentes de hidrógeno. *II* posee un ancho de distribución mucho más amplio teniendo la posibilidad de llegar hasta el centro de la región hidrofóbica a través de la formación de dímeros. Si bien, a través del cálculo de energía libre de Gibbs *II* requiere de energía para poder localizarse en el centro de la bicapa, la formación de dímeros y su interacción con el decanol, sería un posible mecanismo para que esta molécula supere esta barrera energética y logre también moverse por esta región del sistema.

La formación de dímeros entre las hidroquinonas y su interacción con decanol a través de puentes de hidrógeno causa el desplazamiento conjunto de estas dos especies hacia el interior de la membrana. Estas interacciones también favorece la difusión de iones Sodio hacia el interior del centro hidrocarbonado, provocando los cambios de orientación y movilidad reflejados a partir de los desdoblamientos cuadrupolares y T_1 .

7 Apéndice

7.1 Sobre la actividad biológica de un conjunto de derivados de hidroquinonas que inhiben la respiración celular. Un estudio teórico

En colaboración con el Dr. Jorge Soto Delgado de la Facultad de Química de la Pontificia Universidad Católica de Chile, hemos realizado un estudio teórico acerca de las condiciones previas que facilitan la incorporación de una serie de derivados de quinona a la membrana celular⁵². A partir de cálculos de energía libre de formación y energías de solvatación, de las distintas especies estudiadas, se concluyó que las variables que juegan un papel importante a la hora de penetrar la membrana biológica son: el estado de protonación de la especie y su energía de desolvatación.

El estado de protonación de la especie juega un papel importante al momento de cruzar la membrana, debido a que especies neutras o cargadas positivamente se acumulan con menor dificultad en el interior de la célula debido a que el potencial eléctrico interior de ella es siempre negativo con respecto al exterior⁵³. Este fenómeno también es observable a nivel de la mitocondria⁵⁴.

Una función importante de una membrana biológica es servir como una barrera para el mundo exterior. Los resultados de este estudio mostraron que la energía libre de desolvatación de los derivados neutros de hidroquinona es un proceso importante para el cruce de la membrana.

Por último, una vez cruzada la membrana, la concentración de especies radicalarias semiquinonas deberían ser el factor principal en el control de la actividad biológica. Estos resultados se encontraron en acuerdo con los resultados experimentales de inhibición de la respiración celular³⁷.

A continuación se muestra la portada de esta publicación.



On the mechanism of biological activity of hydroquinone derivatives that inhibit tumor cell respiration. A theoretical study



Jorge Soto-Delgado^{a,†}, Víctor Bahamonde-Padilla^b, Ramiro Araya-Maturana^c, Boris E. Weiss-López^{b,†}

^a Departamento de Química Orgánica, Facultad de Químicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 306, Santiago, Chile

^b Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

^c Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile

article info

Article history:

Received 12 February 2013

Received in revised form 8 March 2013

Accepted 9 March 2013

Available online 18 March 2013

Keywords:

Hydroquinone
Antitumoral mechanism
Antitumoral drugs
Tumor cell respiration
DFT calculation

abstract

A simple mechanism to understand the biological activity of a series of hydroquinone derivatives is proposed. To validate this proposition Gibbs free energies of formation of the different species involved were calculated. The calculations were performed using density functional theory (DFT) at B3LYP/6-31+G(2df,p) level of theory, including solvation effect. The results show that two important variables to examine are the equilibrium phenol-phenoxide and the solvation energy of neutral species, since the balance between both variables affects the capability of the molecules to cross membranes. Once the molecule crossed the membrane, the formation of radical species shows a qualitative correlation with the magnitude of IC_{50} values. This provides a reasonable criterion to search for more efficient anticancer drug.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Anti-oxidant properties of polyphenols are well known. Despite this, on certain particular conditions they also present pro-oxidant activity [1–3]. The way by which these molecules react, as anti-oxidant or pro-oxidants, depends on several factors, such as the concentration of chemical species capable to drive the electron transfer processes, the capability of the molecule to form complexes with redox active metals, the pH of the medium and the molecular redox potential [4].

The full oxidation process of hydroquinones and catecols to quinones, present a two electron mechanism initiated by a one electron transfer [5]; these redox properties have been associated to their pro-oxidant activity, which can accelerate oxidative damage to either DNA or proteins and carbohydrates. It has been reported that they also present antiproliferative and cytotoxic properties in several tumor cell lines [6–8], through the formation of the semi-quinone radical [9]. In this context, our group has been working on the synthesis, mechanism of formation and tumor cell respiration inhibition of quinone and hydroquinone derivatives [10–12].

Mitochondria have been suspected to play a crucial role in cancer genesis and for this reason it has become an important target

for cancer therapy [13–16]. Consequently, there is a high probability that the active site of these molecules is located inside the mitochondria [17]. Therefore, in order to reach their targets, these derivatives have to cross several membranes; however, the probability that non-protonated polyphenols cross membranes is low.

Furthermore, due to the existence of a proton concentration gradient, there is a difference in pH across the peripheral and internal mitochondrial membranes, generating a potential difference. Weak acids, possibly protonated in acid medium, diffuse inside more basic compartments of the system, become de-protonated and concentrate there [18]. This process is selective and may help to deliver anti-cancer molecules inside the mitochondria. In healthy tissue the interstitial pH is neutral, whereas in cancer tissue it is acidic, mainly because of the excessive glycolysis, used as a source of ATP [19–21]. Recently, weak acids have been successfully employed as anti-cancer agents [22–25].

Thermodynamic and electronic properties of important biological processes are sometimes difficult to evaluate experimentally. Besides, quantum chemical methods have been widely used to predict many of these properties. For instance, few years ago a series of high level ab initio and semi-empirical calculations were performed to model four possible reaction pathways, between either 2-Butene-1,4-dione or p-benzoquinone with triplet state molecular oxygen [26]. More recently, a series of density functional theory (DFT) calculations, at different levels of sophistication, were performed to study the stability and reaction pathways of *o*-, *m*- and *p*-dihydroxybenzene derivatives, their semiquinone radicals

[†] Corresponding authors. Tel.: +56 2 3544429; fax: +56 2 3544744 (J. Soto-Delgado), tel.: +56 2 9787342; fax: +56 2 2713888 (B.E. Weiss-López).
E-mail addresses: jorsoto@qu.uchile.cl (J. Soto-Delgado), bweiss@uchile.cl (B.E. Weiss-López).

7.2 Portadas de publicaciones derivadas de esta tesis

J. Chil. Chem. Soc., 57, Nº 3 (2012)

LOCATION, ORIENTATION AND DYNAMICS OF TWO MOLECULES WITH MITOCHONDRIAL ACTIVITY DISSOLVED IN ANIONIC LYOMESOPHASE. A ^2H -NMR AND MD STUDYVÍCTOR E. BAHAMONDE-PADILLA¹, MAXIMILIANO MARTÍNEZ-CIFUENTES², DANIEL MUÑOZ-MASSON³, ÁLVARO RUIZ⁴, HERNÁN AHUMADA³, RAMIRO ARAYA-MATURANA³, JORGE SOTO-DELGADO⁴, AND BORIS E. WEISS-LÓPEZ^{1*}¹ Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Casilla 653, Santiago, Chile,² Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica, Casilla 233, Santiago 1, Chile,³ University of Glasgow, School of Chemistry, Glasgow G12 8QQ, U.K.⁴ Universidad Técnica Federico Santa María, Departamento de Química, Casilla 110-V, Valparaíso, Chile.

(Received: March 7, 2012 - Accepted: April 25, 2012)

ABSTRACT

4,4-Dimethyl-5,8-dihydroanthracene-1,9,10(4H)-trione (Q1) and 9,10-Dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H)-anthracenone (Q2), two molecules that inhibit cancer cell respiration, were selectively deuterated and dissolved in an anionic discotic nematic lyotropic liquid crystal (dnlc) solution. The solution provides a magnetic field oriented anisotropic medium, where the location, average orientation and dynamics of Q1 and Q2 were examined by measuring ^2H -NMR quadrupole splittings (D_{H}) and ^2H longitudinal relaxation times (T_{1}). The NMR data shows that both molecules are strongly attached to the aggregate and, when deuterated, increase the alignment of the interface components with the magnetic field. However they present different average orientations. To assist with the interpretation of the experimental results, 300ns Molecular Dynamics (MD) trajectories of a bilayer model of the aggregate were calculated. The results show that both molecules spontaneously diffuse inside the bilayer, to locate in the limit between the hydrophobic core and the interface. The orientations of both molecules in the aggregate are determined by the formation of H-bonds with water.

Keywords: Quinones, Hydroquinones, Deuterium Quadrupole Splitting, Longitudinal Relaxation Time, Lyomesophase.

INTRODUCTION

Polyphenols are usually recognized by their anti-oxidant capabilities; however in certain conditions they can also function as pro-oxidants.^{1,4} Hydroquinones belong to this class of compounds and they are among the strongest anti-oxidants.⁵ The reduction of quinones and the oxidation of hydroquinones have been related to cytotoxicity and anti-cancer activity.^{1,6} Besides, it is known that quinone derivatives display a variety of biological activities, including fungicidal, through the formation of semi-quinone radicals.⁷ In the past, significant work of our group has been devoted to the synthesis, mechanism of formation and biological evaluation of quinones and hydroquinones.⁸⁻¹² Biological activity of these products has been measured through IC_{50} values against tumor cell respiration of TA3 cell line and TA3-MTX-R multidrug resistant variety.¹³

It is now accepted that mitochondria are involved in cell apoptosis. Malfunction of mitochondria involves lack of apoptosis and this has been related to cancer etiology.¹⁴ Mitochondria have been considered an important target for cancer therapy, and quinones and hydroquinones are believed to function inside the mitochondria.¹⁵⁻¹⁷ Therefore, there is no doubt that in order to reach their targets these molecules must cross several membranes, including mitochondrial membranes. On the other hand, it is well known that *in-vivo* anti-oxidant activity of polyphenols is limited by their ability to cross membranes.

The interaction between biologically active molecules and bilayers has been a very active field of research. In the past we examined counter-ion effects and dynamical behavior of parathion, a well known pesticide, dissolved in anionic and cationic mesophases.^{18,19} Inclusion of the pesticide in a cationic mesophase increases the order degree of the interface components; on the other hand, when dissolved in anionic mesophases, the effect is strongly dependent on the nature of the counter-ion. Work in a similar field using several spectroscopic techniques has shown the existence of a preferential interaction between quinolone derivatives and negatively charged phospholipids vesicles,^{20,21} evidencing again the importance of the amphiphilic head-group properties. Therefore, increased knowledge about the distribution, average orientation, interactions and dynamics of biologically active molecules, when they are dissolved in an amphiphilic bilayer, a simple model of membrane, provides valuable information for a better understanding of drug functioning and rational drug design.

In this article we study the average orientation, distribution and dynamics of two structurally related molecules, a quinone and its reduced form, the corresponding hydroquinone, which were selected from our previous work.

The molecules are 4,4-dimethyl-5,8-dihydroanthracene-1,9,10(4H)-trione (Q1) and 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H)-anthracenone (Q2). They were selectively deuterated at positions 5, 6, 7 and 8 (see figure 1), and dissolved in anionic discotic nematic lyotropic liquid crystal (dnlc) solution. Despite their apparent structural similarity these two molecules show different anti-cancer activity: Q2 is two to three times more active than Q1 as a tumor cell respiration inhibitor (IC_{50} Q1 = $0.22 \pm 0.02 \text{ mM}$ and IC_{50} Q2 = $0.08 \pm 0.01 \text{ mM}$ against TA3 cell line; IC_{50} Q1 = $0.17 \pm 0.02 \text{ mM}$ and IC_{50} Q2 = $0.07 \pm 0.01 \text{ mM}$ against the TA3-MTX-R variety) (12, 13). In general, IC_{50} for oxygen uptake inhibition are about an order of magnitude greater than IC_{50} for cytotoxicity; however, it is a quick test for preliminary screening of possible anti-cancer activity. For instance, Q2 exhibits low micromolar dose-dependent growth inhibition of the human U937 tumor cell line (human monocytic leukemia), IC_{50} = $7.96 \mu\text{M}$.¹³

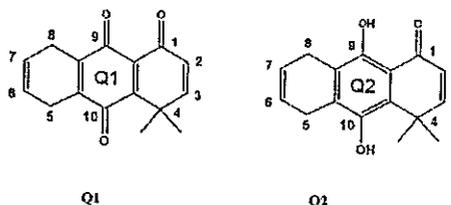


Figure 1. Structures of the studied molecules.

The dnlc is prepared by dissolving cesium decylsulfate (CsDS), decanol (D_2OH , 20% $\text{D}_2\text{OH}-d_4$) and Cs_2SO_4 in water (0.1% D_2O) and consist of a concentrated solution of disc-shaped aggregates, like fat micelles, made of decylsulfate ions and D_2OH . In the presence of an applied magnetic field they spontaneously orient with the symmetry axis of the oblate perpendicular to the field direction, providing an anisotropic medium. This property makes these systems particularly suitable to be studied by NMR of quadrupolar nuclei. ^2H -NMR quadrupole splittings (D_{H}) and longitudinal relaxation times (T_{1}) were measured for all deuterium nucleus in all samples. Since the structures

e-mail: bwets@uchile.cl.



Effect of lithium on the properties of a liquid crystal formed by sodium dodecylsulphate and decanol in aqueous solution

V. E. Bahamonde-Padilla,¹ Javier Espinoza,¹ B. E. Weiss-López,^{1,a)}
J. J. López Cascales,^{2,b)} R. Montecinos,³ and R. Araya-Maturana⁴

¹Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 633, Santiago, Chile

²Grupo de Biotinformática y Macromoléculas (BioMac), Universidad Politécnica de Cartagena,

Área de Química Física, Aulario II, Campus de Alfonso XIII, 30203 Cartagena, Murcia, Spain

³Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Av. Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile

⁴Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile

(Received 20 February 2013; accepted 23 May 2013; published online 2 July 2013)

Understanding the molecular interactions that rule the physicochemical properties of molecular assemblies is of particular interest when trying to explain the behavior of much more complicated systems, such as the cell membranes. This work was devoted to study a discotic nematic lyotropic liquid crystal, formed by sodium dodecylsulphate (3% SDS- d_{25}) and decanol (20% DeOH- α - d_2), dissolved in aqueous solutions (0.1% D_2O) of Na_2SO_4 or Li_2SO_4 . The average size of the aggregates was estimated using fluorescence quenching experiments, and their dynamics were studied by measuring the 2H -NMR quadrupole splitting (ν_Q) and the longitudinal relaxation times (T_1) of the deuterated species. To provide an atomic insight into these assemblies, molecular dynamics simulations of the systems were carried out with atomic detail. As a previous step in this study, a reparameterization of the standard GROMOS 87 force field was required to perform the equilibrated simulations and to prevent instabilities emerging during the simulations. Finally, an excellent agreement between simulation and experimental data was obtained. In addition, variations in the long range electrostatic interactions at the aggregate/solution interface, the orientation and the orientational relaxation time of the water dipole, the translational diffusion coefficient of sodium ions, and the amphiphile-counterion coordination associated with the presence of Li^+ in the solution were other key aspects investigated to explain the variation in the quadrupole splittings (ν_Q) in the presence of lithium in solution. © 2013 AIP Publishing LLC. [http://dx.doi.org/10.1063/1.4811678]

1. INTRODUCTION

Ionic amphiphiles dissolved in water spontaneously aggregate to form a variety of different structures. At constant temperature and pressure, the characteristics of the aggregates depend on the nature and concentration of the amphiphile, its counterion, the presence of other components, and the solvent. At moderate concentrations, above the Critical Micelle Concentration (CMC), isotropic micelles are formed. If the amphiphile concentration is increased, anisotropic liquid crystal phases, such as lamellar and hexagonal assemblies (among others), appear. Furthermore, by adding long chain aliphatic alcohols and increasing the ionic strength of the aqueous solution by the addition of salt, two types of nematic lyotropic liquid crystals (NLLCs) of finite size can be generated: calamitic (NC), derived from the hexagonal phase with prolate symmetry, and discotic (ND), derived from the lamellar phase with oblate symmetry.¹⁻⁶ Despite their structural differences, all these systems show three characteristic regions: (i) the aqueous phase, containing a small amount of free amphiphiles and ions dissolved, (ii) the interface, where the most important electrostatic interactions between head-groups, ions, and water occur, and (iii) the hydrophobic core, formed by hydrocarbon chains. These three

regions are also found in the bilayer structure of eukaryotic cell membranes, where interactions in the interfacial region play a critical role determining the curvature of this region, which strongly affects the size and shape of the aggregates.^{7,8} Hence, a deeper knowledge of the molecular interactions that govern the physicochemical processes of these relatively simple molecular assemblies will contribute to a better understanding of more complicated structures, such as those of biological membranes.

Furthermore, the bilayer arrangement displayed by Discotic Lyotropic Liquid Crystals (DLLCs), combined with their capacity to be orientated in the presence of magnetic fields, means they can be considered as simple membrane models, particularly suitable for study by nuclear magnetic resonance (NMR).⁹ Recently, nematic lyotropic liquid crystals in combination with magnetic fields have been used in the synthesis of carbon nanotubes with a given preferential orientation, since their orientation can be controlled by the magnetic field applied to the system. They have also been used as templates for the synthesis of nanowires and for the generation of meso-structured materials.¹⁰⁻¹⁴

In this work we present an experimental study on the size, structure, and dynamics of two discotic nematic lyotropic liquid crystals. The sample denoted as S1 was prepared by dissolving sodium dodecylsulphate (10% SDS- d_{25}) and decanol (DeOH- α - d_2) in an aqueous solution containing

^{a)}Authors to whom correspondence should be addressed. Electronic addresses: bweiss@uchile.cl and javier.lopez@upct.es

7.3 Colaboraciones previas con el grupo de Trabajo



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Colloid and Interface Science 316 (2007) 120–125

 JOURNAL OF
Colloid and
Interface Science

www.elsevier.com/locate/jcis

 Counterion and composition effects on discotic nematic
lyotropic liquid crystals
II. Ion exchange and molecular dynamics

 Rodrigo Montecinos^{a,*}, Hernán Ahumada^a, Víctor E. Bahamonde-Padilla^a, Andrés F. Olea^b,
Boris E. Weiss-López^{a,*}
^a Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Casilla 653, Santiago, Chile^b Universidad Andrés Bello, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Departamento de Ciencias Químicas, República 275, Santiago, Chile

Received 16 May 2007; accepted 21 July 2007

Available online 28 July 2007

Abstract

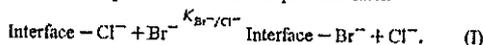
The static fluorescence quenching of pyrene by bromide, at the interface of mixed TTAC/TTAB discotic nematic lyotropic liquid crystals, allowed an estimation of the equilibrium constant for the exchange of chloride by bromide. The affinity of the interface for bromide is much higher than for chloride ($K_{Br^-/Cl^-} = 13.2$). For a molecular level understanding of the experimental results of this and the preceding paper, 20 ns molecular dynamics (MD) simulations were calculated for samples with TTAB/TTAC molar percent ratios 100/0 (A), 50/50 (B) and 0/100 (C). The increment in the concentration of chloride induces a wider distribution of ammonium headgroups along the axis normal to the bilayer surface, increasing the width of the interface. The charge density profile of simulation B shows that the concentration of bromide is higher than the concentration of chloride in the vicinity the ammonium headgroups. The short range contribution to the electrostatic energy from the ammonium–ammonium repulsion is 291.7 kJ/mol for TTAC and 195.6 kJ/mol for TTAB, and the short range ammonium–halide interaction is -6166 kJ/mol for TTAC and -6607 kJ/mol for TTAB, from simulations A and C, respectively. These results are in agreement with a more neutralized TTAB interface. Consistently, the electric dipole moments of water are significantly more aligned with the larger electric field of the TTAB interface. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Counterion exchange equilibrium constant; Dissociation degree; Discotic nematic lyotropic liquid crystal; Molecular dynamics

1. Introduction

In the preceding paper, a comparative study about composition effects on the size and interface dynamics of discotic nematic lyotropic liquid crystals, prepared with tetradecyltrimethylammonium halide (TTAX)–decanol (10% 1,1-dideuterodecanol)–H₂O (0.1% D₂O)–NaX, with X = Cl⁻ and Br⁻, was presented. That article revealed significant differences in the quadrupole splittings of 1,1-dideuterodecanol and HDO, between both mesophases. These dissimilarities were attributed to differences in the dynamics of the interfaces. Since the only difference between both mesophases is the counterion, a study about the relative affinity of the interface for chloride or

bromide ions seems necessary. For this purpose we have measured the equilibrium constant for the exchange of Cl⁻ by Br⁻ at the interface of mixed TTAC/TTAB mesophases, using the fluorescence quenching of pyrene by Br⁻. The ion exchange equilibrium to be studied is shown in Eq. (I) and the methodology used for this purpose has been described elsewhere [1,2]. A brief description of the method is provided later.



In this work, the equilibrium constant of reaction (I) was estimated from the fluorescence intensity measurements in a series of 4 mixed samples of TTAC/TTAB mesophases. The molar TTAC/TTAB percent ratios were 90/10, 75/25, 50/50 and 25/75. Also, the quadrupole splitting of 1,1-dideuterodecanol for the pure and mixed mesophases were measured using ²H NMR. To assist with the interpretation of the experimental find-

* Corresponding authors.

E-mail address: bweiss@uchile.cl (B.E. Weiss-López).

Dynamics and Orientation of Parathion Dissolved in a Discotic Nematic Lyomesophase

Alejandra Vera,^A Hernán Ahumada,^B Victor Bahamonde,^A
Rodrigo Montecinos,^C Ramón Araya-Maturana,^D
Daniel Muñoz,^A and Boris E. Weiss-López^{A,E}

^AUniversidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Casilla 653, Santiago, Chile.

^BUniversidad de Santiago de Chile, Facultad de Química y Biología, Departamento de Química de los Materiales Av. Lib. B. O'Higgins 3363, Santiago, Chile.

^CUniversidad Andrés Bello, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Departamento de Ciencias Químicas, República 253, Santiago, Chile.

^DUniversidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica, Casilla 233, Santiago 1, Chile.

^ECorresponding author. Email: bweiss@uchile.cl

Parathion, an organophosphorous pesticide, presents serious hazards to the environment and health. It inhibits acetylcholinesterase, an enzyme incorporated in the cell membrane. A study on the behaviour of parathion in a lipid environment is interesting from environmental cleaning and biological perspectives. ²H NMR quadrupole splittings (ν_Q) and longitudinal relaxation times (T_1) of parathion-*d*₄, dissolved in a nematic discotic lyomesophase made of tetradecyltrimethylammonium chloride/decanol (10% 1,1-dideuterodecanol)/water (0.1% D₂O)/NaCl, have been measured. ν_Q and T_1 from DHO and 1,1-dideuterodecanol were also obtained. For a detailed understanding of the experimental results, a 19 ns molecular dynamics (MD) simulation of a bilayer fragment including three parathion molecules was calculated. Parathion is strongly attached to the aggregate and the solubilization increases the alignment of the interface components. Calculated densities show that parathion is located in the hydrophobic core, near the interface, and experiences an electrostatic interaction with the ammonium headgroups. On average, the molecule orients with the ring plane containing the bilayer normal.

Manuscript received: 15 May 2008.

Final version: 25 September 2008.

Introduction

With the massive development of agriculture, organophosphorous compounds have been widely used as pesticides for plague management and control. The use of these compounds represents serious hazards to mammals' health and the environment.^[1–3] For this reason they are forbidden in numerous countries, and when authorized it is under severe security conditions. The toxicity arises from the ability to inhibit acetylcholinesterase at cholinergic junctions in different sites of the nervous system, including certain synapses in the central nervous system.^[4–6] Intoxication is due to the accumulation of acetylcholine and the symptoms are excessive salivation, local sweating, tearing, loss of coordination, and weakness. Severe poisoning may include paralysis of the body's extremities and respiratory muscles, causing death.^[7–11]

Two of the most toxic chemicals used in the agriculture industry are parathion and methyl parathion (diethoxy-(4-nitrophenoxy)sulfanilidene phosphorane and dimethoxy-(4-nitrophenoxy)sulfanilidene phosphorane, respectively). Parathion itself is not an acetylcholinesterase inhibitor; instead it is metabolized at the liver to produce paraoxon, the actual

inhibitor.^[12,13] In paraoxon the sulfur atom is replaced by an oxygen atom (see Fig. 1). Despite the precautions that should be taken when applying the pesticide, every year many people become seriously contaminated. The most common forms of intoxication are ingestion of contaminated food, inhalation, and dermal adsorption. In all these cases the pesticide must cross cell membranes to reach the liver and be transformed into paraoxon.^[14]

The conformations, interactions, and reactivity of parathion with different molecules have all been the subject of interest.^[15–17] Of particular importance, from an environmental and toxicological point of view, is to study the solubilization of the pesticide in surfactant aggregates and its effects on the structure of synthetic and natural membranes.^[18–22] In this context, a study on the average orientation, distribution, and dynamics of parathion dissolved in a nematic discotic lyotropic liquid crystal (NDLLC) provides valuable information about the behaviour of the insecticide inside the hydrophobic bilayer, as well as the effects produced on the integrity of the aggregate. The liquid crystal unit is made of an aggregate of a few hundred amphiphiles with average oblate symmetry.^[23]

Counterion Effects and Dynamics of Parathion in Anionic Lyomesophases

Victor Bahamonde,^A Hernán Ahumada,^B Ramiro Araya-Maturana,^C
and Boris E. Weiss-López^{A,D}

^AUniversidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Casilla 653, Santiago, Chile.

^BUniversidad de Santiago de Chile, Facultad de Química y Biología, Departamento de Química de los Materiales Av. Lib. B, O'Higgins 3363, Santiago, Chile.

^CUniversidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica, Casilla 233, Santiago 1, Chile.

^DCorresponding author. Email: bwelss@uchile.cl

Ingestion of parathion produces catastrophic effects on mammals. Transformed into paraoxon, it inhibits acetylcholinesterase, producing acetylcholine accumulation. The distribution, orientation, and dynamics of parathion in different hydrophobic bilayer environments is interesting from both ecological and biological perspectives. A study of parathion-*d*₄ dissolved in two nematic discotic lyotropic liquid crystals made of sodium and cesium decylsulfate (CsDS and NaDS)/decanol (10% 1,1-dideuterodecanol)/water (0.1% D₂O)/M₂SO₄ (M = Na⁺, Cs⁺), is presented. Deuterium quadrupole splittings and relaxation times of all deuteriated species were measured. Parathion is strongly attached to both aggregates, increasing the alignment of CsDS and decreasing the alignment of NaDS. Molecular dynamics trajectories were calculated for both mesophases. CsDS appears more neutralized than NaDS. Despite the surface charge, parathion is associated to both aggregates, located near the interface, with the nitro group oriented to the headgroups and the ethoxy chains toward the hydrophobic core. When included in the CsDS interface, it stabilizes the system by shielding repulsive electrostatic interactions among headgroups. Included in NaDS, parathion induces an increase in the distance among counterions and sulfate headgroups, thus decreasing the degree of order.

Manuscript received: 1 August 2009.

Manuscript accepted: 16 September 2009.

Introduction

Parathion, (diethoxy-(4-nitrophenoxy)sulfanilidene phosphorane), a well known organophosphorous pesticide (see Fig. 1), presents serious hazards for life and the environment. Intoxication with parathion involves accumulation of acetylcholine, and severe poisoning may cause serious damage, even death.^[1–3] A study on the dynamics and distribution of parathion in cationic and anionic bilayer environments is therefore of both ecological and biological interest. Recently, we published a paper concerning the dynamics and orientation of parathion-*d*₄ dissolved in a cationic Nematic Discotic Lyotropic Liquid Crystal (NDLLC) using ²H NMR and molecular dynamics (MD) simulations.^[6] These NDLLC are aqueous solutions of aggregates made of amphiphilic molecules assembled like bilayers, similar to a flat micelle, with average oblate symmetry. In the presence of magnetic fields, they spontaneously orient with the symmetry-axis of the oblate perpendicular to the field direction, generating an anisotropic medium, and allowing the measurement of residual quadrupole splittings. In that paper, the cationic NDLLC was prepared from tetradecyltrimethylammonium chloride, decanol, NaCl, and water. The results showed that parathion is completely incorporated inside the hydrophobic core, in agreement with previous experimental evidence.^[7] At equilibrium, it is located near the interface, with the nitro group interacting with the

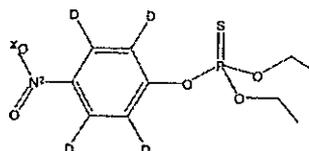


Fig. 1. Schematic representation of parathion parathion-*d*₄.

ammonium headgroups of the aggregate, and the ethoxy chains pointing toward the interior. The addition of parathion increases the degree of order of all components of the cationic aggregate. This ordering effect has been observed before.^[8,9]

To study counterion effects on the dynamics, distribution, and average orientation of parathion dissolved in hydrophobic bilayers with an anionic interface, an NMR investigation of parathion-*d*₄ dissolved in two anionic NDLLC was made. The liquid crystal solutions consisted of sodium and cesium decylsulfate (NaDS and CsDS), decanol (DeOH), including 10% 1,1-dideuterodecanol, sodium or cesium sulfate and water (0.1% D₂O). Deuterium quadrupole splittings (ν_Q) and longitudinal relaxation times (T_1) were measured for all deuterium-enriched

8 Referencias

1. Stegemeyer, H. Centenary of the discovery of liquid crystals. *Liquid Crystals* 5, (1989).
2. Ahumada, H. Orientación y Dinámica de Sustratos Disueltos en Cristales Líquidos Liotrópicos Nemáticos. (2007).
3. Stepto, R. F. T., Jenkins, A. D., Goodby, J. W. & Schadt, M. Definitions of basic terms relating to polymer liquid crystals. *Pure and Applied Chemistry* 74, 493-509 (2002).
4. Stegemeyer, H. *Liquid Crystals*. (Steinkopff: 1994).
5. Katsaras, J., Harroun, T. a, Pencer, J. & Nieh, M.-P. "Bicellar" lipid mixtures as used in biochemical and biophysical studies. *Die Naturwissenschaften* 92, 355-366 (2005).
6. Montecinos, R. *et al.* Structure and aggregation number of a lyotropic liquid crystal: a fluorescence quenching and molecular dynamics study. *Langmuir* 20, 5703-5708 (2004).
7. Lagerwall, J. & Scalia, G. A new era for liquid crystal research: Applications of liquid crystals in soft matter nano-, bio-and microtechnology. *Current Applied Physics* 12, 1387-1412 (2012).
8. Cao, X. *et al.* Simultaneous degradation of organophosphate and organochlorine pesticides by *Sphingobium japonicum* UT26 with surface-displayed organophosphorus hydrolase. *Biodegradation* 24, 295-303 (2013).
9. Suwalsky, M., Benites, M. & Villena, F. The organochlorine pesticide heptachlor disrupts the structure of model and cell membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1326, 115-123 (1997).
10. Tsoukali, H., Theodoridis, G., Raikos, N. & Grigoratou, I. Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples. *Journal of Chromatography B* 822, 194-200 (2005).

11. Zilberstein, D. & Dwyer, D. M. Antidepressants cause lethal disruption of membrane function in the human protozoan parasite *Leishmania*. *Science* **226**, 977-979 (1984).
12. Cheong, I. *et al.* A bacterial protein enhances the release and efficacy of liposomal cancer drugs. *Science* **314**, 1308-1311 (2006).
13. Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**, 152-159 (1997).
14. Simić, A., Manojlović, D., Segan, D. & Todorović, M. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules* **12**, 2327-40 (2007).
15. Vinson, J. a., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M. & Jang, J. Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, Are Powerful Antioxidants Using an in Vitro Oxidation Model for Heart Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2800-2802 (1995).
16. O'Brien, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* **80**, 1 - 41 (1991).
17. Araya-Maturana, R. *et al.* Effects of 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H)-anthracenone derivatives on tumor cell respiration. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**, 4664-9 (2006).
18. Peetla, C. *et al.* Drug resistance in breast cancer cells: biophysical characterization of and doxorubicin interactions with membrane lipids. *Molecular pharmaceutics* **7**, 2334-48 (2010).
19. Alberts, B., Coll, M. D. & Sande, M. L. *Biología Molecular de la Célula*. (Omega: 1996).
20. Siarheyeva, A., Lopez, J. J. & Glaubit, C. Localization of multidrug transporter substrates within model membranes. *Biochemistry* **45**, 6203-11 (2006).
21. Terrasa, A. M., Guajardo, M. H., de Armas Sanabria, E. & Catalá, A.

Pulmonary surfactant protein A inhibits the lipid peroxidation stimulated by linoleic acid hydroperoxide of rat lung mitochondria and microsomes. *Biochimica et biophysica acta* 1735, 101-10 (2005).

22. Bensikaddour, H. *et al.* Characterization of the interactions between fluoroquinolone antibiotics and lipids: a multitechnique approach. *Biophysical Journal* 94, 3035-46 (2008).

23. Bensikaddour, H. *et al.* Interactions of ciprofloxacin with DPPC and DPPG: fluorescence anisotropy, ATR-FTIR and ^{31}P NMR spectroscopies and conformational analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 2535-43 (2008).

24. Katsaras, J., Harroun, T. A., Pencer, J. & Mu-Ping, N. "Bicellar" Lipid Mixtures as Used in Biochemical and Biophysical Studies. *Naturwissenschaften* 92, 355-366 (2005).

25. Petrov Alexander, G. *The Lyotropic State of Matter: Molecular Physics and Living Matter Physics*. 22-24 (CRC Press: The Netherlands, 1999).

26. Harris, R. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. A Physicochemical View*. 4-9 (Longman Scientific & Technical: Longman Scientific & Technical, 1986).

27. Macomber Roger, S. *Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. 6-20 (Wiley-Interscience publication: USA, 1998).

28. Roberts, J. D. *Nuclear Magnetic Resonance. Applications to Organic Chemistry*. 5-17 (McGraw-Hill: USA, 1959).

29. Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H. & Teller, E. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *The Journal of Chemical Physics* 21, 1087-1092 (1953).

30. Johansson, A. C. V. & Lindahl, E. Amino-acid solvation structure in transmembrane helices from molecular dynamics simulations. *Biophysical journal* 91, 4450-63 (2006).

31. Ahumada, H., Montecinos, R., Tieleman, D. P. & Weiss-López, B. E.

Orientation and dynamics of benzyl alcohol and benzyl alkyl ethers dissolved in nematic lyotropic liquid crystals. ^2H NMR and molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry. A* **109**, 6644-51 (2005).

32. Cuevas, G. & Cortés, F. *Introducción a la Química Computacional*. 31-37 (Fondo De Cultura Económica: Mexico, 2003).

33. Leach, A. *Molecular Modelling Principles and Applications*. . pp 166-180 (Prentice Hall: England, 2001).

34. Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D. & Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* **4**, 435-447 (2008).

35. Torrie, G. & Valleau, J. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics* **23**, 187-199 (1977).

36. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H. & Kollman, P. A. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *Journal of Computational Chemistry* **13**, 1011-1021 (1992).

37. Araya-Maturana, R. & Delgado-Castro, T. Effects of 4, 4-dimethyl-5, 8-dihydroxynaphthalene-1-one and 4, 4-dimethyl-5, 8-dihydroxytetralone derivatives on tumor cell respiration. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**, 3057-3060 (2002).

38. Bahamonde, V., Ahumada, H., Araya-Maturana, R. & Weiss-López, B. E. Counterion Effects and Dynamics of Parathion in Anionic Lyomesophases. *Australian Journal of Chemistry* **63**, 68-74 (2010).

39. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Rob, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Peter, and J. A. P. Gaussian 03, Inc. (2003).

40. Humphrey, W., Dalke, A. & Klaus, S. VMD- Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **14**, 33-38 (1996).
41. van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. . *GROMOS: GRONingen MOlecular Simulation, Biomos, Groningen*. (The Netherlands, 1987).
42. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* **18**, 1463-1472 (1997).
43. Ryckaert J.P., B. A. Molecular dynamics of liquid n-butane near its boiling point. *Chemical Physics Letters* **30**, 123-125 (1975).
44. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S. & Tirado-rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 11225-11236 (1996).
45. Kaminski, G. A., Friesner, R. A., Tirado-rives, J. & Jorgensen, W. L. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides †. *The Journal of Physical Chemistry B* **105**, 6474-6487 (2001).
46. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* **98**, 10089-10092 (1993).
47. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* **81**, 3684 (1984).
48. Abragam, A. *The Principles of Nuclear Magnetism. International series of monographs on physics* **32**, 860 (Clarendon Press: 1961).
49. Lee, S. H. & Rasaiah, J. C. Molecular dynamics simulation of ionic mobility. I. Alkali metal cations in water at 25 °C. *The Journal of chemical physics* **101**,

6964-6974 (1994).

50. Suwalsky, M., Fierro, P., Villena, F. & Sotomayor, C. P. Effects of lithium on the human erythrocyte membrane and molecular models. *Biophysical Chemistry* 129, 36-42 (2007).

51. Seelig, A. & Seelig, J. Dynamic structure of fatty acyl chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance. *Biochemistry* 13, 4839-4845 (1974).

52. Soto-delgado, J., Bahamonde-padilla, V., Araya-maturana, R. & Weiss-lópez, B. E. On the mechanism of biological activity of hydroquinone derivatives that inhibit tumor cell respiration. A theoretical study. *Computational and Theoretical Chemistry* 1013, 97-101 (2013).

53. Lodish, H. *et al.* Intracellular Ion Environment and Membrane Electric Potential. *Molecular Cell Biology* (2000).at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21627/>>

54. Johnson, L. V., Walsh, M. L., Bockus, B. J. & Chen, L. B. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology* 88, 526-35 (1981).