
Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

“Estudio de propiedades estructurales y dinámicas de membranas biológicas y sistemas modelo mediante técnicas de modelado molecular”

Bioquímico: Alberto Sergio Garay *

Trabajo de Tesis** para acceder al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral

Publicación derivada de esta tesis: Effect of the Inclusion of the Spin Label 10-doxyl-Stearic Acid on the Structure and Dynamics of Model Bilayers in water: Stearic Acid and Stearic Acid/Cholesterol (50:20). **Garay A.S.**; Rodrigues D.E. **J. Phys. Chem. B** (November 2007).

Director: Dr. Daniel Rodrigues

Trabajo realizado en el Departamento de Física de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

*Con Beca para Docentes de la Universidad Nacional del Litoral

** Esta tesis fué realizada con el apoyo económico de los proyectos:

“Estudio teórico de interacciones en sistemas de interés biológico” C.A.I.+D. 96-00-010-054

“Métodos Físicos aplicados a sistemas de Interés Biológico”. PIP. 02559/2000 CONICET.

Fecha: Abril de 2008 – Santa Fe.

.Agradecimientos

A mi familia: gracias a mi esposa Ofelia, por toda la paciencia y comprensión que me han brindado a lo largo de estos años. Disculpas a mis hijos, por el tiempo que no compartí.

A mi madre y mi padre que no pueden verme: gracias por mostrarme que el trabajo incansable y honesto, siempre dá sus frutos.

A mi director, el Dr. Daniel Rodrigues, quién me supo guiar en forma metódica y muy productiva a través de este trabajo. Siempre sabiendo infundir entusiasmo aún en los momentos más adversos, donde los problemas parecían insalvables.

A la Dra. Ana Genaro por su ayuda invaluable en la interpretación de los espectros experimentales de RPE, así como al momento del asesoramiento bibliográfico.

Al Dr. Mario Paseggi por su ayuda en el análisis de los aspectos teóricos y prácticos de la espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica, la cual fué siempre oportuna y clara.

A mis compañeros de Práctica Profesional, y en particular al Dr. Fabián Zalazar, sin cuyo apoyo no hubiera podido encarar este desafío personal y profesional, que siempre añoré.

A la Universidad Nacional del Litoral por facilitarme mis tareas de investigación a través de la Beca para Docentes.

SUMMARY

The effect of the insertion of a spin labeled molecule (10-doxyI-Stearic Acid) on the structure and dynamics of model lipid bilayers in gel-like as well as in liquid ordered-like phases are studied using molecular dynamic simulations. The perturbing effects of the labeled molecule on the structure of the bilayers are analyzed. We have also studied the relationship between the structural and dynamic properties of the bilayer phase and those of the labeled molecule. We found that the insertion of the labeled molecule in the bilayer at the concentration considered here (1:70) produces local and global perturbations in the gel-like phase. There is an increase of the area associated to the lipid molecules that produces a larger tilting angle of this condensed phase. In this gel-like phase, we also found that the z component of the order parameter of the labeled molecule associated to the EPR spectra, have the same temperature dependence as the axial correlation times of the lipid molecules. The mechanism by which the doxyl reorientation senses the dynamics of the layers is determined by the correlation between the gauche defect transitions of the labeled alkyl chain and its environment. For the liquid-ordered-like phase we found that cholesterol molecules play the role of wedges that open free spaces in the lipid structure below the ring position, and order the alkyl chains at the depths of the rings, leading to small inclination angles. The doxyl ring of the labeled molecule is located just below the cholesterol ring moiety having fewer gauche defects than in the gel-like phase. The change in depth of the doxyl ring causes a reorientation of this group that lead to an increase of the order parameter as the temperature rises.

Using the angular distribution of the normal vector to the doxyl ring (orientation of magnetic orbital) and from the rotational correlation times (axial and wobbling) obtained from the MD, EPR spectra were obtained. The spectra were simulated for orientated samples, which correspond to lipids multilayers loaded on different substrates, and for NO orientated samples which correspond to measurements on miscelar samples.

RESÚMEN

Se estudió el efecto perturbativo sobre la estructura y dinámica de bicapas modelo de la inserción de un marcador de espín (Ácido 10-doxil-esteárico) en fases simil-gel y líquido ordenado, empleando simulaciones de Dinámica Molecular (DM). También se estudió la relación entre las propiedades estructurales y dinámicas de las bicapas y las correspondientes a la molécula marcada.

Encontramos que la inserción de la molécula marcada en nuestra bicapa modelo a la concentración considerada (1:70) produce perturbaciones locales y globales en la fase gel. Existe un incremento del área asociada a las moléculas lipídicas, lo cual produce un incremento en la inclinación global del eje longitudinal de los lípidos en esta fase condensada. En esta misma fase, también encontramos que la componente Z del parámetro de orden de la molécula marcada, asociada a los espectros de RPE (Resonancia Paramagnética Electrónica), presenta la misma dependencia con T que los tiempos de correlación axial de las moléculas lipídicas. Se determinó que el mecanismo por el cual la reorientación del anillo doxil sensa la dinámica de las bicapas está asociado a la correlación existente entre la frecuencia de las transiciones trans-gauche de la cadena alquílica del marcador y su entorno.

En la fase Líquido-Ordenada (LO) encontramos que las moléculas de colesterol juegan el rol de “cuñas”, dejando espacios abiertos por debajo de su zona de anillos, y ordenando la porción de las cadenas alquílicas que se hallan a la profundidad de los mismos. Este efecto se traduce también en , un bajo ángulo de inclinación de los ejes longitudinales de los lípidos. El anillo doxil de la molécula marcada se ubica justo por debajo de los anillos de colesterol, mostrando su cadena alquílica menos defectos gauche que en la fase simil-gel. Se encontró que el cambio en la profundidad a la cual se ubica el anillo doxil puede en algunos casos causar una reorientación de este grupo, que conduce a un incremento de los parámetros de orden a medida que la T aumenta.

A partir de las distribuciones angulares del vector normal al anillo

doxil (orientación del orbital magnético) y de sus tiempos de correlación rotacional axial y de tambaleo (obtenidos de la DM), se calcularon los espectros de RPE. Esta simulación de los espectros se realizó para el caso de muestras orientadas que corresponde a la situación experimental de mediciones en multicapas depositadas en sustrato; y para muestras no orientadas que corresponde a mediciones en miscelas.

Tabla de Abreviaturas y Símbolos

Å: Angstrom, unidad de distancia

A: Tensor hiperfino

AE: Ácido Esteárico

AE*: Ácido Esteárico Marcado

B: Campo Magnético Externo

B_{res} : Campo Magnético Resonante

DM: Dinámica Molecular

DMPC: Dimiristoyl Phosphatidyl Choline

DPPC: Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline

F_C^A : Función de autocorrelación angular de rotación axial

F_C^W : Función de autocorrelación angular de “wobbling” o tambaleo

fs: femtosegundos, unidad de tiempo

g: Tensor Magnético del espín electrónico

Hz: Hertz

K: grados Kelvin

L-B: Langmuir-Blodgett

LO: Líquido Ordenado

Ms: Momento magnético de espín electrónico

Mi: Momento magnético de espín nuclear

ns: nanosegundos, unidad de tiempo

PO: Parámetro de Orden

P: Presión

ps: picosegundos, unidad de tiempo

RPE: Resonancia Paramagnética Electrónica

Sistema A: formado por AE puro

Sistema A*: formado por AE + AE*

Sistema B: formado por AE y colesterol (50:20)

Sistema B*: formado por AE + colesterol + AE*

SPC: Single Point Charge, modelo de agua

S_{app} : Parámetro de orden obtenido de espectros de RPE

S_{ZZ} : Elemento diagonal ZZ del tensor de Orden de Sauppe.

S_M : Máximo Autovalor del tensor de orden diagonalizado.

τ_C : Tiempo de correlación

T: temperatura

Tabla de Contenidos

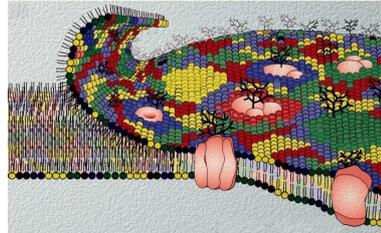
CAPITULO 1.....	11
1.Introducción.....	11
1.1.Reseña del estado actual del Tema.....	11
1.2.Motivación del Trabajo.....	14
1.3. Membranas Modelo.....	15
1.4.Elección de los Sistemas Modelo	17
1.5.Descripción de los capítulos tratados en la Tesis.....	19
CAPITULO 2.....	21
2.Teoría.....	21
2.1. Dinámica Molecular.....	21
2.1.1. Fundamentos.....	21
2.1.2. Las condiciones de contorno.....	24
2.1.3. Campo de Fuerza.....	26
2.1.4. Temperatura y Presión.....	30
2.1.5. Dinámica Molecular con Restricciones.....	33
2.1.6. Limitaciones.....	34
2.2. Herramientas empleadas en la interpretación de los resultados.....	36
2.2.1. Momento Dipolar.....	36
2.2.2. Factor de Estructura	37
CAPITULO 3.....	41
3.Modelo aplicado al Cálculo de los Espectros de RPE.....	41
3.1. Modelo Empleado.....	41
3.1.1. Teoría.....	41
3.1.2. Definición de las Ternas de ejes empleados en el cálculo.....	44
3.2. Población de vectores	50
3.3. ¿ Movimientos rápidos o movimientos lentos ?.....	61
3.4. Orientación de las muestras.....	68
3.5. Resultados del Modelo para Movimientos Intermedios.....	71
3.5.1. Resultados cono de 60°.....	72
3.5.2. Resultados cono de 30°.....	74
CAPITULO 4.....	76
4.Bicapas de AE.....	76

4.1.Construcción de una bicapa de ác. esteárico.....	76
4.2.Protocolo de Preparación de la Bicapas.....	79
4.3. Dinámica Molecular a distintas temperaturas.....	80
4.4. Propiedades Estructurales.....	81
4.4.1. Fraccion de Diedros en Conformación trans.....	82
4.4.2. Superficie por Molécula.....	83
4.4.3. Tilt Z.....	84
4.4.4. Factor de Estructura.....	85
4.4.5. Momento Dipolar.....	87
4.5.Parámetros Dinámicos.....	88
CAPITULO 5.....	90
5.Bicapas de AE Marcadas con Ácido 10 doxil esteárico (AE*).....	90
5.1.Construcción de una bicapa de AE marcada con AE*.....	90
5.2.Optimizando la carga del grupo doxil	92
5.3.Protocolo de Preparación de la Bicapas.....	94
5.4.Dinámica Molecular a distintas temperaturas.....	95
5.5.Propiedades Estructurales.....	95
5.5.1.Fracción de Diedros en Conformación trans	96
5.5.2.Superficie por Molécula.....	98
5.5.3.Tilt Z.....	101
5.6.Parámetros Dinámicos.....	102
5.6.1.Parámetros de Orden de los AE.....	102
5.6.2.Análisis de Clusters y P.O. del Marcador.....	107
5.6.3.Funciones de Autocorrelación angular.....	115
5.7.Análisis de los Perfiles de Densidad.....	117
5.8.Espectros de RPE calculados a partir de la DM	121
5.8.1.Comparación con Espectros Experimentales.....	129
5.8.2.Monocapas de Langmuir de AE.....	129
5.8.3.Multicapas de Fosfolípidos.....	133
CAPITULO 6.....	139
6.Bicapas de Ácido Esteárico con 30 % de Colesterol	139
6.1.Construcción de una bicapa de AE-colesterol.....	139
6.2.Protocolo de preparación de la bicapa inicial.....	140
6.3.Observaciones acerca de los resultados de la DM.....	141
6.4.Propiedades Estructurales.....	142

6.4.1.Fracción de Diedros en Conformación trans (AE).....	143
6.4.2.Superficie por Molécula de Colesterol.....	144
6.4.3.Tilt Z del AE.....	146
6.4.4.Perfiles de Densidad de átomos.....	147
6.5.Parámetros Dinámicos.....	149
CAPITULO 7.....	153
7.Bicapas de AE/Colesterol Marcadas con ácido 10-doxil-AE	153
7.1.Construcción de la bicapa AE/Colesterol/AE* (sistema B*).....	153
7.2.Protocolo de preparación de la bicapa inicial.....	153
7.3.Observaciones acerca de los resultados de la DM.....	154
7.4.Propiedades Estructurales.....	155
7.4.1.Fraccion de Diedros en Conformación trans (AE).....	156
7.4.2.Superficie por Molécula.....	157
7.4.3. Tilt Z.....	158
7.4.4.Perfiles de Densidad de Átomos.....	159
7.5.Parámetros Dinámicos.....	161
7.5.1.Parámetros de Orden de los AE.....	161
7.5.2.Análisis de Clusters y P.O. del Marcador.....	164
7.6. Espectros de RPE calculados a partir de la DM.....	174
CAPITULO 8.....	184
8.Conclusiones.....	184
8.1.Resultados sobre el sistema AE/AE*.....	186
8.2.Resultados sobre el sistema AE/AE*/Colesterol.....	188
8.3.Modelo empleado en el cálculo de los espectros de RPE.....	190
8.4.Espectros de RPE del sistema AE/AE*(teóricos).....	191
8.5.Espectros de RPE del AE/AE*/Colesterol (teóricos).....	192
8.6.Comparación con Resultados experimentales.....	193
8.6.1.Monocapas de AE tipo Langmuir-Blodgett	193
8.6.2.Multicapas de Lecitina de Huevo y DPPC (fase gel).....	194
8.7.Lineamientos Futuros.....	195

CAPITULO 1

1. Introducción



1.1. Reseña del estado actual del Tema

Todas las membranas de células eucariotas separan compartimentos funcionales (aparato de Golgi, Retículo Endoplásmico Rugoso y Liso, etc), pero la membrana de la superficie celular (membrana plasmática) es un extremo. Es la frontera entre la célula y su medio ambiente. La exploración de esta frontera ha revelado sus propiedades físicas y funcionales. La membrana plasmática es una bicapa lipídica, cuya composición regula el pasaje de moléculas entre el exterior y el interior celular y cuyas propiedades son diferentes de las de sus componentes individuales.

Esta frontera celular es usualmente modelada a partir de estudios físico-químicos de conjuntos de lípidos puros o mezclas de 2 tipos de lípidos, obtenidos "in vitro". Los datos obtenidos de éstas membranas simplificadas permiten la exploración de membranas celulares más complicadas que son ricas en proteínas (18% a 76%) y que contienen una variedad enorme de lípidos (una membrana puede tener entre 500 y 1000 lípidos diferentes). La difracción de rayos X combinada con la difracción de neutrones de estos sistemas modelo dieron una de las imágenes más detalladas de una bicapa lipídica [Wiener y White (1992)][Nagle y col., 1996], pero lamentablemente estática.

Con el advenimiento de la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopía paramagnética electrónica (RPE) se pudo mostrar que las bicapas estaban en movimiento en una amplia escala de tiempo y distancia, doblándose y difundiendo. En pocas palabras, la bicapa era más un fluido que un sólido [Chapman, 1975].

Cuando este concepto de fluidez se unió a los estudios de la difusión de proteínas de membrana de eritrocitos realizados por Singer y Nicholson [Singer y Nicholson, 1972], junto con la crucial distinción entre proteínas integrales y periféricas fue que se desarrolló el modelo con el cual aún seguimos conceptualizando las membranas: el modelo de “Mosaico

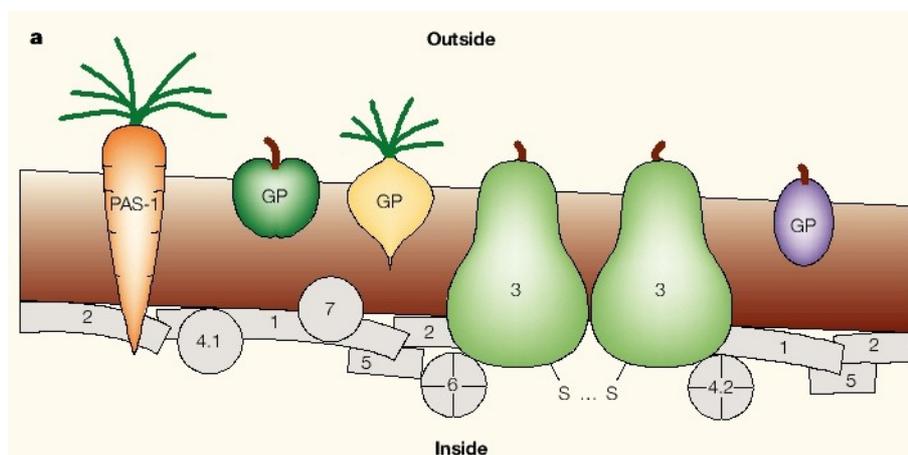


Gráfico 1.1: figura modificada por Edidin [Edidin, 2003] de una publicada previamente en una revisión sobre proteínas de eritrocitos. Notar que la membrana se representa como 2 líneas paralelas, con la distinción entre proteínas **integrales** y **periféricas**. Las proteínas integrales son representadas como frutas y vegetales, y están insertas en la bicapa. Las proteínas del citoesqueleto se dibujaron como figuras geométricas (círculos y rectángulos) numeradas, del lado interno de la bicapa.

Fluido”. El mosaico esta hecho de proteínas insertas en un fluido (**isotrópico**), que es la bicapa lipídica (Gráfico 1.1). Este modelo es una visión sobresimplificada del problema, pero que permite capturar e integrar exitosamente diversos experimentos físicos y químicos de membranas.

Hoy se ha agregado a este modelo, la presencia de “parches” o “islas” de lípidos, cuya composición y estado físico son diferentes del promedio de la bicapa (la bicapa no es más un fluido isotrópico, homogéneo). El Gráfico 1.2 muestra este nuevo modelo en toda su complejidad [Edidin, 2003].

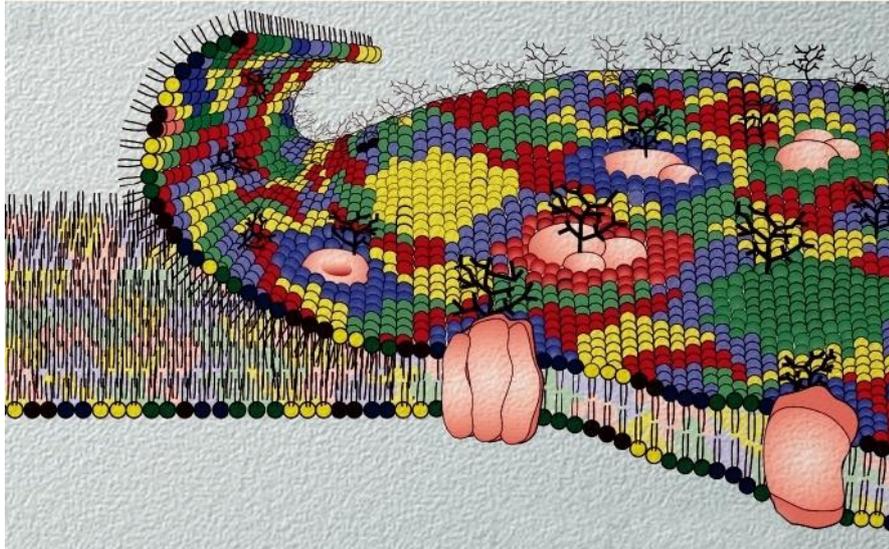


Gráfico 1.2: en este nuevo modelo de Mosaico Fluido, los lípidos ya no se hayan distribuidos homogéneamente en la bicapa, sino que pueden formar “islas lipídicas” de diferente composición [Edidin, 2003]. Notar que estas islas rodean las distintas proteínas, y por lo tanto pueden ahora los lípidos conferir propiedades particulares en el entorno, que faciliten o inhiban una determinada función de las mismas.

La sugerencia de que existen diferentes dominios de membrana fue señalado por los primeros trabajos en membranas modelo, que demostraban la **coexistencia** de dominios semejantes a un sólido (estado “gel”), ricos en lípidos con alto punto de fusión, y dominios tipo “líquido desordenado” (ricos en lípidos con bajo punto de fusión) [Jain y White, 1977]. El comportamiento del colesterol, uno de los componentes mayores de las membranas plasmáticas, parecía estar enfrentado con la existencia de dominios. Altos niveles de colesterol suprimen la habilidad de los lípidos saturados (dipalmitoil-fosfatidilcolina, DPPC) para formar los estados sólido y líquido desordenado [Landbroke y col., 1968]. En presencia de colesterol, estos estados eran reemplazados por un estado intermedio, denominado “líquido ordenado”, **LO** [Ipsen y col., 1987]. En estado **LO** los lípidos están empaquetados apretadamente, como en un sólido ordenado, pero muestran difusión lateral rápida, como en un líquido. Sin embargo una reinterpretación de el comportamiento de mezclas de colesterol/DPPC, sugirió que, bajo algunas condiciones, en ellas podían coexistir, dominios tipo líquido desordenado y dominios en estado **LO** [Ipsen y col., 1987][Lentz y col., 1980].

Hoy en día existen numerosos trabajos orientados al estudio de los denominados “rafts lipídicos” o microdominios líquido-ordenados, los cuales

son microdominios de proteínas y lípidos (ricos en esfingomiélinea, colesterol, glicosfingolípidos y proteínas covalentemente unidos a lípidos). Estos microdominios están implicados en diversas funciones biológicas de la membrana [Anderson y Jacobson, 2002][Edidin, 2003][Simons y Vaz (2004)].

1.2. Motivación del Trabajo

La espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) empleando marcadores de espín a sido exitosamente empleada para el estudio de la dinámica y la estructura de biomembranas por más de 20 años. Esta técnica ha brindado información acerca de bicapas lipídicas modelo como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC/agua) [McConnell, 1976][Griffith y Jost, 1976], capas y multicapas de ácidos grasos [Risse y col. 1998a][Risse y col., 1998b][Taylor y Smith (1983)], así como también sobre membranas biológicas [Cassera y col., 2002][Rivas y Genearo, 2003][Carrer y col., 2006][Rodi y col., 2006]. La ventaja de la espectroscopía RPE sobre la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se basa en su alta sensibilidad, la cual la hace especialmente útil para el estudio de los fenómenos interfaciales. No obstante la RPE requiere de la presencia de centros paramagnéticos que deben suministrarse al sistema, si el mismo no posee espines desapareados. Los parámetros de orden S del marcador de espín molecular pueden ser estimados a partir de la forma de los espectros de RPE, en particular de la separación de niveles de energías hiperfinas, que se hayan relacionadas con la dinámica de la orientación molecular del anillo doxil del marcador [Griffith y Jost, 1976]. Las características espectrales son el resultado de efectos combinados de: a) la distribución de valores de orientación del orbital desapareado en relación al campo magnético, y por lo tanto de la orientación del grupo empleado como marcador de espín; y b) la dinámica del movimiento de este grupo. En esta tesis nos referiremos al primero como la contribución orientacional. El segundo efecto produce una promediación de las características espectrales cuando el movimiento es suficientemente rápido. El angostamiento de cada una de las componentes hiperfinas es asociado heurísticamente con los movimientos rápidos del marcador molecular.

Habitualmente se supone que la dinámica de la molécula marcadora de espín *sensa* los movimientos de su entorno. No obstante, no

existe una comparación detallada de la dinámica del marcador en relación a las moléculas vecinas. Algunas diferencias entre la dinámica de la molécula marcadora de espín y de los lípidos donde se halla disuelta han sido señalados por Hakansson y col [Hakansson y col., 2001]. Wisniewska y col. [Wisniewska y col., 1996] también encontraron que la temperatura de transición de fase gel a líquido del sistema DPPC/agua medido por RPE, usando ácido esteárico marcado (AE*), cambia por el agregado del marcador. Debido al desarrollo alcanzado en la comprensión de la estructura y dinámica de las bicapas lipídicas en las últimas décadas [Patra y col., 2004][Gawrisch y col., 2002], se ha tornado más importante establecer **cómo** la espectroscopía de RPE sensa y a la vez perturba su entorno. Esto será el propósito principal de esta tesis.

1.3. Membranas Modelo

Como ya se detalló en el apartado anterior, las membranas biológicas son estructuras relativamente complejas, que están constituidas por una gran diversidad de lípidos en diferentes proporciones. Simular una porción representativa de un sistema de esta complejidad está todavía fuera del alcance de las computadoras más rápidas. Por lo que hasta el momento solo se han hecho simulaciones de lípidos puros y mezclas simples de 2 o 3 lípidos.

De los lípidos que se hayan en mayor proporción, los fosfolípidos son los más abundantes y dentro de este grupo la dipalmitoil-fosfatidil-colina (DPPC) es la más representativa (Gráfico 1.3-A y 1.4A), por lo que, las bicapas construidas de este fosfolípido son de las más estudiadas tanto experimentalmente, como teóricamente. De hecho la DPPC es considerada banco de prueba para las simulaciones de DM[Tieleman y col., 1997]. Los lípidos que componen las bicapas lipídicas son moléculas anfífilas, lo que significa que presentan 2 zonas bien definidas: una zona hidrofóbica (apolar) compuesta en este caso por 2 “colas” hidrocarbonadas de 16 átomos de carbono, y una zona hidrofílica (o cabeza “polar”) constituida por un grupo fosfato (con carga negativa) y una colina (con carga positiva). Ambas regiones se unen por un puente glicerol.

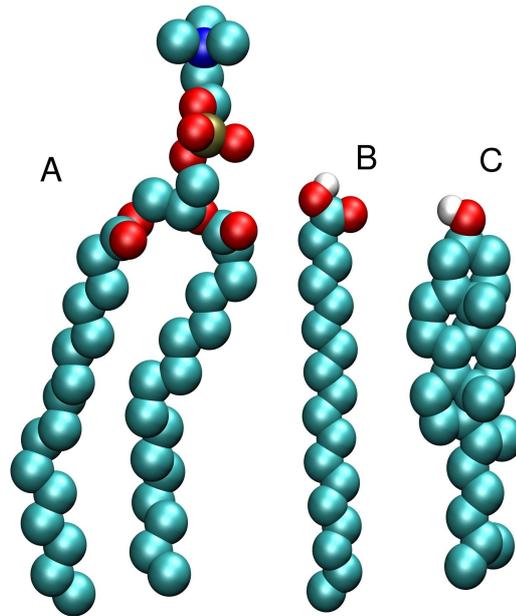


Gráfico 1.3: muestra en modelo de esferas de van der Waals, las moléculas de DPPC (A), ácido esteárico (B) y colesterol (C). Los átomos se colorearon de acuerdo al esquema CPK (Corey, Pauling-Kultun).

Hemos seleccionado como sistema modelo para este estudio una bicapa simple de ácido esteárico (AE) (sistema A), y una mezcla de AE-colesterol (sistema B) en agua. El primero como modelo de una bicapa lipídica en fase “simil-gel”, y la segunda como una fase simil-Líquido Ordenado (simil-LO).

El ácido esteárico (AE) es una estructura relativamente simple si lo comparamos con la de un fosfolípido (Gráfico 1.3 B y 1.4 B), pero que mantiene las características generales de una molécula anfifílica descrita más arriba. Presenta una “cola” hidrofóbica de 18 átomos de C, y una muy pequeña cabeza “polar” (hidrofílica) compuesta por el grupo químico carboxilo. El AE será para nuestro estudio el sistema huésped (sistema de lípidos, que representa la bicapa de lípidos cuyas propiedades queremos estudiar), pero además su versión modificada con el agregado de un grupo doxil, será la molécula “marcadora”, de cuyo comportamiento se extraerá información acerca de las propiedades del sistema huésped.

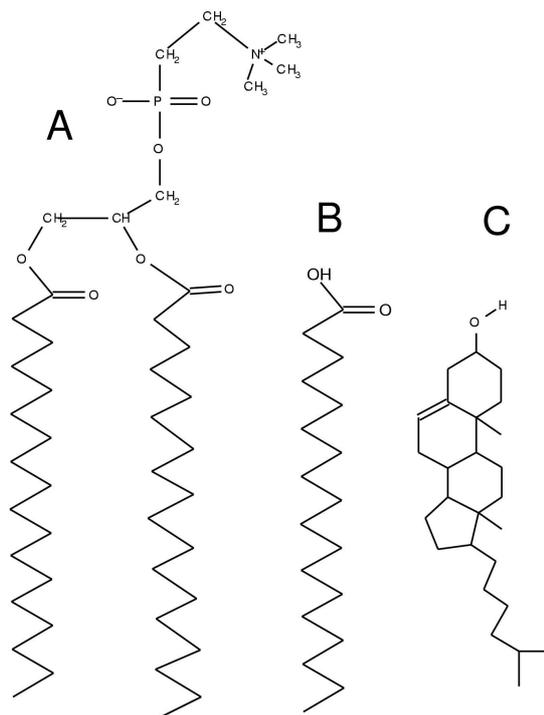


Gráfico 1.4: muestra las fórmulas desarrolladas de las moléculas de DPPC (A), ácido esteárico (B) y colesterol (C).

En el Gráfico 1.2-C y 1.3-C, se muestra además la estructura de la molécula de colesterol. Esta molécula se compone de una muy pequeña región polar constituida por la función OH, una zona relativamente rígida formada por un conjunto de anillos de átomos de C (3 insaturados y uno con una doble enlace) y finalmente una pequeña “cola” hidrocarbonada insaturada.

1.4. Elección de los Sistemas Modelo

Para realizar el análisis del comportamiento de un marcador de espín inserto en una membrana modelo, se decidió trabajar con una bicapa de AE por varias razones:

- Es un sistema mucho más simple, regular y ordenado, que la mayoría de los experimentos realizados sobre fosfolípidos, por lo que nos pareció interesante conocer esta faceta del comportamiento del marcador.
- Existen numerosos datos físico-químicos experimentales, dado que es un sistema muy empleado en el estudio y modelización de monocapas y

multicapas de Langmuir-Blodgett (L-B) [Peng y col., 2001][Ocko y Kelley, 2002]. Estos films Langmuir-Blodgett de AE han ganado un considerable interés en los últimos años [Ulman, 1991][Kaganer y col., 1999] en conexión con sensores altamente específicos o dispositivos basados en electrónica molecular.

- Se dispone de datos físico-químicos experimentales de sistemas Langmuir de ácidos grasos, con marcadores de espín [Cadenhead y Müller-Landau, 1976], y con el agregado de otros tipos de moléculas[Menger y col., 1988.].
- Existen estudios espectroscópicos de sistemas L-B de AE [Risse y col. 1998a][Risse y col., 1998b].
- Se cuenta con cálculos de DM de un sistema similar al nuestro, que nos puede servir para comparar con nuestras simulaciones [Höltje y col., 2001].
- El estudio de las capas de AE son relevantes en sí mismas dado que el estrato córneo de la piel, la capa más externa de la epidermis, está compuesta de ácidos grasos apilados [Höltje y col., 2001][Alonso, 2000].
- El AE es el lípido “transportador” más popularmente usado para caracterizar las membranas lipídicas y por lo tanto la comparación de las variables asociadas con el entorno y el marcador es directa. Las moléculas “transportadoras” son aquellas a las que se modifica, adicionándoles un grupo químico que presente algún átomo con espín electrónico. También se suele usar como molécula “transportadora” una molécula de fosfolípido modificada en una de sus cadenas acílicas. En nuestro caso se empleó el grupo “doxil”.

Por otra parte, se eligió trabajar con un marcador doxil ubicado en posición 10, que es el centro geométrico de la molécula y de la bicapa. Sin lugar a dudas realizar el estudio marcado a otros niveles de la bicapa es necesario y ya este siendo continuado en esa dirección.

Se estudió además un segundo sistema formado por AE con 30 % de colesterol, con dos objetivos fundamentales: estudiar el efecto “desordenante”, (simil “Líquido-Ordenado”), que produce el colesterol sobre

sistemas ordenados y segundo ver como el marcador de espín era capaz de reflejar este cambio en el comportamiento del sistema.

En forma resumida podemos decir que se estudiaron 4 sistemas modelo diferentes:

- Bicapas AE puro en agua. **Sistema A** (AE puro).
- Bicapas de AE marcadas con 10-doxil-AE. **Sistema A*** (AE/AE*).
- Bicapas de AE con 30 % de colesterol. **Sistema B** (AE/Colesterol).
- Bicapas de AE/colesterol/AE*. **Sistema B*** (AE/Colesterol/AE*).

Los sistemas A y A* representan una fase que denominamos *simil-gel* y los sistemas B y B* una fase que decidimos denominar *simil-Líquido Ordenada (simil-LO)*.

1.5. Descripción de los capítulos tratados en la Tesis

Se describe a modo de guía breve el contenido de los capítulos de la tesis:

Capítulo 1 (Introducción): el presente donde se describió brevemente el estado actual de la investigación sobre membranas biológicas y los modelos teóricos empleados para su análisis e interpretación.

Capítulo 2 (Teoría): se desarrollan los temas teóricos generales necesarios para la comprensión del método de simulación empleado en esta tesis, la Dinámica Molecular (DM). Además se introducen los temas que se emplearon para el análisis de los resultados obtenidos: Factor de Estructura Cristalográfico y Momento dipolar.

Capítulo 3 (Modelo Empleado en el Cálculo de los espectros de RPE): se describen los elementos teóricos que fueron fundamento para el cálculo e interpretación de los espectros de RPE obtenidos de la DM. Además, se incluyeron para apoyar los conceptos teóricos vertidos, simulaciones de espectros de RPE basados en distintas distribuciones de la orientación del grupo molecular paramagnético.

Capítulo 4 (*Bicapas de Ácido Esteárico (AE)*): construcción y simulación de sistemas de AE a distintas T (285K (**12°C**), 300K (**27°C**), 315K (**42°C**), 330K (**57°C**)) a tensión superficial constante ($\gamma = 12.5 \text{ N.m}$). Análisis de sus datos estructurales y dinámicos. Comparación con datos experimentales.

Capítulo 5 (*Bicapas de AE marcadas con 10-doxil-AE*): construcción y simulación de sistemas de AE/AE* a las mismas T descritas en el capítulo anterior. Análisis de datos estructurales y dinámicos. Simulación de espectros a partir de los datos de la DM. Comparación con espectros de RPE experimentales de muestras orientadas y no orientadas de:

- Monocapas de Langmuir de AE marcadas con 5, 12 y 16-doxil-AE
- Multicapas de Lecitina
- DPPC

Capítulo 6 (*Bicapas de AE con 30 % de colesterol*): construcción y simulación de bicapas de AE/colesterol (70/30). Análisis de datos estructurales y dinámicos.

Capítulo 7 (*Bicapas de AE/colesterol/AE):** construcción y simulación de bicapas de AE/colesterol /AE*. Análisis de datos estructurales y dinámicos. Simulación e interpretación de espectros a partir de los datos de la DM.

Capítulo 8 (*Conclusiones*): se analizan en forma global los resultados obtenidos.

CAPITULO 2

$$F_i = m_i \cdot \frac{d^2 r_i}{d t^2} \quad i = 1 \dots N$$

2. Teoría

En este capítulo se introducen los elementos teóricos utilizados durante el desarrollo de la tesis. En primer lugar se describen los fundamentos teóricos del método de simulación empleado, la Dinámica Molecular (**DM**). Finalmente se resaltan las distintas herramientas de análisis aplicadas en la interpretación de los resultados de la simulación.

2.1. Dinámica Molecular

2.1.1. Fundamentos

La física provee mucha información y conocimiento acerca de la estructura detallada de la materia, a nivel atómico. Esencialmente todas las interacciones y reacciones entre átomos pueden comprenderse a partir del movimiento de los electrones, y esto en principio podría describirse utilizando la mecánica cuántica. Las ecuaciones que relacionan las variables dinámicas son simples, pero solo pueden resolverse exactamente para configuraciones atómicas extremadamente sencillas. Resolver la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo para los electrones y núcleos de los átomos, para macromoléculas como proteínas de miles a millones de átomos, es hoy una meta irrealizable.

A nivel molecular, relativamente pocos procesos, en particular a nivel biomolecular requieren el uso de la mecánica cuántica. Por supuesto no puede describirse el proceso detallado de la ruptura o formación de un enlace sin ella, así como tampoco algunas vibraciones rápidas en algunos enlaces y ángulos de enlace, pero la mayoría de los movimientos son más que adecuadamente descritos por la mecánica clásica.

Por este motivo, los cálculos *ab initio* (cuánticos) pueden reemplazarse con una parametrización semiempírica de fuerzas clásicas en el sistema. Ya que esta aproximación es varios ordenes de magnitud más rápida que resolver la ecuación de Schrödinger, nos permite simular sistemas más grandes durante más tiempo. También permite llevar a cabo simulaciones bajo condiciones bioquímicas más realistas, ya que los cálculos de mecánica cuántica resultan computacionalmente muy costosos, como para incluir los efectos de solventes y temperatura.

El concepto de la dinámica molecular fue originalmente desarrollado en los primeros años de 1950 por [Alder y Wainwright, 1957], como una técnica para simular las colisiones de partículas duras en un sistema. La idea subyacente es bastante simple, pero requiere mucho poder de cómputo, aún para las computadoras estándares de hoy en día. Se trata de reproducir el comportamiento temporal de un sistema de N partículas interactuantes (ej.: átomos) con masas m_i , resolviendo directamente las ecuaciones de movimiento de Newton (ec. 2.1):

$$\vec{F}_i = m_i \cdot \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \quad i=1 \dots N, \quad [2.1]$$

Donde $\vec{r}_i(t)$ es la posición de la partícula i al tiempo t , y m es la masa de la partícula i . La fuerza instantánea $\vec{F}_i(t)$ *sobre* cada átomo tiene que calcularse de las interacciones en el sistema. Esta fuerza, está definida como el gradiente con respecto a la posición de la partícula i (es decir la pendiente) de la función V de energía potencial, la cual depende de las posiciones de todos los átomos del sistema.

$$\vec{F}_i = -\nabla V(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_n) \quad [2.2]$$

El cálculo de esta función de energía potencial es central para el algoritmo de simulación. Las ecuaciones indican que las fuerzas tratarán de mover los átomos a estados de menor energía potencial. La aceleración resultante nos indica como está cambiando la velocidad y de esta variación de velocidad, es posible estimar las posiciones aproximadas de los átomos en un período de tiempo posterior. La resolución de las ecuaciones de movimiento de cada partícula (átomo), resulta de integrar las mismas en un cierto intervalo de tiempo. Esta integración podría hacerse en forma analítica solo en contados casos. En el caso de sistemas más complejos que nos interesan, se recurre a métodos aproximados. El software empleado en las simulaciones de DM utiliza el algoritmo llamado “salto de rana” ([Hockney y Eastwood, 1981]) para la integración de las ecuaciones del movimiento. Este algoritmo usa las posiciones \vec{r} a tiempo t y las velocidades \vec{v} a tiempo $(t-\Delta t/2)$ para actualizar las posiciones y las velocidades utilizando las fuerzas $\vec{F}(t)$ determinadas por las posiciones a tiempo t .

$$\vec{v}_i(t+\frac{\Delta t}{2})=\vec{v}_i(t-\frac{\Delta t}{2})+\frac{\vec{F}_i(t)}{m}\cdot\Delta t \quad [2.3]$$

$$\vec{r}_i(t+\Delta t)=\vec{r}_i(t)+\vec{v}_i(t+\frac{\Delta t}{2})\cdot\Delta t \quad [2.4]$$

Este algoritmo se puede visualizar en el .

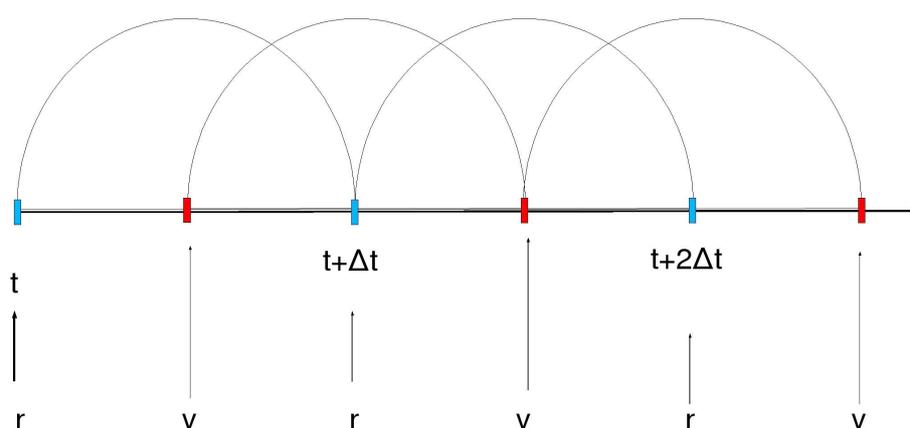


Gráfico 2.1: esquema de “salto de rana” empleado en el cálculo de las posiciones y las velocidades en una simulación de DM. Notar el desfase entre los tiempos a los cuales se calculan las posiciones y las velocidades de las distintas partículas.

Este proceso es llamado *integración de las ecuaciones de movimiento*, y repitiendo este proceso en un enorme número de pequeños pasos se obtiene *una trayectoria* con la evolución de las posiciones, velocidades y fuerzas sobre todos los átomos, durante la simulación. Si la función de energía potencial es una buena aproximación de las interacciones reales entre las partículas, esto puede proveer una detallada descripción, tanto de propiedades de equilibrio como dinámicas del sistema en estudio. La primera simulación de una biomolécula se realizó en 1977, pero el campo está avanzando a una velocidad increíble. La escala disponible en tiempo y espacio es aún limitada, comparada con muchos procesos bioquímicos, pero la performance está creciendo debido a una mejor paralelización de los algoritmos, programas y computadoras más potentes.

2.1.2. Las condiciones de contorno

La simulación de un sistema (sea este una molécula individual o un conjunto de átomos o moléculas) requiere establecer las condiciones de contorno para el mismo. La condición más simple es que nuestro sistema limite con el vacío. Esta condición, puede ser parcialmente aceptable para moléculas aisladas, pero no resulta apropiado en absoluto para simular líquidos, soluciones o sólidos, a no ser que estemos particularmente interesados en simular la interface sistema-vacío.

La simulación del sistema inmerso en el vacío produce efectos generalmente indeseados. Si se trata de una molécula única, aquellos átomos en contacto con el vacío, estarán afectados de fuerzas diferentes a las que existen en un sistema con las condiciones de borde reales, produciendo una distorsión de la superficie. Para macromoléculas esto significa que la conformación superficial estará deformada; para moléculas pequeñas la conformación de toda la molécula puede verse afectada.

Ninguno de estos problemas mencionados existiría para un sistema lo suficientemente grande. Pero a pesar del desarrollo que han tenido las computadoras, el número de partículas que se pueden manejar es reducido respecto de cualquier sistema real. En una muestra macroscópica, cuyo número de partículas es del orden de 10^{24} , la mayoría de las moléculas se

hallarán en el interior de la muestra. No ocurre lo mismo para una muestra de tamaño reducido. Por ejemplo si trabajáramos con un sistema de 1000 partículas en una caja cúbica, suponiendo una distribución regular, habría 600 partículas en la superficie. Una solución es utilizar *condiciones periódicas de contorno*. El establecer condiciones periódicas de contorno significa que consideramos para el cálculo no solamente las moléculas incluidas en una caja de simulación “real” sino además sus imágenes, es decir la repetición periódica de la unidad básica de simulación. Podemos ver en el caso bidimensional (por simplicidad del dibujo) dado por un rectángulo (en particular un cuadrado) y sus imágenes. Para situaciones más realistas, de tres dimensiones, se toma un paralelepípedo (ej.: un cubo) y sus 26 imágenes.

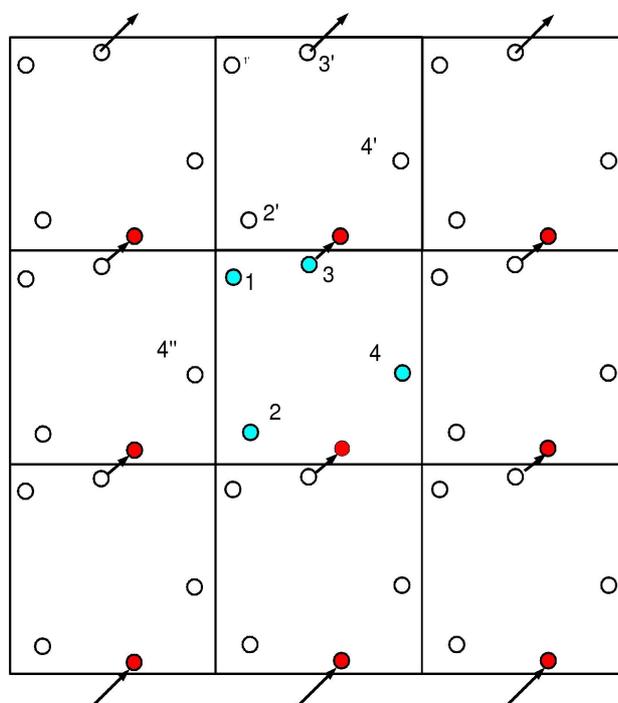


Gráfico 2.2: sistema periódico bidimensional de partículas. El cuadrado central representa la caja de simulación, y los 8 cuadrados que la rodean sus imágenes. Notar que cuando una partícula sale de la caja de simulación (partícula 3) su imagen reingresa desde una de sus imágenes.

En el Gráfico 2.2 observamos que cada partícula está ahora rodeada por otras, es decir que no hay partículas en la superficie (no hay superficie). Cada partícula está sometida a la interacción de todas las partículas de su alrededor, ya sea por las propias partículas de la caja o sus imágenes. Es evidente que, si la distancia de acción de las interacciones se

extiende sin límite es posible que una partícula sea afectada dos veces por la misma interacción, la “real” y su imagen (en la , la 1 con la 2 y 2'). Para evitar esta situación artificial es necesario establecer un *radio de corte* R_c para el potencial. Este límite en el alcance de la interacción no puede ser muy corto, porque produciría una situación artificial, ni debe superar la mitad de la caja ($R_c \leq L/2$, donde L es la longitud de la arista menor, puesto que no lograría el efecto buscado). Volviendo al gráfico, vemos que la partícula 1 interactúa con una imagen de la 2 (la 2'), en tanto que lo hace con la 3 y no con ninguna de sus imágenes. La regla que surge es que cada partícula interactúa con las de la caja o las imágenes según cual de ellas se encuentre más próxima.

Existe otra consecuencia (buscada) en la existencia de las condiciones periódicas de contorno. Al no existir superficie, ninguna de las partículas puede abandonar la caja. Si seguimos la trayectoria de una partícula que abandona la caja, veremos que una de sus imágenes ingresará por el lado opuesto. De ésta manera mantendremos constante el número de partículas que estamos simulando. Un efecto indeseado de las condiciones periódicas de contorno es que imponen una regularidad, inexistente en el mundo físico y que puede conducir a resultados que se relacionan con las repeticiones encontradas en las cajas imágenes, más que con las interacciones de la caja de simulación.

2.1.3. Campo de Fuerza

Una vez conocidas las ecuaciones de movimiento la tarea siguiente es definir y calcular la energía potencial $V\{r\}$. Existen muchas posibles elecciones para implementar esta función, y siempre es un compromiso entre una descripción tan detallada como sea posible pero que además pueda ser evaluada rápidamente por una computadora. Su expresión analítica, junto con los parámetros de interacción usados en la simulación, es llamado **Campo de Fuerza**. Varios campos de fuerza han sido desarrollados por diferentes grupos de investigación, pero la mayoría de ellos se hallan muy relacionados, como puede apreciarse en el Gráfico 2.3.

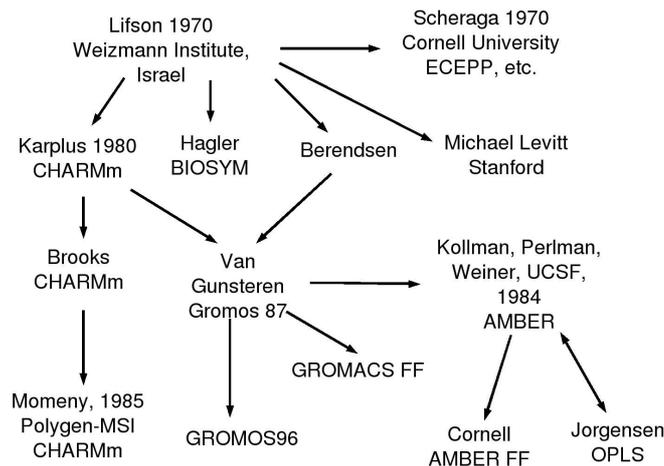


Gráfico 2.3: origen de los distintos campos de fuerzas empleados en mecánica molecular, así como sus relaciones.

Un potencial que provea una gran exactitud en todas las situaciones sería muy lento de calcular y por lo tanto no muy útil. De aquí que cuando se lo aplica a nivel molecular se realizan varias aproximaciones. Primero, está subdividido en contribuciones *enlazantes*, provenientes de los átomos que se hallan unidos por enlaces químicos e interacciones *no enlazantes* entre pares de átomos que se hallan próximos unos de otros. El potencial debido a la variación en el largo de enlace entre los átomos i y j es usualmente modelada como un resorte armónico simple,

$$V_{\text{enlace}}(r_{ij}) = \frac{k_{ij}^b}{2} \cdot (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 \quad [2.5]$$

Donde k_{ij}^b es la constante de fuerza que describe la rigidez del enlace y r_{ij}^0 es el largo de enlace para el cual esta interacción no genera ninguna fuerza, entorno dentro del cual se ubicará la distancia de enlace. De igual forma, se puede describir la variación de energía potencial asociada al cambiar el ángulo de enlace para los átomos i, j, k (donde i está unido a j , y j está unido a k) como:

$$V_{\text{ángulo}}(\theta_{ijk}) = \frac{k_{ijk}}{2} \cdot (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad [2.6]$$

Donde k_{ijk} es la constante de fuerza que determina que tan difícil será distorsionar el ángulo de enlace del átomo j , θ_{ijk}^0 . En las grandes moléculas

habrá también variaciones alrededor del enlace central en una secuencia de 4 átomos, como lo muestra el . Esto es un efecto de la configuración geométrica de los orbitales electrónicos enlazantes. Aunque la verdadera interacción es bastante complicada, es usualmente modelada con un simple potencial diédrico:

$$V_{\text{diédrico}}(\phi_{ijkl}) = k_{ijkl} \cdot [1 + \cos(n \cdot \phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^0)] \quad [2.7]$$

Existen solo 2 convenciones alternativas para asignar el valor 0 de este ángulo. Aplicamos la convención **bioquímica**, donde el ángulo 0 es en el estado *cis* (cuando los átomos 1 y 4 se hallan del mismo lado del enlace).

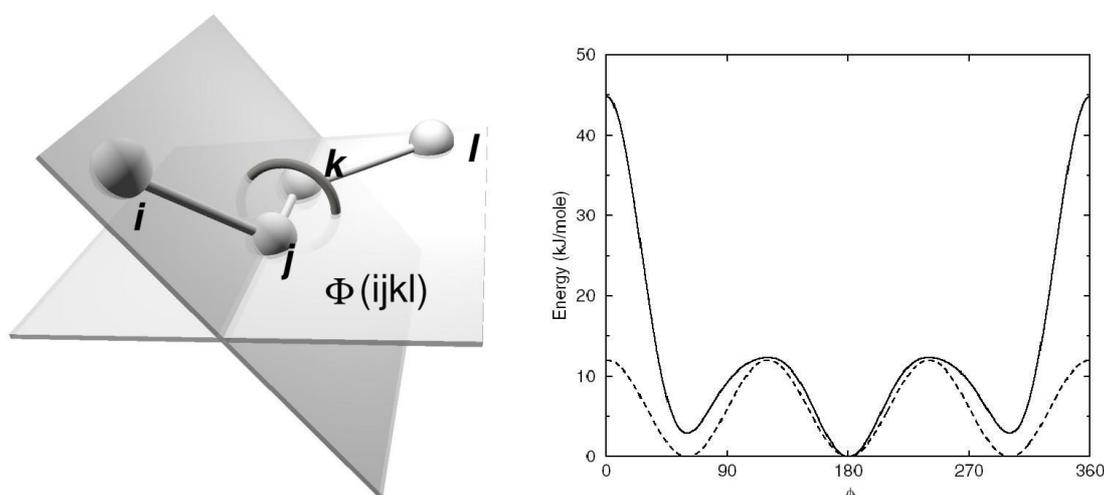


Gráfico 2.4: se muestra a la izquierda la definición geométrica de un ángulo diedro, según la convención bioquímica, en conformación "gauche". A la derecha se muestra en línea llena un potencial tipo Ryckaert-Bellemans y en línea discontinuas un potencial tipo coseno simple. El estado "cis" está ubicado en $\Phi(ijkl)=0^\circ$, "trans" en $\Phi(ijkl)=180^\circ$, y las 2 conformaciones "gauche" a 60° y 300° . El potencial de cosenos debe complementarse con las interacciones de Lennard-Jones 1-4.

La multiplicidad n determina el número de mínimos durante una rotación completa y Φ_{ijkl}^0 sus posiciones (Gráfico 2.4, líneas discontinuas). Para hidrocarburos alifáticos (por ej.: las colas no cargadas de las moléculas de lípidos) con 4 o más carbonos consecutivos, algunas veces necesitan una descripción de la barrera de potencial que explícitamente tenga en cuenta que 2 estados *gauche* a $\pm 60^\circ$ son ligeramente menos favorables que el *trans* a 180° y también que las transiciones entre *gauche* y *trans* son considerablemente más fáciles de atravesar que el cruce al estado *cis* debido a

la repulsión estérica entre los átomos 1 y 4. Ryckaert y Bellemans [Ryckaert y Bellemans, 1978] construyeron tal potencial que puede escribirse como la suma de 6 cosenos (ver Gráfico 4, línea de entera). Cuando se utiliza este potencial diédrico en lugar de uno ordinario, la interacción no enlazante responsable de la repulsión entre los átomos 1 y 4, debe ser removida. Todas estas interacciones se ocupan de los átomos que se hallan unidos por enlaces. Esto hace que se hallen muy próximos en el espacio, y aún más importante su número sólo aumentará linealmente con el tamaño del sistema, lo que significa que no son muy costosos de calcular. En contraste, existen muchas más interacciones no enlazantes entre los átomos separados por más de 3 enlaces o aún localizados en moléculas diferentes. El cálculo de estas fuerzas es la parte que consume más tiempo en una simulación de dinámica molecular, llevándose el 90 al 95 % del uso del procesador, aún asumiendo que todas las fuerzas se dan entre pares de partículas y desechando contribuciones más allá de algún límite de corte en distancia. Estas interacciones no enlazantes son usualmente descritas con un término repulsivo importante a corta distancia (originado en la superposición de las funciones de onda), fuerzas de dispersión atractivas que están siempre presentes, e interacciones electrostáticas entre partículas cargadas. Las componentes dispersivas y repulsivas son frecuentemente combinadas en la forma de un potencial de Lennard-Jones:

$$V_{Lennard-Jones}(r_{ij}) = \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \quad [2.8]$$

Donde $C_{ij}^{(12)}$ y $C_{ij}^{(6)}$ son los parámetros que dependen del tipo de átomos involucrados, determinando la cantidad de atracción y repulsión, respectivamente. El potencial resultante es débilmente atractivo a largas distancias pero fuertemente repulsivo cuando los átomos comienzan a superponerse. La repulsión electrónica es realmente mejor descrita por un término exponencial (interacción de Buckingham), pero la función exponencial es muy costosa de calcular en computadora y es por esto que es usualmente reemplazada por la expresión ligeramente más simple r^{-12} . Para pares de átomos cargados la interacción electrostática está dada por:

$$V_{coulomb}(r_{ij}) = \frac{q_i \cdot q_j}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot r_{ij}} \quad [2.9]$$

donde q_i y q_j son las cargas. La permitividad del vacío está designada por ϵ_0 y la permisividad relativa ϵ_r . La última es usualmente establecida en 1, lo cual podría parecer poco realista cuando se simulan sistemas con un valor experimental 80 veces mayor. Este apantallamiento macroscópico es sin embargo un efecto de las rotaciones y desplazamientos de todos los dipolos y moléculas. En dinámica molecular, todos estos movimientos son reproducidos explícitamente y la permisividad microscópica remanente es entonces considerablemente más baja, aproximándose al valor del vacío. Es aún posible argumentar que el valor debería ser mayor que la unidad, pero en muchos campos de fuerza esto está implícitamente corregido por la parametrización de las cargas para producir propiedades de equilibrio correctas. Existen muchos modelos más elaborados para la permisividad relativa, pero uno debe aceptar que es una característica macroscópica que no es fácil de representar a nivel atómico. La solución definitiva sería extender la descripción del campo de fuerza utilizando cargas que polaricen los enlaces. Recientemente ha habido exitosos intentos en agua pura [de Leeuw y Parker, 1998][van Maaren y van der Spoel, 2001]. Al presente, no son rutinariamente empleados en los campos de fuerza, por un lado debido a las dificultades en la parametrización y a problemas con la oscilación de la polarización, o bien a que los modelos son simplemente demasiado costosos computacionalmente.

2.1.4. Temperatura y Presión

La mayoría de las características observadas en los experimentos de laboratorio, no puede atribuirse a los átomos individuales, sino más bien a las propiedades colectivas de un gran número de átomos, por ej. la temperatura y la presión. Cuando realizamos una simulación, por ej. una proteína en agua, habitualmente queremos poder controlar la temperatura y presión del sistema.

La temperatura T de un sistema está directamente relacionada a la energía cinética promedio de los átomos y al número de grados de libertad N_f . La temperatura T puede obtenerse como:

$$T(t) = \frac{1}{N_f \cdot k_B} \cdot \sum_{i=1}^N m_i v_i(t) \cdot v_i(t) \quad [2.10]$$

donde k_B es la constante de Boltzmann. La temperatura efectiva de un sistema es un promedio de equilibrio $\bar{T} = \langle t \rangle$ de esta entidad sobre un intervalo de tiempo suficientemente largo. La temperatura inicial del sistema puede entonces establecerse asignando velocidades aleatorias con una distribución de Maxwell-Boltzmann del ancho correcto a los átomos. Adicionalmente el control de la temperatura del sistema, permite reducir los errores de redondeo en los algoritmos de integración y al uso del truncado de las fuerzas. Esto puede realizarse reescalando las velocidades de los átomos en cada paso por un factor calculado:

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t - \frac{\Delta t}{2})} - 1 \right)} \quad [2.11]$$

donde T_0 es la temperatura de referencia y τ es una constante de tiempo de acoplamiento. Este esquema de *acoplamiento débil* [Berendsen y col., 1984] producirá un relajación exponencial a la temperatura de referencia. Existen también técnicas de acoplamiento más elaboradas como la aproximación de Nosé-Hoover [Nosé, 1984][Hoover, 1985].

La simulación de la presión debe derivarse de la definición básica de fuerza por unidad de área de las paredes de la caja de simulación. Esto no es directamente accesible de la simulación, pero puede calcularse a partir del teorema virial.

$$2K = \mathcal{E} \quad [2.12]$$

donde K es el tensor de energía cinética traslacional promedio

$$K = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N v_i m_i \times v_i \quad [2.13]$$

Y el \mathcal{E} del sistema es:

$$\mathcal{E} = - \sum_{i=1}^N r_i \times F_i \quad [2.14]$$

El virial tiene una componente interna $\mathcal{E}_{interna}$ de las fuerzas dentro del sistema, y una contribución externa $\mathcal{E}_{externa}$ causada por la presión p sobre la superficie S de la celda de simulación,

$$\mathcal{E}_{interna} = - \sum_{i=1}^N r_i \times F_i^{Interna} \quad [2.15]$$

$$\mathcal{E}_{externa} = \int_S p_N r \times dS \quad [2.16]$$

Donde P_N es la componente de la presión normal al elemento de superficie dS . Para presión isotrópica esto puede simplificarse extrayendo el valor escalar p de la integral,

$$\mathcal{E}_{externa} = p \int_S r \cdot dS = p \int_V \nabla r dV = 3 p V \quad [2.17]$$

Donde cada tercera parte puede atribuirse a las dimensiones x, y, z. En el caso anisotrópico una relación similar se da para cada componente del tensor completo. Esto provee una fórmula para calcular la presión,

$$p = 2 \frac{K - \mathcal{E}_{interna}}{V} \quad [2.18]$$

utilizando las velocidades instantáneas, las posiciones y las fuerzas en el sistema. El escalar presión P iguala a la tercera parte de la traza de este tensor, es decir, el promedio en las dimensiones x, y, z.

La presión resultante puede mantenerse constante a través de un método de acoplamiento muy similar al de temperatura, escalando las coordenadas de todas las partículas y el tamaño de la caja en cada paso de tiempo con un factor μ (comparar con la ec. 2.2.11),

$$\mu = \sqrt[3]{1 + \frac{\Delta t}{\tau_p} \beta (P - P_0)} \quad [2.19]$$

Para cualquier valor razonable de la compresibilidad β [Berendsen y col., 1995][Lindahl y col., 2001], esta ecuación producirá una relajación exponencial de la presión, similar al acoplamiento de temperatura débil.

2.1.5. Dinámica Molecular con Restricciones

La aplicación de restricciones a ciertos grados de libertad, permite suprimir movimientos rápidos cuyo detalle no nos interesa para un estudio particular. De esa forma es posible incorporar intervalos de integración mayores y obtener la simulación en un tiempo aceptable. En principio la restricción puede aplicarse a cualquiera de los movimientos moleculares, incluso hasta obtener un cuerpo rígido. En la práctica se aplican particularmente a las vibraciones interatómicas. El movimiento de los ángulos de enlace suele ocasionalmente suprimirse, sin embargo sus tiempos característicos son del orden de 10^{-13} s. por lo que un tiempo de integración de $1 - 2$ fs ($1 \cdot 10^{-15} - 2 \cdot 10^{-15}$ s) permite describir adecuadamente su movimiento sin necesidad de apelar al recurso de las restricciones.

El procedimiento implementado en la rutina "SHAKE" [Ryckaert y col., 1977], cambia un conjunto de coordenadas sin restricción r' a un conjunto de coordenadas r'' que cumplen con una lista de restricciones de distancia, utilizando un conjunto r como referencia.

$$SHAKE(r' \rightarrow r''; r)$$

Esta acción es consistente con resolver un conjunto de multiplicadores de Lagrange en las ecuaciones de movimiento restringidas. Asume que las ecuaciones de movimiento a restringir deben cumplir K restricciones holonómicas, expresadas como:

$$\sigma_k(r_1 \cdots r_n) = 0; k = 1 \cdots K \quad [2.20]$$

Luego las fuerzas se definen como:

$$\frac{-\partial}{\partial r_i} \left(V \cdot \sum_{k=1}^K \lambda_k \cdot \sigma_k \right) \quad [2.21]$$

Donde λ_K son los multiplicadores de Lagrange necesarios para que se

cumplan las ecuaciones del movimiento restringidas. La segunda parte de esta suma determina las fuerzas de restricción G_i , definidas como:

$$G_i = - \sum_{k=1}^K \lambda_k \cdot \frac{\partial \sigma_k}{\partial r_i} \quad [2.22]$$

El desplazamiento debido a las fuerzas de restricción en el esquema de Verlet o el de “salto de rana” es igual a: $G_i/m_i \cdot (\Delta t)^2$. Obtener los multiplicadores de Lagrange (y por lo tanto lo desplazamientos) requiere resolver un conjunto de ecuaciones acopladas de segundo grado. Estas son resueltas iterativamente por SHAKE.

Otro de los algoritmos empleados para aplicar restricciones es LINCS [Hess y col., 1997]. Este algoritmo regresa las distancias después de un paso sin restricción. El método es no iterativo, siempre utiliza dos pasos. Este método es más estable y rápido que SHAKE, pero solo puede emplearse para restringir enlaces y ángulo aislados, como el ángulo entre un protón y un O en un grupo OH. En el Gráfico 2.5 se muestra esquemáticamente los pasos

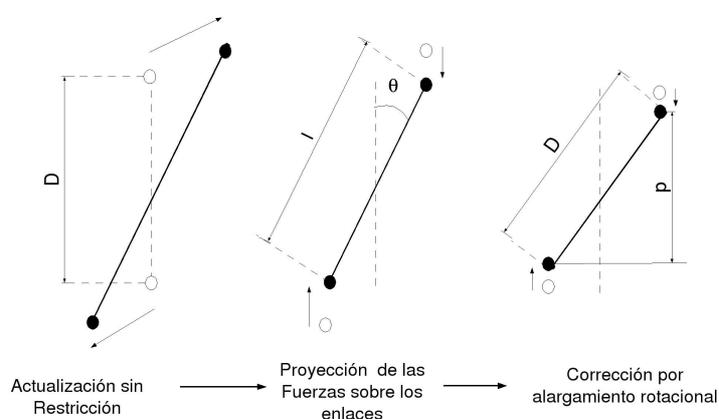


Gráfico 2.5: algoritmo de LINCS, donde las restricciones en el largo de los enlaces es realizada en 2 pasos. La corrección inicial se realiza sin restringir las coordenadas, la proyección del nuevo enlace sobre el viejo se establece al largo del último. Luego, el segundo paso corrige el alargamiento debido a la rotación del enlace.

del algoritmo.

2.1.6. Limitaciones

Aunque la Dinámica Molecular (DM) es una técnica potencialmente poderosa, es importante considerar que como cualquier

método tiene sus limitaciones, las cuales deben ser consideradas. Primero, las interacciones moleculares son enteramente clásicas. Aunque usualmente, es una aproximación apropiada, existen excepciones. De acuerdo a la mecánica cuántica los átomos aislados pueden atravesar las barreras de potencial sin pasar por los máximos, por “efecto túnel”; y por lo tanto no podemos esperar describir apropiadamente las reacciones químicas en las se forman y se rompen enlaces. Además, los átomos de H son muy livianos y sus movimientos limitan con la mecánica cuántica. Uno podría realizar cálculos de mecánica cuántica, lo cual está fuera de discusión, o podría aplicar términos de corrección a la energía y al calor específico de las oscilaciones de los enlaces [Nagle y Wiener, 1988] Alternativamente, estos grados de libertad podrían removerse y los enlaces podrían tratarse como rígidos, aproximándonos al estado basal de un oscilador de la mecánica cuántica. Esto tiene la ventaja adicional de que los tiempos de integración pueden incrementarse significativamente (de 1 fs a 2 fs). Este tipo de restricciones dinámicas son usualmente realizadas.

Finalmente, la exactitud de una simulación es enteramente dependiente de la exactitud del campo de fuerza empleado, el cual contiene diversas aproximaciones e incertezas en sus parámetros. Podría parecer buena idea comenzar consistentemente desde la mecánica cuántica y derivar valores detallados para cada interacción particular. Desafortunadamente esto se contrapone con otra importante aproximación, todas las fuerzas son asumidas como provenientes de a pares de átomos. Por supuesto uno podría incluir interacciones de a tres y cuatro partículas, pero esto sería computacionalmente muy costoso. Una alternativa que funciona apropiadamente es utilizar parámetros efectivos semiempíricos, que hayan sido corregidos para contemplar las interacciones de mayor orden mientras siguen siendo aditivo de a pares. Además se desechan todos los efectos dinámicos, como la polarización de los enlace. Para acelerar el cálculo de las fuerzas, las interacciones no enlazantes son usualmente cortadas más allá de 1 a 2 nm. Esta aproximación resulta razonable para las interacciones tipo Lennard-Jones, pero no siempre lo es para las interacciones electrostáticas si existen cargas libres en el sistema. Es por ello que se emplea para las interacciones electrostáticas, cada vez con mayor frecuencia un algoritmo

basado en las sumas de Ewald [Ewald, P.P., 1921][Darden, T. y col., 1993][Essman, U. y col. 1995]. Este algoritmo permite realizar la suma completa de las fuerzas entre las infinitas imágenes periódicas de todos los átomos, pero debido a las condiciones periódicas de contorno, éstas sobre enfatizan la periodicidad artificial del sistema y algunas veces introduce un ordenamiento no natural.

No obstante, siempre que estas aproximaciones sean tenidas en mente y los resultados sean cuidadosamente controlados, la DM es un método confiable para estudiar los movimientos en macromoléculas biológicas.

2.2. Herramientas empleadas en la interpretación de los resultados

2.2.1. Momento Dipolar

El momento dipolar describe la asimetría de la distribución de carga de una molécula. Si consideramos una partícula cualquiera cargada negativamente q^- y otra cargada positivamente q^+ , separadas por una distancia d (Gráfico 2.6) su distribución de carga es claramente asimétrica.

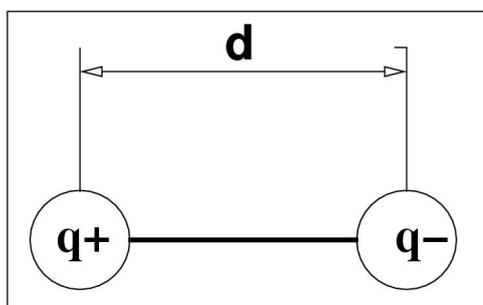


Gráfico 2.6: se muestra esquemáticamente 2 cargas puntuales separadas por una distancia d .

Esta asimetría puede describirse mediante el *momento dipolar*, μ , definido como :

$$\vec{\mu} = q \vec{x} \quad [2.23]$$

esta definición puede extenderse para cubrir casos más realistas. Si una molécula posee varios grupos cargados, el momento dipolar estará dado por:

$$\vec{\mu} = \sum_i q_i \vec{x}_i \quad [2.24]$$

donde x_i es el vector distancia desde un origen arbitrario.

Se calculó el promedio sobre todas las moléculas de ácido esteárico (AE) de una monocapa del módulo de la proyección xy del momento dipolar del grupo carboxilo (cabeza), según la ecuación 2.25

$$\vec{u} = \sum_{i=1}^n q_i \cdot \vec{r}_i \quad \begin{array}{l} q_i \text{ carga parcial de cada átomo } i \\ \vec{r}_i \text{ vector posición del átomo } i \end{array} \quad [2.25]$$

2.2.2. Factor de Estructura

El factor de estructura es un concepto derivado de la cristalografía, y que se halla relacionado con la regularidad y la uniformidad hallada en el espaciado de los átomos dentro de una red cristalina. El factor de estructura, es el resultado de los efectos de interferencia interna debido a la relaciones de fase geométricas entre todos los átomos incluidos en la celdilla unidad.

Desde un punto de vista geométrico, en las redes cristalográficas se pueden considerar líneas y planos reticulares que son los que pasan a través de nudos de la red (ó puntos reticulares) (Gráfico 2.7).

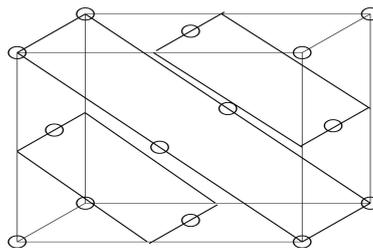


Gráfico 2.7: celdilla con una familia de planos reticulares, los cuales tendrán asociado un triplete de índices de Miller.

El número de partes en que una familia de planos reticulares corta a los ejes de la celdilla puede asociarse con un triplete de números que identifica a la familia de planos (índices de Miller).

La ondas dispersadas por una celda unidad conteniendo n átomos es la suma de las ondas dispersadas por cada uno de los átomos:

$$F(h, k, l) = \sum_{j=1}^n f_j e^{i\alpha_j} \quad [2.26]$$

donde f_j es la dispersión producida por un átomo y α_j es el factor de fase de la onda dispersada por cada átomo. $F(h, k, l)$ caracteriza una onda dispersada con un dado ángulo α especificado por la ecuación de Bragg y con los índices de Miller, h , k y l . La ecuación 2.2.27 puede escribirse:

$$F(h, k, l) = \sum_{j=1}^n f_j \cos \alpha_j + i \sum_{j=1}^n f_j \operatorname{sen} \alpha_j \quad [2.27]$$

A partir de esta última expresión podemos escribir el factor de estructura como:

$$F(h, k, l) = A(h, k, l) + i B(h, k, l) \quad \text{donde} \quad [2.28]$$

$$A(h, k, l) = \sum_{j=1}^n f_j \cos \alpha_j \quad \text{y} \quad B(h, k, l) = \sum_{j=1}^n f_j \operatorname{sen} \alpha_j$$

La magnitud de $F(h, k, l)$ que es la propiedad medida será:

$$|F(h, k, l)| = [A^2(h, k, l) + B^2(h, k, l)]^{1/2} \quad [2.29]$$

En particular nos interesa buscar aquellos planos que caracterizan la regularidad bidimensional, por lo que solo nos quedaremos con los índices h y k . Las ecuaciones finales empleadas para el cálculo son:

$$A(h, k) = \sum_{j=1}^n f_j \cos [(2\pi)(hX_j + kY_j)] \quad [2.30]$$

$$B(h, k) = \sum_{j=1}^n f_j \operatorname{sen} [(2\pi)(hX_j + kY_j)] \quad [2.31]$$

Si solo interesa caracterizar la periodicidad bidimensional de todos los átomos de la misma especie, puede asignarse el valor $f_j = 1$.

El factor de estructura es máximo cuando los átomos presentan un ordenamiento repetitivo similar a un cristal, de tal manera que las ondas dispersadas presenten una interferencia constructiva en algunas direcciones y destructiva en las restantes.

Para dar una idea intuitiva sobre el uso del factor de estructura como herramienta en el análisis del ordenamiento de los AE, se generaron 3 distribuciones de puntos bidimensionales, con los mismos parámetros de red, pero introduciendo en cada una, un factor de desorden aleatorio en xy distinto. En el Gráfico 2.8 -A, B y C se muestran las grillas para los distintos desplazamientos aleatorio en las coordenadas x e y (en unidades arbitrarias):

- A) 0.00 (símil cristal)
- B) 0.05
- C) 0.10

Los gráficos de contorno 2.-D, E y F, muestran los valores del factor de estructura en función de los números de onda q_x y q_y (inversa de las unidades arbitrarias empleadas en las grillas); para las grillas A, B y C respectivamente. Puede apreciarse como a medida que el “desorden” crece (aumenta el factor aleatorio sobre la coordenadas x e y) van desapareciendo picos en los gráficos de contorno del factor de estructura.

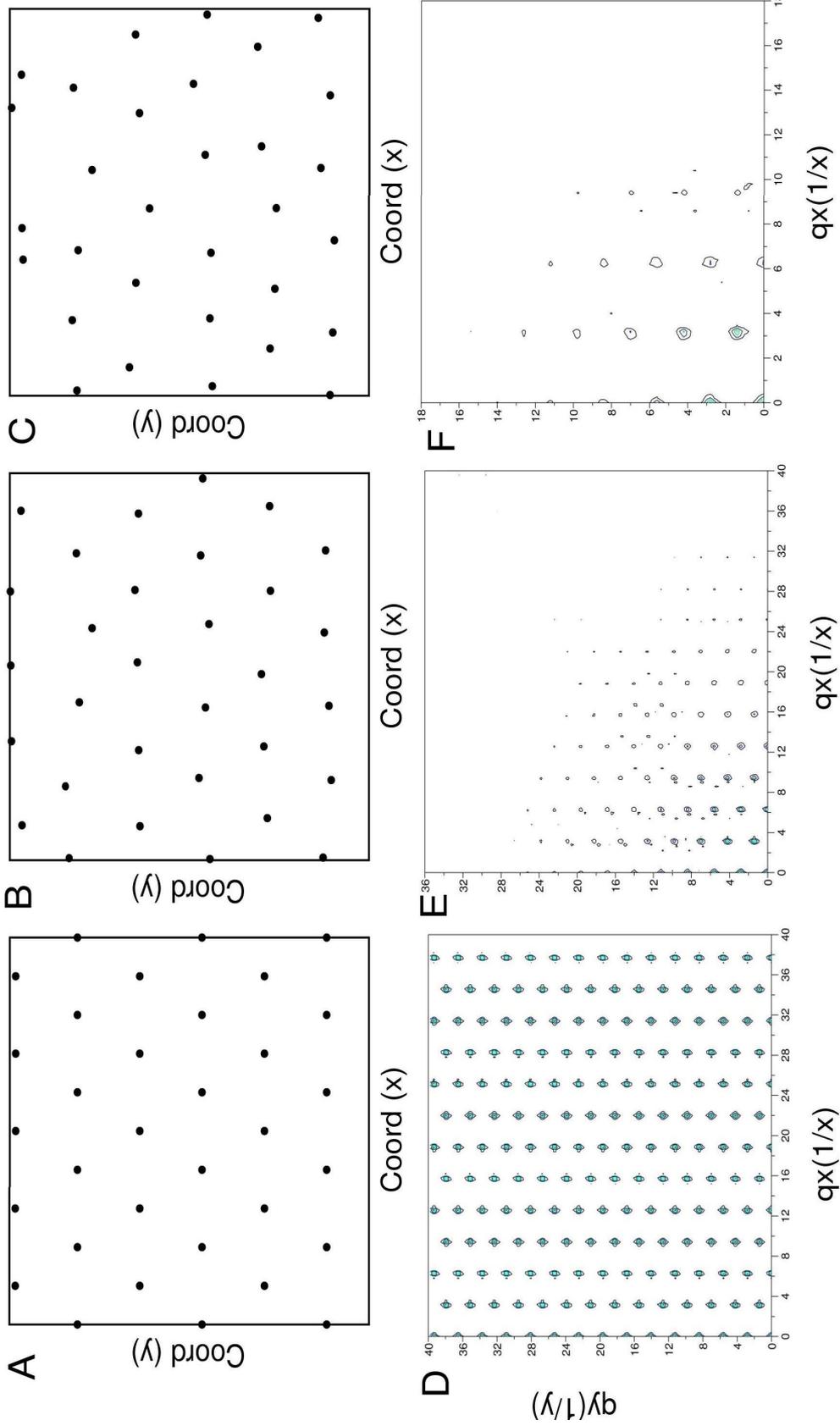
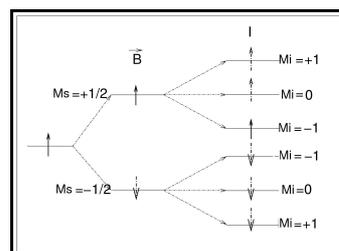


Gráfico 2.8: se muestran 3 distribuciones de puntos bidimensionales (A, B y C), con los mismos parámetros de red, pero introduciendo en cada una, un factor de desorden aleatorio en xy distinto. La grilla A es similar a un cristal (desorden 0); las grillas B y C (desorden creciente de B a C). Los gráficos de contorno 2.8-D, E y F, muestran los valores del factor de estructura en función de los números de onda qx y qy (inversa de las unidades arbitrarias empleadas en las grillas); para las grillas A, B y C respectivamente.

CAPITULO 3



3. Modelo aplicado al Cálculo de los Espectros de RPE

Uno de los objetivos de esta tesis es interpretar el comportamiento a nivel molecular de un marcador de espín, inserto en una bicapa modelo de AE. Pero esta interpretación, no sería completa si no se analizara como, este comportamiento molecular se traduce, en un espectro de RPE, el cual es una herramienta muy empleada, para comprender la dinámica de distintos tipos de membranas biológicas y sintéticas. Con este objetivo se desarrolló un software, que calculara el espectro de RPE, a partir del comportamiento a nivel molecular; obtenido de la DM, es decir a partir de las distintas orientaciones alcanzadas por el marcador durante el tiempo de la simulación. En primer lugar se describe someramente los modelos empleados, para finalmente analizar, las pruebas realizadas sobre el modelo.

3.1. Modelo Empleado

3.1.1. Teoría

El efecto Zeeman es el responsable de la separación de niveles de energía de los estados del electrón con distinta proyección de espín, cuando este es colocado en un campo magnético externo. Esta separación de estados de distinta E, hace que sea posible, que se produzca una transición de

un estado a otro, cuando sobre el sistema incide radiación de la energía $\Delta E = h \cdot \nu$ apropiada (Gráfico 3.1).

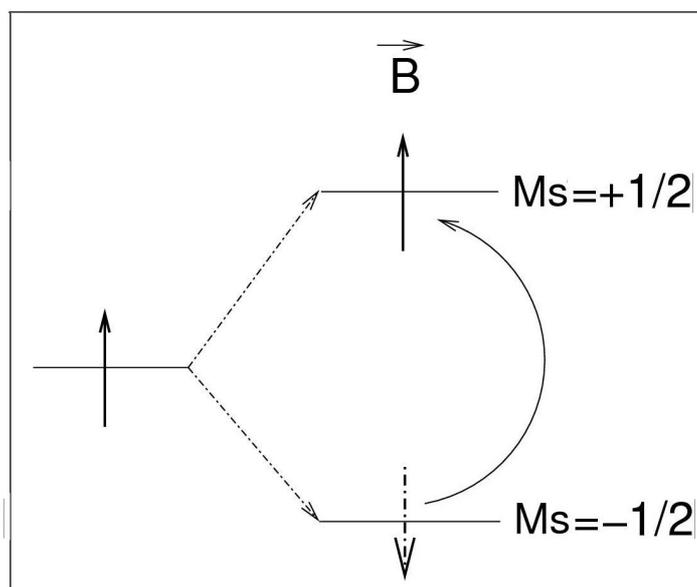


Gráfico 3.1: separación de niveles de E del espín electrónico cuando es sometido a un campo magnético externo.

Por otra parte, se conoce que los espectros de RPE, de marcadores del tipo de los empleados en esta tesis, presentan 3 picos. Estos provienen de la denominada “separación hiperfina” (Gráfico 3.2), la cual se debe a que el momento magnético del electrón siente la contribución al campo magnético local generada por el momento magnético nuclear sumada al campo magnético externo (en nuestro caso del N). Si observamos en el , vemos que ahora se cuenta con 6 estados posibles de distinta E.

Dado que las transiciones permitidas son aquellas con $\Delta_{MS} = \mp 1$ y $\Delta_{MI} = 0$; nos quedan la tres transiciones, que explican en forma general el espectro de RPE, de este tipo de marcadores.

Si solo existiera este efecto, un espectro de RPE, sería un espectro con tres líneas, centradas en las frecuencias correspondientes a las E de transición, pero en general, debido a la vida media de los estados de espín y a las características del equipo de medición, no es posible recuperar un espectro de línea, sino un espectro con un cierto ancho de línea (tipo lorentziana u otra), que envuelve a cada línea. Además debido a características propias de los equipos de RPE, los espectros obtenidos son

derivadas de los espectros de absorción.

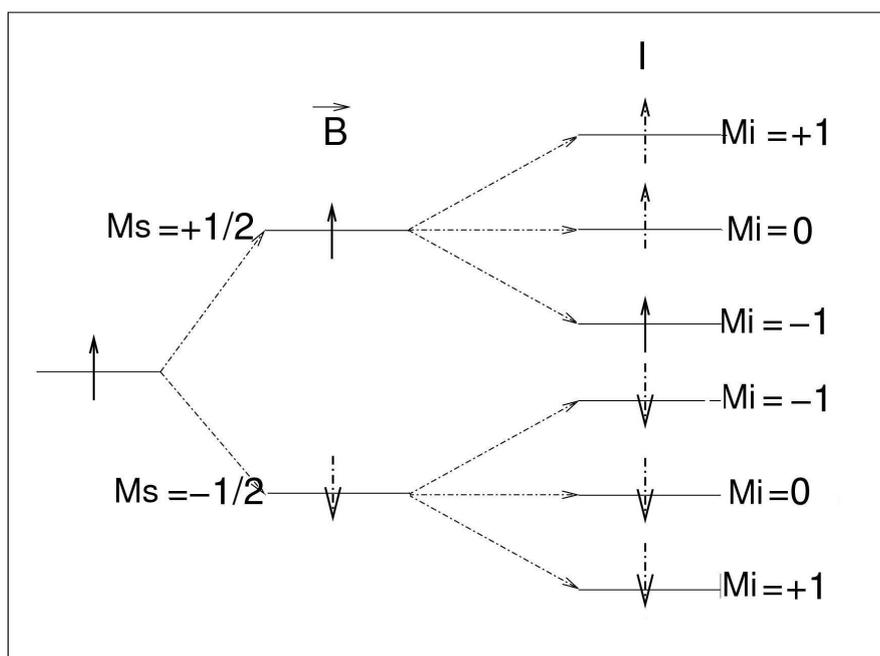


Gráfico 3.2: separación de niveles de E del espín electrónico en un campo magnético externo, bajo la influencia del momento magnético nuclear de un átomo (en nuestro caso el N).

El formalismo que explica la forma y posición de los máximos y mínimos de los espectros de RPE, se puede describir a partir de un Hamiltoniano, compuesto por un término Zeeman y otro hiperfino. El término dipolar puede despreciarse, si consideramos que la concentración de marcadores que suele emplearse en los experimentos de RPE es suficientemente bajo, y por lo tanto las interacciones entre dos marcadores de espín pueden despreciarse.

$$\hat{H} = \hat{H}_{zeeman} + \hat{H}_{hiperfina} + \hat{H}_{dipolar} \quad [3.1]$$

Si realizamos la aproximación de considerar la componente z del operador vectorial S (z en la dirección del campo magnético), como la más importante (despreciando las componentes x e y) el Hamiltoniano general puede expresarse:

$$\hat{H} = \underbrace{g_{ZZ} \cdot \beta \cdot B_{res} \cdot \hat{S}_Z}_{\hat{H}_{Zeeman}} + \underbrace{A_{zz} \cdot \hat{S}_Z \hat{I}_Z + [A_{xz} \cdot \hat{S}_Z \hat{I}_X + A_{yz} \cdot \hat{S}_Z \hat{I}_Y]}_{\hat{H}_{Hiperfina}} \quad [3.2]$$

La solución de este Hamiltoniano, resulta en los 6 autovalores que definen las energías de cada uno de los estado posibles (). Si

consideramos como transiciones permitidas, entre los diferentes estados, aquellas que cumplen con $\Delta_{MS} = \pm 1$ y $\Delta_{MI} = 0$, y el campo magnético B en la dirección de la terna de ejes de laboratorio, la expresión que nos permite calcular los campos magnéticos a los cuales se producirá la resonancia será:

$$B_{res} = \frac{h \cdot \nu - m_i \cdot [A_{ZZ}^2 + A_{XZ}^2 + A_{YZ}^2]^{1/2}}{g_{ZZ} \cdot \beta_e} \quad m_i = -1, 0, +1 \quad [3.3]$$

Donde g_{ZZ} y los términos con A se refieren a las componentes de los tensores g y A en la terna de laboratorio (notar: subíndices en mayúsculas).

3.1.2. Definición de las Ternas de ejes empleados en el cálculo

Es importante destacar a los fines de los cálculos subsiguientes, los 3 sistemas de ejes empleados ().

Terna de ejes de laboratorio: donde el eje “Z”, se eligió coincidente con la dirección del campo magnético externo (B).

Terna de ejes de la muestra: donde el eje “Z” se eligió perpendicular a la bicapa en estudio.

Terna de ejes del marcador doxil: el eje “x” se eligió coincidente con el enlace N-O del marcador. El eje “z”, paralelo al orbital 2p, entre el átomo de N y O, conteniendo al electrón desapareado. El eje “y” perpendicular al plano xz. Es importante notar que el z de esta terna es el eje alrededor del cual los tensores A y g, presentan simetría aproximadamente axial. Este eje a su vez apunta en la dirección normal al plano medio anillo doxil.

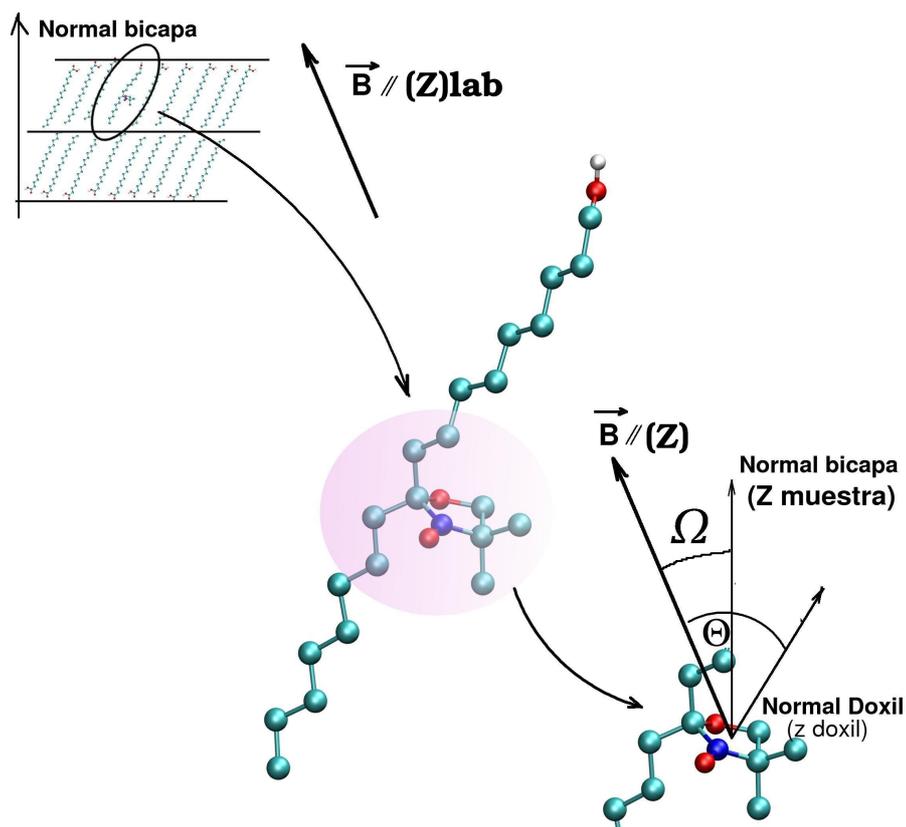


Gráfico 3.3: muestra los 3 sistemas de ejes de coordenadas empleados en el desarrollo de este capítulo: un sistema de ejes sobre el anillo doxil, un sistema de ejes de la muestra y un sistema de ejes de laboratorio. Para mayor simplicidad solo se muestran los ejes Z de cada uno de ellos.

Los datos iniciales para poder calcular los espectros de RPE, son los tensores, conocidos experimentalmente para moléculas cristalizadas, que contienen un marcador doxil. En general, se describen como matrices diagonales (en la terna de ejes del marcador)

$$g = \begin{bmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{bmatrix} \quad A = \begin{bmatrix} A_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & A_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & A_{zz} \end{bmatrix} \quad [3.4]$$

Notar que los subíndices empleados en estas matrices, están en minúsculas, para diferenciarlas de los subíndices de las matrices en la terna de laboratorio, que se mostraron en mayúsculas.

Para conocer los valores de estos tensores en la terna de laboratorio, se utilizan matrices de rotación de cosenos directores, L.

$$g' = L \cdot g \cdot L' \quad A' = L \cdot A \cdot L'$$

Estas matrices son funciones de los ángulos Θ y Φ (Grafico 3.3, en el cual se incluye por simplicidad los ejes z de cada terna). El ángulo Θ es el ángulo formado por la normal al anillo doxil con respecto al campo magnético B , y el ángulo Φ es el formado por la proyección del vector normal al anillo doxil, respecto al eje x de laboratorio. Con esta convención, el campo de resonancia puede expresarse en forma general:

$$B_{res}(\Theta, \Phi) = \frac{h \cdot \nu - m_i \cdot [A(\Theta, \Phi)]^{1/2}}{g(\Theta, \Phi) \cdot \beta_e} \quad m_i = -1, 0, +1 \quad [3.5]$$

Sabemos que cada línea de resonancia, presentará un ensanchamiento (como consecuencia de interacciones no incluidas explícitamente en el Hamiltoniano y al proceso de medición), que en particular decidimos modelarlo con una función Lorentziana, de ancho Γ . Si además, tenemos en cuenta que en la medición de RPE se mide la derivada del espectro de absorción, cada línea contribuirá al espectro de resonancia con un término de forma:

$$L(B, \Theta, \Phi) = \frac{\left(\frac{\Gamma(\Theta, \Phi)}{\pi} \right) \cdot [B_{res}(\Theta, \Phi) - B]}{\left[\left(\frac{\Gamma(\Theta, \Phi)}{2} \right)^2 + (B_{res}(\Theta, \Phi) - B)^2 \right]^{3/2}} \quad [3.6]$$

Donde el parámetro $\Gamma(\Theta, \Phi)$ se aproximó por la siguiente expresión para contemplar distintas contribuciones usuales con dependencia angular al ancho de línea [Pilbrow, J.R. 1990][Abragham, A. and Bleaney, B. 1970][Pake, G.E. 1962]:

$$\Gamma(\Theta, \Phi) = \Gamma_L + \Gamma_{L\Theta} \cos^2(\Theta) + \Gamma_{L\Phi} \sin^2(\Theta) \cos^2(\Phi) \quad [3.7]$$

Con el fin de contar con una forma de la línea de resonancia mas apropiada, se propone una convolución de la función Lorentziana con una función Gaussiana.

$$L'(\Theta, \Phi, B) = \int L(\Theta, \Phi, B') \exp \left[-4 \cdot \ln(2) \left(\frac{B-B'}{\Gamma_G(m_I)} \right)^2 \right] dB' \quad [3.8]$$

Dado que los elementos xx e yy de los tensores g y A adoptan valores muy semejantes (debido a la simetría del marcador doxil) podemos aproximarlos (en la terna del marcador):

$$g = \begin{bmatrix} \frac{(g_{xx} + g_{yy})}{2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{(g_{xx} + g_{yy})}{2} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} g_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & g_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & g_{\parallel} \end{bmatrix} \quad [3.9]$$

$$A = \begin{bmatrix} \frac{(A_{xx} + A_{yy})}{2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{(A_{xx} + A_{yy})}{2} & 0 \\ 0 & 0 & A_{zz} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & A_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & A_{\parallel} \end{bmatrix} \quad [3.10]$$

Empleando esta aproximación la posición de las líneas del espectro solo depende del ángulo Θ .

Existen otros motivos como veremos más adelante, que justifican el empleo de esta aproximación. Además se transformó la expresión para incorporar un término dependiente de $(3\cos^2\Theta - 1)$, el cual será de utilidad en interpretaciones posteriores (Θ es el ángulo del vector normal al anillo doxil respecto al campo B, el cual recordemos que es paralelo al eje **Z** de laboratorio):

$$\hat{H} = \bar{g}_{isot} \beta B_{res} S_{ZZ} + \bar{A}_{isot} I_Z S_Z + (g_{Max} \beta B_{res} S_{ZZ} + A_{Max} I_{ZZ} S_{ZZ})(3\cos^2\Theta - 1) \quad [3.11]$$

$$\bar{A}_{isot} = \left(\frac{1}{3}A_{\parallel} + \frac{2}{3}A_{\perp}\right) \quad A_{Max} = \frac{1}{3}(A_{\parallel} - A_{\perp}) \quad A_{\parallel} = 32.7G \quad A_{\perp} = 5.85G$$

$$\bar{g}_{isot} = \left(\frac{1}{3}g_{\parallel} + \frac{2}{3}g_{\perp}\right) \quad g_{Max} = \frac{1}{3}(g_{\parallel} - g_{\perp}) \quad g_{\parallel} = 2.0027 \quad g_{\perp} = 2.0076$$

Notar que g_{\parallel} es menor que g_{\perp} por lo que g_{Max} toma valores negativos. Como puede apreciarse nuestro Hamiltoniano presenta 2 términos independientes de la orientación y 2 términos dependientes de la orientación.

Si calculamos los autovalores de E, para las transiciones permitidas $\Delta_{MS}=\pm 1$ y $\Delta_{MI}=0$, y despejando B_{res} .

$$B_{res}(\Theta) = \frac{h \cdot \nu - m_i \cdot [(\frac{1}{3} A_{\parallel} + \frac{2}{3} A_{\perp}) + \frac{1}{3} (A_{\parallel} - A_{\perp})(3 \cos^2 \Theta - 1)]}{[(\frac{1}{3} g_{\parallel} + \frac{2}{3} g_{\perp}) + \frac{1}{3} (g_{\parallel} - g_{\perp})(3 \cos^2 \Theta - 1)] \cdot \beta_e} \quad m_i = -1, 0, +1 \quad [3.12]$$

$$B_{res}(\Theta) = \frac{h \cdot \nu - m_i \cdot [\bar{A}_{isot} + A_{Max}(3 \cos^2 \Theta - 1)]}{[\bar{g}_{isot} + g_{Max}(3 \cos^2 \Theta - 1)] \cdot \beta_e} \quad m_i = -1, 0, +1 \quad [3.13]$$

Esta última expresión representa el espectro que le correspondería a un marcador de espín con una dada orientación respecto al campo magnético externo y será la que se empleará para muchas de las interpretaciones subsiguientes.

Si consideramos que el espectro proviene de un marcador que realiza movimientos muy lentos, de manera tal que la medición de RPE, lo ve como “cuasi” estáticos, la función que lo describe es:

$$I(B, \Omega) = \int \int L(B, \Theta, \Phi) P(\Theta, \Phi) d\Theta d\Phi \quad [3.14]$$

Donde $P(\Theta, \Phi)$ es la función densidad de probabilidad que describe las posibles orientaciones de cada marcador en la muestra. La dependencia del espectro en el ángulo Ω (), se aclarará al tratar el tema de la orientación de las muestras con respecto al campo magnético.

Supongamos que tenemos el Marcador Estático en una única Dirección, con su eje z paralelo al eje **Z** de la muestra (Gráfico 3.4).

Puede observarse en el Gráfico 3.5, los espectros calculados para las orientaciones mostradas en el Gráfico 3.4. Notar que a medida que el ángulo Θ formado por el eje **Z** (de laboratorio) y el eje de la muestra **Z** (en este caso la normal al anillo del marcador, coincide con **Z** de la muestra) va aumentando, los picos se corren a valores de campo más bajos. Mientras que las distancias entre los picos correspondientes a $|l|=+1$ e $|l|=-1$ van disminuyendo (separación hiperfina), a medida que el ángulo aumenta.

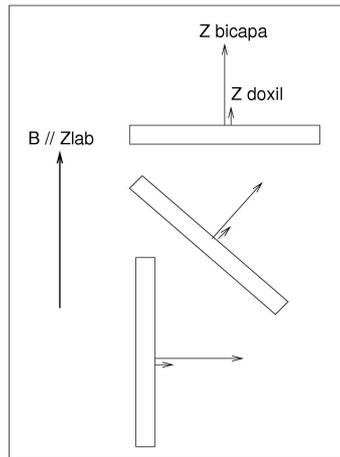


Gráfico 3.4: ejemplifica 3 orientaciones posibles de una muestra tipo “Langmuir-Blodgett”, a 0° , 45° y 90° respecto al campo magnético externo. A los fines del ejemplo se tomó la orientación del marcador paralela a la normal a la bicapa.

Esto puede interpretarse, si consideramos que los valores de g aumentan cuando el ángulo Θ aumenta de 0° a 90° (recordar que g_{Max} toma valores negativos). Por lo que el B_{res} disminuirá, desplazándose a valores más bajos de campo. En contraste, los términos de separación hiperfina (A),

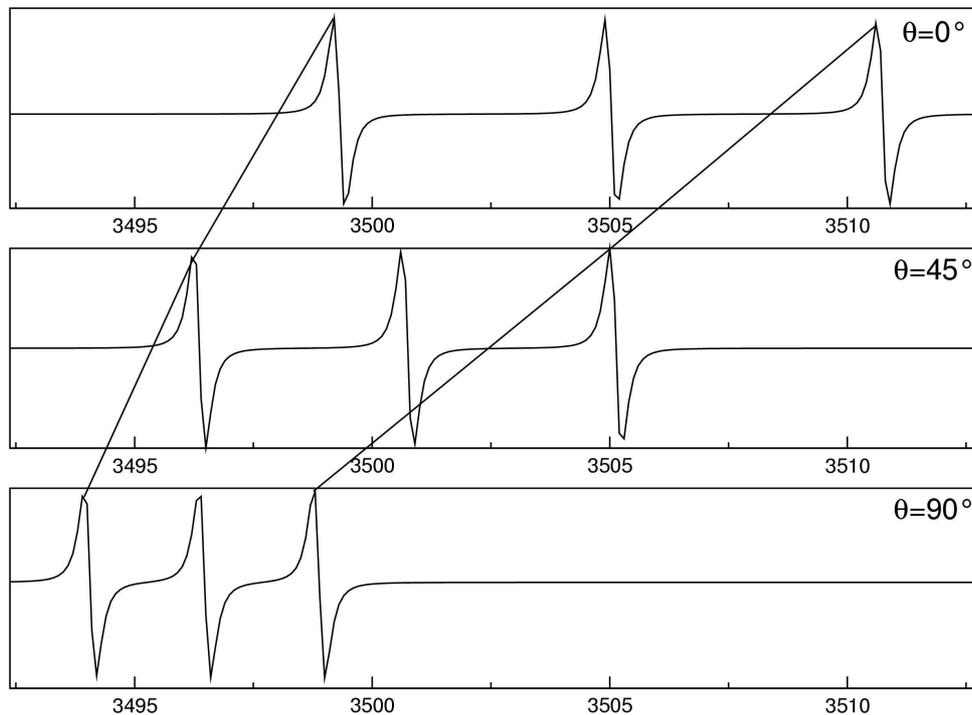


Gráfico 3.5: se muestran los espectros correspondientes a muestras estáticas orientadas a 0° , 45° y 90° respecto al campo magnético externo B . Notar que a medida que el ángulo Θ formado por el eje Z (de laboratorio) y el eje de la muestra Z (en este caso la normal al anillo del marcador, coincide con Z de la muestra) va aumentando, los picos se corren a valores de campo más bajos.

disminuyen, lo que hace que la separación entre los picos disminuya.

3.2. Población de vectores

En una muestra experimental de una bicapa lipídica, es raro tener todos los marcadores de espín orientados en la misma dirección, sino que presentarán una dada distribución de probabilidad (Gráfico 3.6). Notar que esta situación, donde ahora suponemos un conjunto de marcadores dentro de una muestra, es semejante a la planteada cuando definimos un único marcador que se movía lentamente y partir de la cual obtuvimos la forma del espectro con la ecuación 3.4. Dentro de esta distribución, se pueden describir **2 situaciones extremas**, que serán tratadas en este ítem. Que los marcadores se hallen estáticos (o con movimientos muy lentos) dentro de la muestra (bicapa), o bien, que se muevan muy rápidamente. Entre estas 2 situaciones se pueden reconocer varias situaciones intermedias, donde el marcador se mueve con diferentes velocidades entre estos dos extremos. Esta situación será tratada en ítem aparte (3.3 y 3.5).

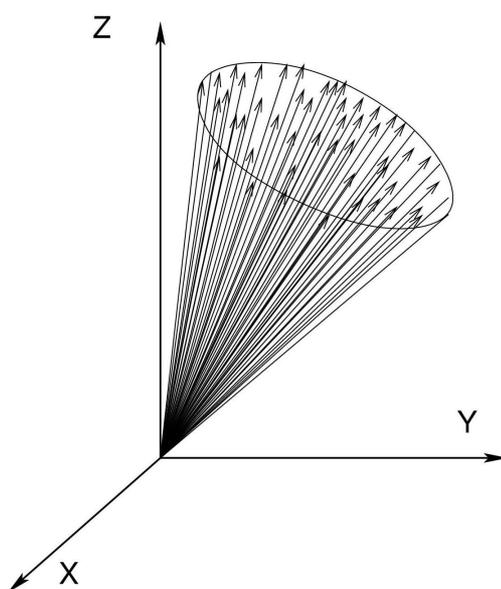


Gráfico 3.6: esquema de un conjunto de vectores magnetización con distintas orientaciones respecto al sistema de coordenadas de la muestra, en una distribución cónica.

- **Marcador estático (o con movimientos muy lentos) con una distribución de probabilidad dentro de la muestra (bicapa).** Consideremos que la distribución de probabilidad para el cálculo de los espectros pueda describirse como una uniforme, dentro un cono

(probabilidad nula fuera de dicho cono). Para estudiar este modelo se eligieron 2 conos de semiapertura de 30° y 60° () y se empleó la ecuación 3.4.

Los A, C y E corresponden a orientaciones de la muestra de 0° , 60° y 90° (eje del cono respecto al campo magnético externo, Z de laboratorio), donde los vectores magnetización se distribuyen en un cono de semiapertura 30° . Los B, D, F corresponden a las mismas orientaciones de muestra (0° , 60° y 90°) pero para vectores normales al anillo doxil dentro de un cono de semiapertura 60° .

Puede notarse en ambas distribuciones que, cuando la muestra está orientada en la dirección del campo magnético (0° , Gráfico 3.7 A y B), los espectros presentan el mayor valor de separación hiperfina, representado por $2 \cdot \Delta_{\text{máx}}$. Este parámetro se calcula desde el primer máximo al último mínimo del espectro. Esto se debe a que ambos conos de distribución al estar orientados en la dirección del campo magnético, presentan algunos de sus vectores magnetización orientados en la dirección, donde el tensor A tiene sus máximas componentes. También puede apreciarse que esta separación es similar en ambos conos de distribución.

Además se puede notar, que el espectro correspondiente al cono de 30° (Gráfico 3.7 A), muestra 3 picos muy semejantes, mientras que el espectro del cono de 60° , el pico correspondiente a $l=-1$ (derecha) está mucho más disperso, debido a la amplitud del cono. Este pico, en forma característica es el que mejor muestra la dispersión de la distribución de momentos magnéticos.

Gráfico 3.7:

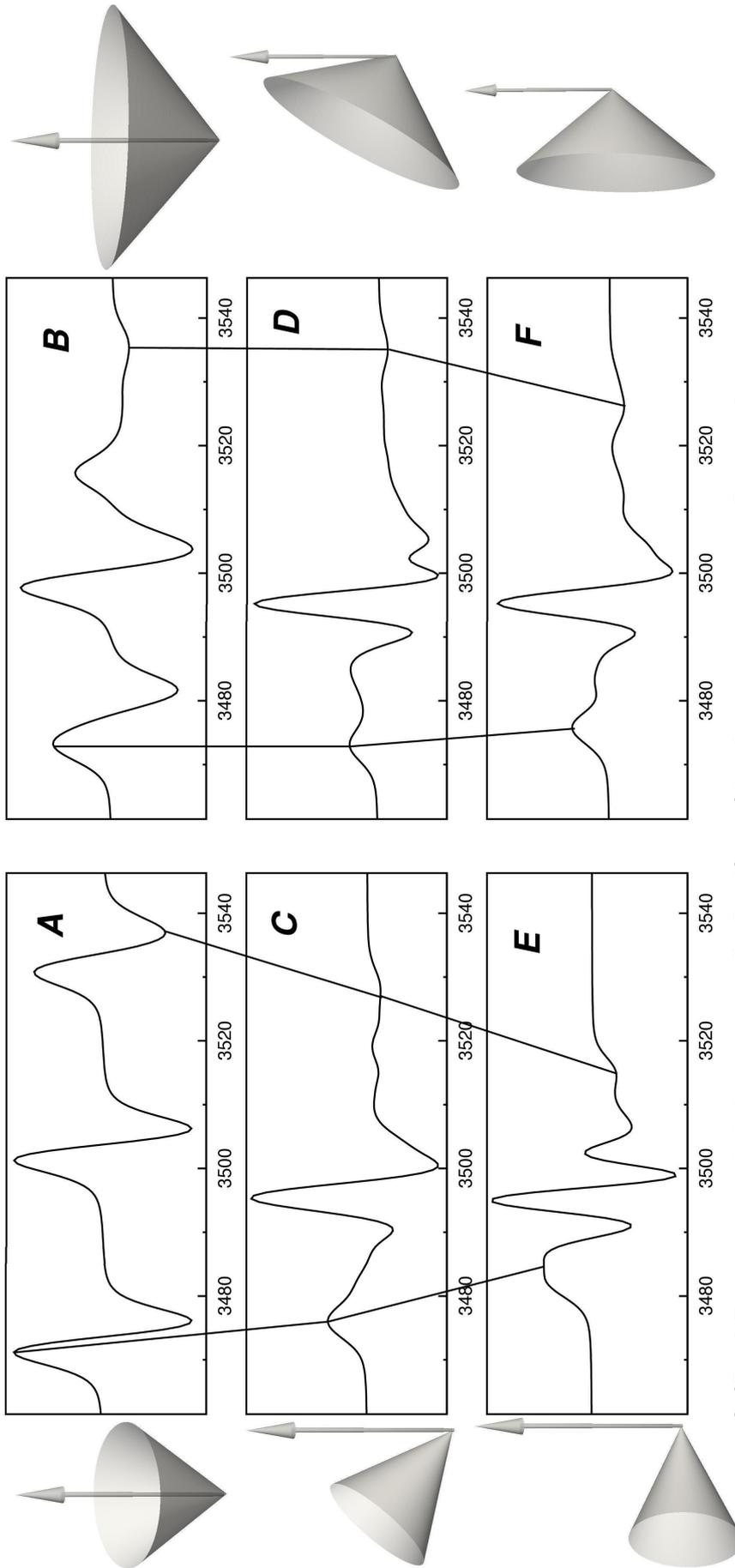


Gráfico 3.7: espectros calculados para una distribución estática de vectores, correspondientes a 2 conos de semiapertura 30° y 60° . Los espectros A, C y E corresponden a las orientaciones de 0° , 60° y 90° (eje del cono respecto al campo magnético externo, Z de laboratorio), para una distribución cónica de semiapertura 30° . A la izquierda de cada uno de ellos se muestra esquemáticamente el cono de distribución correspondiente a cada espectro. De igual manera los espectros B, D y F corresponden a conos orientados con su eje principal a 0° , 60° y 90° respecto al campo magnético externo.

Si miramos los espectros de RPE, obtenidos para una muestra orientada a 60° respecto al campo magnético (Gráfico 3.7 C y D), notaremos que los espectros toman una forma semejante a un “espectro de polvo”. Esta denominación es comúnmente empleada en RPE para describir espectros que resultan de la suma de todas las orientaciones posibles de marcador, pero donde el mismo se halla estático, como en un “polvo”. Estos espectros pueden explicarse si observamos los conos de distribución de 30° y 60°, orientados a 60° respecto al campo magnético externo; notaremos que las proyecciones z ($\cos(\theta)$) de los vectores momento magnético, alcanzan la mayor dispersión. Por lo que es de esperar una gran dispersión de los B_{res} para cada uno de ellos.

El espectro para el cono de 60° muestra un valor de $2 \cdot A_{max}$, prácticamente igual al obtenido para el mismo cono, con una orientación de la muestra de 0° respecto al campo magnético. Esto es comprensible si observamos el cono de distribución para la muestra orientada a 0°, notaremos que las proyecciones sobre el eje z alcanzan aproximadamente los mismos valores que para la muestra orientada 60°, por lo que es de esperar que los espectros muestren la misma separación máxima ($2 \cdot A_{max}$). En cambio, para el cono de 30° orientado a 60° respecto al campo magnético externo, puede apreciarse que ninguno de los vectores alcanzan la orientación paralela al campo magnético (dirección donde A es máximo), por lo que resulta comprensible la disminución de la separación hiperfina.

Idéntico razonamiento se puede realizar para los espectros de muestras orientadas a 90° respecto al campo magnético externo (Gráfico 3.7 E y F). Tanto para el cono de 30°, como para el de 60° se observa una clara disminución de la separación hiperfina. Esto se debe a que, ahora en ninguna de las 2 distribuciones existen vectores magnetización orientados en la dirección del campo magnético, por lo que se observa una disminución de la separación hiperfina, en relación a los espectros de las muestras orientadas a 0° y 60°.

Debemos decir antes de pasar al próximo ítem, *donde se analiza el movimiento rápido de una molécula anfifílica marcada*, cuales son los

movimientos que ya han sido descritos en la bibliografía para este tipo de moléculas. En general las membranas biológicas son consideradas fluidos ordenados, en los cuales las moléculas muestran una gran variedad de movimientos, pero a pesar de ello exhiben un orden considerable. Es esperable, que el marcador utilizado en esta tesis, reproduzca en mayor o menor medida los movimientos que se describirán a continuación, para lo cual se colocó un sistema de coordenadas, cuyo eje z es paralelo al eje z del marcador.

El movimiento de difusión lateral (ver Gráfico 3.8), se caracteriza por el desplazamiento de una molécula (lípidos, proteínas) a través de la superficie de la membrana. Este movimiento es aleatorio, es decir ocurre en todas las direcciones, pero no involucra un cambio de orientación de la molécula (en nuestro caso el marcador) respecto al campo magnético externo (Z).

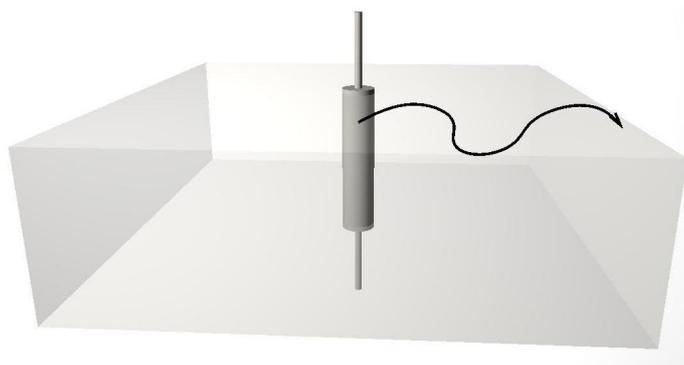


Gráfico 3.8: muestra esquemáticamente el movimiento de difusión lateral de una molécula anfifílica sobre la superficie de una membrana. Notar que no existe un cambio de orientación de la molécula (no se inclina, ni rota) respecto a un campo magnético externo paralelo a la normal a la bicapa.

Por lo que este movimiento, no produce cambios en el espectro de RPE y no se tiene en cuenta en el análisis siguiente.

El movimiento de rotación axial (Gráfico 3.9) se describe como un movimiento de rotación del marcador sobre su eje principal y es convenientemente descrita como la pérdida de correlación entre una orientación inicial ($t=0$) y otra a tiempo t . Este tipo de movimiento se debe tener en cuenta en el cálculo e interpretación de los espectros de RPE, debido que participará en el promediado de las componentes x, y de los tensores g y A. Se debe hacer notar que las componentes x, y del tensor g y A presentan valores semejantes, por lo que cambios en este movimiento,

no produce grandes cambios de las formas generales de los espectros.

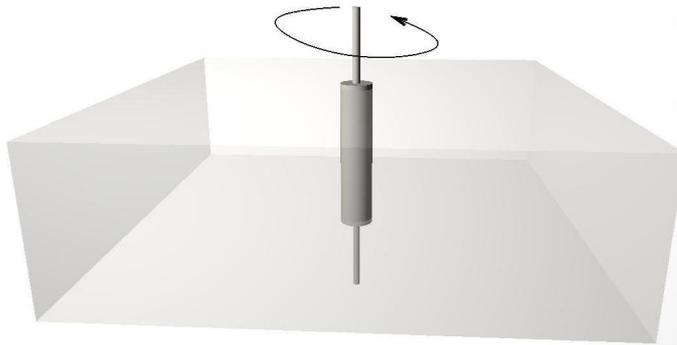


Gráfico 3.9: se muestra esquemáticamente el movimiento de rotación axial de una molécula en el seno de una bicapa lipídica.

El movimiento de tambaleo (wobbling) (Gráfico 3.10) se describe como un movimiento de tambaleo del marcador alrededor de un eje perpendicular al eje principal. Este movimiento se caracteriza con un tiempo de correlación característico, de igual modo que el movimiento anterior. En general este movimiento es más lento que el anterior. Por ejemplo, los τ_c de rotación axial y tambaleo, para DPPC gel (dipalmitoil fosfatidil colina) es $2.5 \cdot 10^{-8}$ y $5 \cdot 10^{-7}$ segundos respectivamente (son mucho más largos que para AE). Para analizar los valores promedio que toman los tensores g y A , con el movimiento de tambaleo, se empleó el modelo denominado “restricted random walk” (camino al azar, restringido) [Griffith y Jost, 1976]. El cual considera que el vector normal al anillo doxil se **mueve rápidamente y en forma aleatoria** (Gráfico 3.), dentro de un cono de semiapertura γ

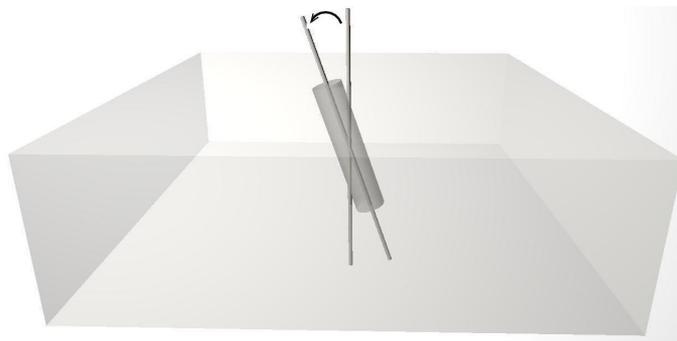


Gráfico 3.10: descripción del tipo de movimiento llamado de tambaleo o “wobbling”. Notar que en este movimiento el cambio de orientación de la molécula respecto a un campo magnético externo paralelo a la normal a la bicapa es marcado, por lo que podemos anticipar que este movimiento será importante y es tenido en cuenta en el cálculo de los espectros de RPE.

El movimiento de fluctuación del eje director de la molécula. Este eje

representa la orientación preferencial del eje largo del lípido. Este movimiento se puede describir como una onda que produce oscilaciones colectivas, de baja frecuencia de los ejes principales de las moléculas. Este movimiento no es tenido en cuenta en la interpretación de los espectros dado que su baja frecuencia, hace que el efecto reorientacional sea despreciable frente a los 2 anteriores.

Movimientos debido a las transiciones trans-gauche (Gráfico 3.11). Este tipo de movimiento es de alta frecuencia en fase fluida, 10^{10} a 10^9 Hz y produce cambios orientacionales importantes en las zonas donde ocurre. En fase gel se han reportado frecuencias mucho más bajas, por ejemplo para DMPC a 28°C por debajo del punto de fusión, es de 10^4 Hz. Este movimiento, si bien no es tratado en forma particular, está incluido dentro de la distribución de orientaciones del momento magnético, empleado para el cálculo de los espectros.

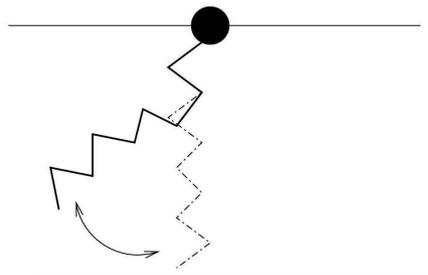


Gráfico 3.11: esquema de una molécula anfifílica que al sufrir una transición “trans” a “gauche” cambia la dirección de la cadena hidrocarbonada. Este movimiento no es contemplado en forma explícita en el cálculo de los espectros de RPE, pero es tenido en cuenta al utilizar la trayectoria de la DM para estimar la distribución de orientaciones del vector momento magnético.

Movimientos de flip-flop o de transbicapa (Gráfico 3.12): como su nombre lo indica este movimiento involucra el pasaje de un lípido u otro tipo de moléculas de una monocapa a la otra. En general son movimientos de baja frecuencia, que no son capturados por las DM, en los tiempos de simulación y no se tendrán en cuenta en el análisis de los espectros obtenidos.

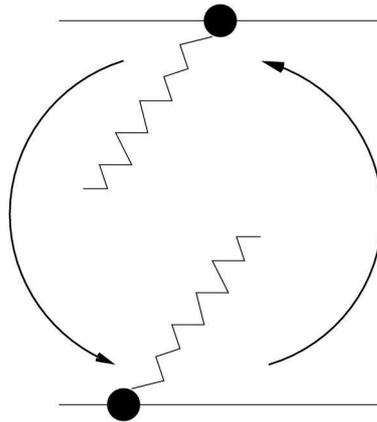


Gráfico 3.12: muestra en forma esquemática el pasaje de una molécula de una monocapa a otra en una membrana (flip-flop).

- **Marcador moviéndose rápidamente dentro de la bicapa (muestra) con una dada distribución de probabilidad.** Si el movimiento es suficientemente rápido el experimento de RPE verá el momento magnético electrónico y el campo producido por el espín nuclear, como si fueran iguales a sus promedios respectivos.

Si el marcador en su movimiento adopta todas las posibles orientaciones con igual probabilidad (desvío estándar de la distribución 180°), los valores de g y A serán independientes de θ (orientación del vector magnetización respecto al campo externo) y corresponderán a sus promedios isotrópicos (*esta situación nunca se alcanza para un marcador inserto en una bicapa lipídica y solo se incluye con carácter didáctico*):

En la expresión del B_{res} todos los términos dependientes de la orientación alcanzan su valor promedio ($3\cos^2\theta - 1 = 0$), por lo que el espectro quedará descrito por:

$$B_{res}(\theta) = \frac{\hbar \cdot \nu - m_i \cdot [\bar{A}_{isot}]}{[\bar{g}_{isot}] \cdot \beta_e} \quad m_i = -1, 0, +1 \quad [3.15]$$

En esta situación el espectro de RPE, censaría el promedio isotrópico (todas las orientaciones tienen igual probabilidad). En el Gráfico 3.14 se muestra el espectro de una muestra orientada a 0° respecto al campo magnético externo, con una distribución cónica de semiapertura 180° . Puede

apreciarse que se observan 3 picos equidistantes, lo cual es característico de un espectro tipo “solución”. Esta denominación es utilizada en RPE para describir los espectros correspondientes a un marcador de espín que puede moverse libremente y alcanzar todas las orientaciones posibles dentro de la misma, como lo hacen en una “solución” de baja viscosidad.

Como ya se anticipó, esta situación es poco esperable que ocurra para un marcador inmerso dentro de una bicapa. Es más probable, que solo pueda realizar movimientos dentro de una distribución más acotada.

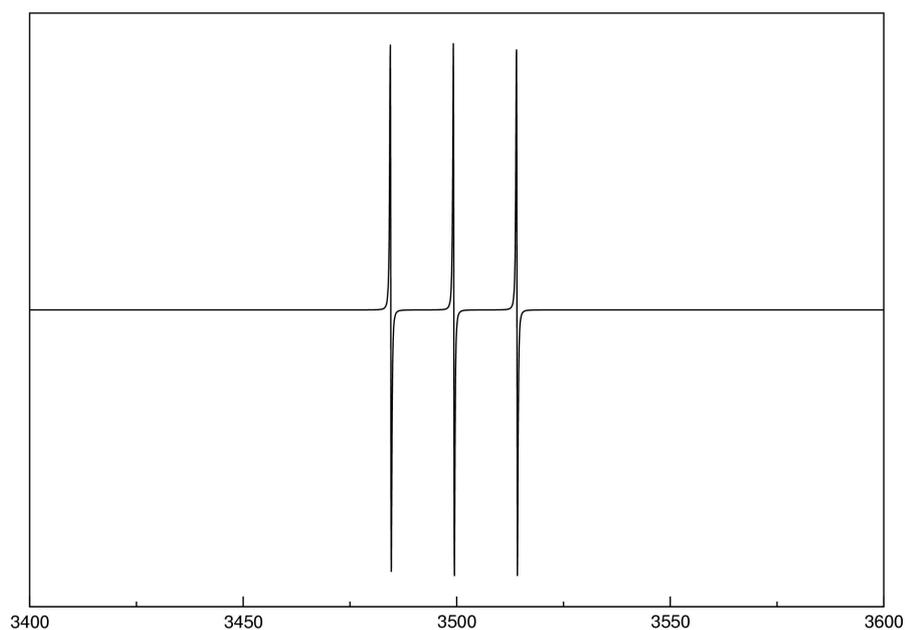


Gráfico 3.14: espectro de RPE calculado para una distribución cónica de vectores de semiamplitud 180°, considerando que los mismos se mueven rápidamente. Notar que presenta 3 picos equidistantes, lo cual es característico de un espectro tipo solución de muy baja viscosidad, donde el marcador puede moverse libremente y alcanzar todas las orientaciones posibles dentro de la misma.

Si describimos el movimiento del marcador con el modelo “restricted random walk” (camino al azar, restringido) [Griffith y Jost, 1976], para movimientos suficientemente rápidos, el valor medio de las posiciones de las líneas puede escribirse en términos de valores promediados g_w y A_w cuyas expresiones resultan:

$$A_{\parallel w} = A_{\perp} + (A_{\parallel} - A_{\perp}) \cdot W \quad g_{\parallel w} = g_{\perp} + (g_{\parallel} - g_{\perp}) \cdot W \quad [3.16]$$

$$A_{\perp w} = A_{\perp} + \frac{(A_{\parallel} - A_{\perp}) \cdot (1 - W)}{2} \quad \text{y} \quad g_{\perp w} = g_{\perp} + \frac{(g_{\parallel} - g_{\perp}) \cdot (1 - W)}{2} \quad [3.17]$$

donde

$$W \equiv \frac{(1 + \cos(\gamma) + \cos^2(\gamma))}{3} \quad [3.18]$$

Gamma (γ) representa la semiamplitud del cono de distribución. Gráfico 3.15 Puede observarse, que si γ tiende a 0 (dispersión nula o bien un único vector), la función W tiende a 1, y los valores promedio tienden a los valores cristalinos. Si γ tiende a $\pi/2$, entonces W tiende 1/3, los valores promedio corresponde al promedio isotrópico de los tensores g y A.

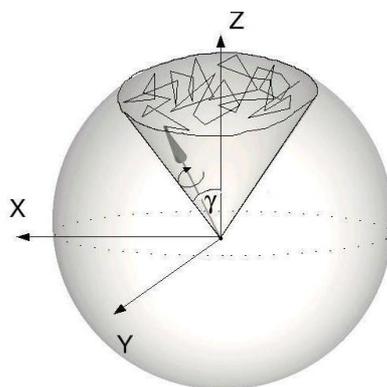


Gráfico 3.15: representación diagramática de el modelo de "tambaleo" o "wobbling" (Camino al azar restringido). Notar que el vector magnetización presenta un camino errático (al azar), y que puede rotar libremente. El camino al azar queda confinado dentro de los límites del cono dibujado, de semiamplitud γ .

En el , se muestran los espectros de RPE calculados para dos distribuciones uniformes del momento magnético. Estas distribuciones se limitaron dentro de 2 conos de 30° y 60° de semiamplitud, ambos con su eje principal paralelo al campo magnético B (0°).

	Bicapa Orientada 0°
cono 30°	A
cono 60°	B

Puede observarse en el Gráfico 3.16 A y B, que ambos espectros presentan 3 picos equiespaciados, mostrando el espectro A una mayor

separación de línea hiperfina que el espectro B, contrariamente a lo que uno podría suponer en base a la amplitud de cada distribución ($A < B$). Esto se puede comprender si observamos la evolución de los tensores g y A versus el ángulo promedio de la distribución (Gráfico 3.17), para el modelo de movimiento de tambaleo empleado. Notar que para la orientación de la bicapa de 0° , la separación hiperfina (A) del cono de distribución de 30° es mayor que la del cono de 60° y que esta situación se invierte por encima de 70° .

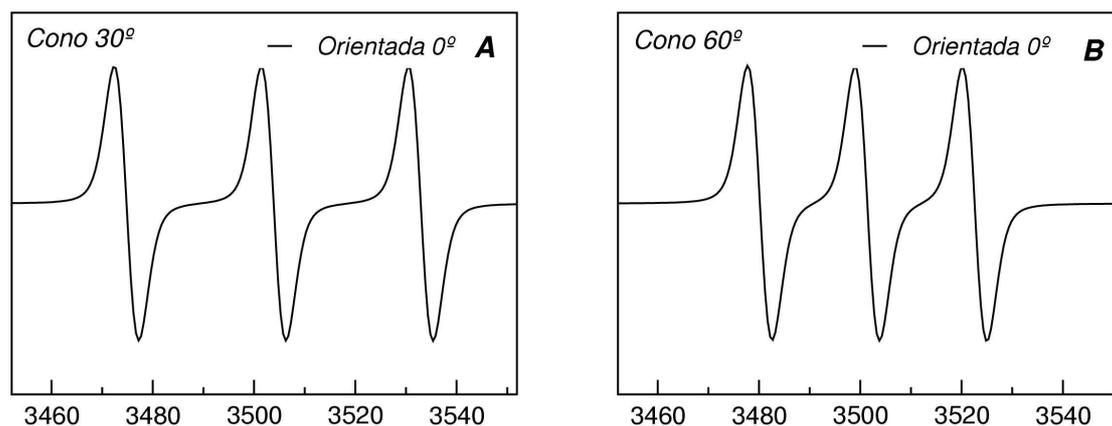


Gráfico 3.16: se muestran 2 espectros de RPE, calculados para 2 distribuciones del momento magnético en la muestra (30° y 60°), calculados para el límite de **movimientos rápidos**. Los espectros A y B corresponden a una muestra orientada a 0° respecto al campo magnético externo.

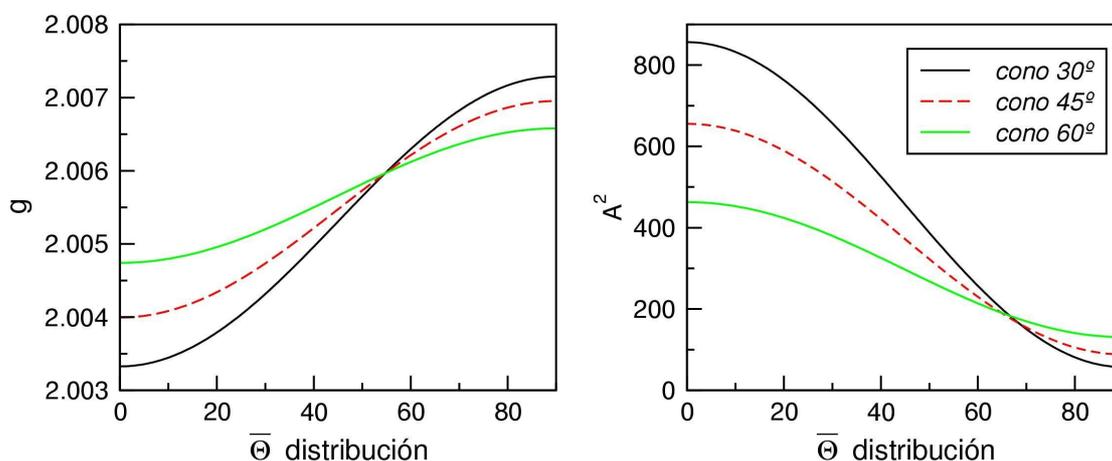


Gráfico 3.17: evolución de los valores de los tensores g y A^2 cuando varía el ángulo promedio de la distribución (valor al que tienden en la promediación por movimientos rápidos). Puede observarse que para la orientación de la bicapa de 0° , la separación hiperfina (A) del cono de distribución de 30° es mayor que la del cono de 60° y que esta situación se invierte por encima de 70° .

3.3. ¿ Movimientos rápidos o movimientos lentos ?

Es necesario precisar a qué se refiere uno con movimientos **rápidos o lentos**. Cabe aclarar que la siguiente exposición es de carácter conceptual y aproximado. Un tratamiento formal y estricto se desarrolla en la referencia [Pake, 1962][Griffith y Jost, 1976].

El Hamiltoniano que permite calcular las energías de los estados electrónicos entre los cuales ocurren las transiciones, es dependiente del tiempo. Tal dependencia temporal se debe a que al cambiar la orientación espacial del grupo molecular con el electrón desapareado cambia el ángulo Θ .

Llamaremos τ_C al tiempo característico en que se produce una reorientación del orbital magnético (más adelante definiremos con precisión esta magnitud). Debido a que el operador energía (Hamiltoniano) está cambiando en tiempos del orden de τ_C , los N niveles de energía que se calculen del mismo poseen indeterminación (en el sentido de variables cuánticas cuyo valor no está bien definido) que llamaremos δ_E . Esta indeterminación en la energía puede estimarse usando el principio de incerteza correspondiente como $\delta_E = \hbar / \tau_C$. Esta indeterminación en la energía de cada nivel electrónico se traduce en que los cambios de energía asociados a transiciones hereden tal indeterminación.

Consideremos una determinada orientación del orbital magnético Θ_{Max} . Para esta orientación el salto de energía entre 2 estados correspondientes a un dado M_I lo llamaremos $\Delta E(M_I, \Theta_{Max})$. Este salto de energía tendrá también una indeterminación del orden δ_E . Si el orbital magnético en cambio poseyera una orientación Θ_{Min} , el salto de energía entre los mismos estados sería $\Delta E(M_I, \Theta_{Min})$, y tendría una indeterminación en su magnitud del orden de δ_E .

Para que estos saltos de energía recién mencionados sean distinguibles por una espectroscopía, la indeterminación en sus magnitudes

debiera ser menor que la diferencia entre los mismos. Esto es,

$$\delta_E = \hbar/\tau_C < [\Delta E(M_I, \Theta_{Max}) - \Delta E(M_I, \Theta_{Min})]$$

que puede escribirse como:

$$\tau_C > \hbar/[\Delta E(M_I, \Theta_{Max}) - \Delta E(M_I, \Theta_{Min})] \quad [3.19]$$

Sean Θ_{Max} y Θ_{Min} aquellos valores de la distribución de orientaciones que hacen máximo el corchete del miembro derecho de la ecuación anterior. Estos corresponden a los límites de la banda de absorción para un dado M_I . De esta manera la Ecuación 3.3 establece la condición para que los estados de los extremos de la banda de absorción sean resolubles por la espectroscopía como diferentes.

Conviene entonces definir un tiempo característico τ_{RPE}

$$\tau_{RPE} = \hbar/[\Delta E(M_I, \Theta_{Max}) - \Delta E(M_I, \Theta_{Min})] \quad [3.20]$$

Que será el tiempo de referencia necesario para que la espectroscopía pueda resolver los extremos de las bandas como diferentes.

Para $\tau_C \gg \tau_{RPE}$ (movimientos lentos del orbital magnético) la espectroscopía resuelve como distintas diferencias de energía aún menores a los anchos de la banda de absorción.

En el extremo opuesto $\tau_C \ll \tau_{RPE}$ (movimientos rápidos) la espectroscopía no puede resolver como distintos los saltos de energía de los extremos de las bandas de absorción. Se puede demostrar que en este caso el ancho de la banda de absorción colapsa a su valor promedio. Esto es lo que la espectroscopía “ve”, el valor promediado en orientaciones del Hamiltoniano.

Para situaciones intermedias entre ambos extremos ($\tau_C \simeq \tau_{RPE}$) se va produciendo un progresivo colapso del ancho a medida que τ_C disminuye.

Por otra parte la variable θ , que define la orientación del marcador respecto al campo magnético, es una variable que cambia aleatoriamente en el tiempo. Por lo que en el próximo ítem se analizará el problema de las funciones que varían en el tiempo en forma aleatoria, las cuales serán de utilidad para comprender situaciones intermedias a las dos anteriormente mostradas.

Funciones Aleatorias y de Correlación

Supongamos que la función $3\cos^2\theta - 1$, donde θ es el ángulo entre una posición fija en el espacio (por ej. el eje Z) y un eje dentro de una molécula (en nuestro caso el eje que contiene el normal al anillo doxil) que se mueve aleatoriamente. Si suponemos que al cabo de un tiempo suficientemente largo, el eje habrá apuntado con igual probabilidad a todos los elementos de superficie de un sector cónico de distribución, incluido en una esfera de radio unitario, entonces el valor medio será:

$$\overline{(3\cos^2\theta - 1)} = \frac{\int_0^\pi P(\theta)(3\cos^2\theta - 1)2\pi \sin\theta d\theta}{\int_0^\pi 2\pi \sin\theta d\theta} \quad [3.21]$$

La pregunta que surge es ¿cuánto tiempo debemos esperar para que el marcador alcance todas las orientaciones, o al menos suficientes de ellas para que el promedio tienda al valor promedio de la distribución?

Para analizar cuantitativamente este proceso, definimos la función de correlación de una función aleatoria $f(\theta(t))$, donde f es función del ángulo θ , el cual varía aleatoriamente con el tiempo t :

$$F_c(t_1, t_2) = \overline{f(\theta(t_1)) \cdot f^*(\theta(t_2))} \quad [3.22]$$

El asterisco indica complejo conjugado, ya que en general la función analizada podría ser compleja, y la barra indica el promedio sobre el ensamble, es decir suponemos existen muchas copias idénticas de nuestro sistema (no es nuestro caso) y realizamos el promedio del producto para 2 instantes diferentes t_1, t_2 sobre toda la evolución temporal del marcador.

Si suponemos que el sistema se halla en equilibrio, la función F_c no dependerá del tiempo inicial elegido, sino de $\tau = t_1 - t_2$ y la ecuación anterior podemos escribirla:

$$F_c(\tau) = \overline{f(\Theta(t)) \cdot f^*(\Theta(t+\tau))} \quad [3.23]$$

Tau (τ) es un intervalo de tiempo en el cual es evaluada la función F_c . Esta función como puede observarse en la expresión, guarda información de la función $f(\Theta)$ para cada intervalo τ . El promedio anterior se realiza sobre los distintos tiempos t de la evolución temporal de la función aleatoria.

La función F_c puede tener una envolvente de forma exponencial, algunas veces gaussiana, pero en la mayoría de los casos presenta oscilaciones. En cualquier caso dependerá del modelo usado. Por lo general la función de correlación suele aproximarse:

$$F_c(\tau) = A \cdot e^{(-\tau/\tau_{RPE})} \quad [3.24]$$

Generalmente se asume que $F_c(0)=1$, es decir la correlación a tiempo inicial es total (normalización). $F_c(\tau \rightarrow \infty)=0$, es decir a tiempos suficientemente largos se pierde toda correlación.

Es a partir de estos conceptos, $F_c(\tau)$ y τ_c que surgió la modificación del trabajo de Steinhoff [Steinhoff y Hubbell, 1996], para incluir en el cálculo de los espectros de RPE situaciones intermedias entre “polvo” y “solución”. La idea consiste en que si conocemos la función de correlación F_c , del cambio orientacional del marcador de espín respecto al campo magnético (la cual varía entre 0 y 1), y la evaluamos al tiempo característico τ_{RPE} , el valor obtenido nos indicará cuanto promediado, verá el experimento de RPE. Por lo que si afectamos las funciones dependientes de la orientación por este factor, se estará incluyendo en las mismas un promediado temporal. En las expresiones simplificadas resulta:

$$B_{res}(\Theta) = \frac{h \cdot \nu + m_i \cdot [\bar{A}_{isot} + F_C(\tau_{RPE}) \cdot A_{Max}(3 \cos^2 \Theta - 1)]}{[\bar{g}_{isot} + F_C(\tau_{RPE}) \cdot g_{Max}(3 \cos^2 \Theta - 1)] \cdot \beta_e} \quad m_i = -1, 0, +1 \quad [3.25]$$

Si la función F_C evaluada en τ_{RPE} ($F_C(\tau_{RPE})$) tiende a 0, los tensores tienden a su valor promedio; y si $F_C(\tau_{RPE})$ tiende a 1, los tensores tomarán la forma, antes analizada para un conjunto de vectores estáticos o de movimientos lentos.

No hay dudas a partir de las expresiones antes vistas, que el espectro de RPE se halla vinculado directamente, con las orientaciones alcanzadas por el marcador dentro de una muestra. Estas orientaciones definen un orden a nivel molecular, el cual es usualmente interpretado a partir de un concepto que será tratado en el ítem siguiente, el parámetro de orden (S).

Movilidad y PO

El concepto de PO o “Parámetro de Orden Aparente” se suele utilizar para caracterizar el “orden molecular” y se basa en una matriz de orden, de 3x3 [Griffith y Jost, 1976]. Los elementos de la matriz están dados por:

$$S_{ij} = \frac{1}{2} \cdot \langle 3I_{Ni}I_{Nj} - \delta_{ij} \rangle \quad [3.26]$$

Donde N representa un eje de referencia fijo en **la muestra** (en nuestro caso el eje Z), e i, j = x, y, z define el sistema de eje rectangulares fijos en **la molécula**. Cuando se diagonaliza esta matriz, quedan solo 2 elementos linealmente independientes. Para nuestro caso particular, donde el marcador doxil, es axialmente simétrico, se reduce a solo un elemento de matriz independiente, denominado S_{zz} o simplemente S:

$$S = \frac{1}{2} \cdot (3 \langle I_{NZ} \rangle - 1) \rightarrow S = \frac{1}{2} \cdot (3 \langle \cos^2 \Theta \rangle - 1) \quad [3.27]$$

Este parámetro es usualmente estimado a partir de los espectros como:

$$S = \frac{(\bar{A}_{\parallel} - \bar{A}_{\perp})}{(A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy}))} \quad [3.28]$$

Los valores de \bar{A}_{\parallel} y \bar{A}_{\perp} se estiman a partir de los parámetros $2A_{Max}$ y $2A_{Min}$, obtenidos de los espectros como se muestra en el C. Existen varios métodos para estimar S, empleando como base la ecuación de arriba. De estudios realizados con modelos ([Griffith y Jost, 1976]) puede decirse que $2A_{Max}$ (máxima separación de líneas) es una buena estimación de $2\bar{A}_{\parallel}$, pero $2A_{Min}$ (mínima separación de líneas) es próximo a $2\bar{A}_{\perp}$, pero no igual. De los mismos estudios surge que a medida que S se aproxima a 1, la estimación del $2A_{Min}$ se torna más difícil.

Analicemos primero la siguiente situación:

$$\text{si } \bar{A}_{\parallel} = A_{zz} \quad \text{y} \quad \bar{A}_{\perp} = \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy}) \quad \text{Entonces } S=1$$

Esto implica que el sistema presenta el máximo $2A_{Max}$ y el mínimo $2A_{Min}$. Esto puede darse en un sistema cristalino, con el eje z del marcador, de la muestra y del laboratorio coincidentes, observándose (3 picos uniformes) o bien en un sistema tipo “polvo”, donde existen todas las orientaciones posibles del marcador respecto al Z de laboratorio; pero en cualquier caso el marcador debe hallarse estático. De no hallarse estático, existiría algún grado de promediado que haría que la contribución del término orientacional $3\cos^2\theta - 1$ no sea máximo (ver ec. 3.1). Notar que si realizáramos un espectro de un cristal, donde el eje z del marcador se hallara ***inclinado*** respecto a eje z de la muestra, y este último paralelo al eje z de laboratorio, obtendríamos un S_{zz} menor a 1, a pesar de que el orden de la muestra es muy alto. Esto se debe a que la máxima separación de línea depende del término $3\cos^2\theta - 1$, por lo que si θ es distinto de 0° la función $3\cos^2\theta - 1$ se alejará de su valor máximo.

Analicemos en segundo lugar:

$$si \bar{A}_{\parallel} = \bar{A}_{\perp} = A_{isot} = \frac{(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})}{3} \rightarrow S=0$$

Esto indica que el sistema presenta valores coincidentes entre $2A_{Max}$ y $2A_{Min}$. Esto puede ocurrir, en un marcador en solución, girando rápidamente en todas las direcciones, con lo que se obtiene un espectro promediado. Si el marcador se está moviendo rápidamente, el valor de $F_C(\tau_{RPE})$ tenderá a 0, haciendo que los tensores g y A tiendan a sus valores isotrópicos (ec. 3.1).

Resulta de los 2 párrafos anteriores que el S calculado del espectro nos sirve para estimar el valor promedio al que tiende el término que contiene a $3 \cos^2 \theta - 1$.

Parámetros de Orden de la DM

La DM ofrece la posibilidad de calcular este parámetro de orden, directamente de la simulación, calculando el tensor S promedio, sobre todas las orientaciones alcanzadas por el marcador. Dado que este, se mueve en forma restringida dentro de la muestra (bicapa, Gráfico 3.18), el tensor calculado presenta la influencia de la inclinación respecto al campo magnético (eje de referencia). Por lo que si diagonalizamos el mismo obtendremos un PO independiente de la orientación del campo y por lo tanto una mejor medida del “orden del sistema”.

El PO calculado de la trayectoria no contiene el efecto del promediado temporal, $F_C(\tau_{RPE})$ por lo que podríamos considerarlo un PO estático y que en la bibliografía se lo cita como un PO espacial. Es por esto, que no necesariamente deben coincidir los S obtenidos de los espectros, con el PO calculado de las DM. El S obtenido de los espectros, podría describirse [Griffith y Jost, 1976], como la combinación de 2 tipos de S. Uno que contiene la información de orden espacial ($S_{espacial}$) y el otro que contiene la información de movimiento ($S_{movimiento}$), y que se hallan íntimamente relacionados al valor de la función $F_C(\tau_{RPE})$ antes descrita:

$$S_{espectro} = S_{movimiento} \times S_{espacial}$$

A partir de esta expresión es esperable que los valores obtenidos de las simulaciones sean mayores que los obtenidos de los espectros.

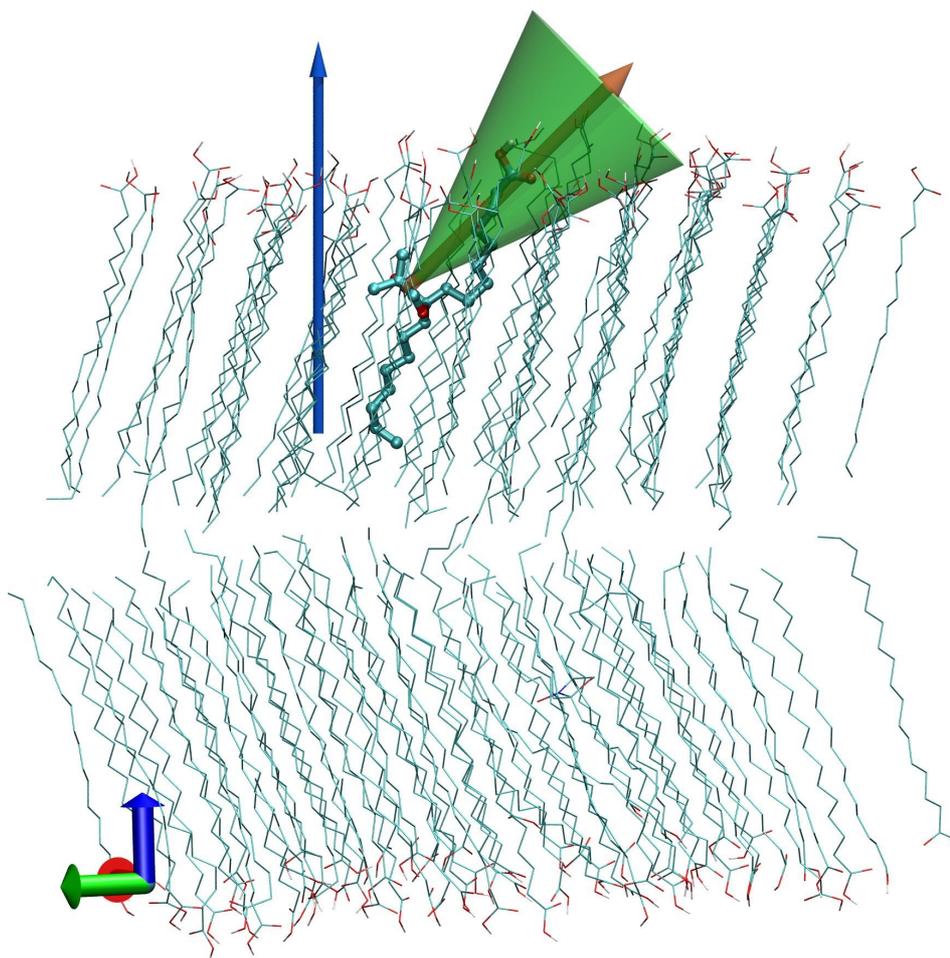


Gráfico 3.18: muestra sobre una imagen “instantánea” de la trayectoria de la simulación AE/AE*, un probable cono de distribución de la normal al anillo doxil (el cual se halla vinculado al momento magnético del marcador). Notar la inclinación global de los AE del sistema, al igual que el marcador. La flecha en verde representa la normal a la bicapa, la cual se asume como paralela al campo magnético externo.

3.4. Orientación de las muestras

Es importante destacar a esta altura del desarrollo algunas cuestiones relacionadas con la parte experimental de las mediciones en RPE.

Las muestras empleadas para la realización de los espectros pueden presentarse de **2 formas generales** (Gráfico 3.19):

Muestras Orientadas respecto al campo magnético externo (Gráfico 3.19.A). Es el caso de las monocapas o multicapas Langmuir-Blodgett, en las cuales se puede conocer y variar el ángulo formado entre la muestra y el

campo magnético externo.

Muestras NO orientadas respecto al campo magnético externo (Gráfico 3.19.B). En este tipo de muestra existe una distribución de posibles orientaciones para el vector normal a la bicapa (eje **Z** de la muestra) respecto del campo magnético externo (**Z** de laboratorio). En particular, en esta tesis, cuando se hace referencia a este tipo de muestras se considera solo el caso

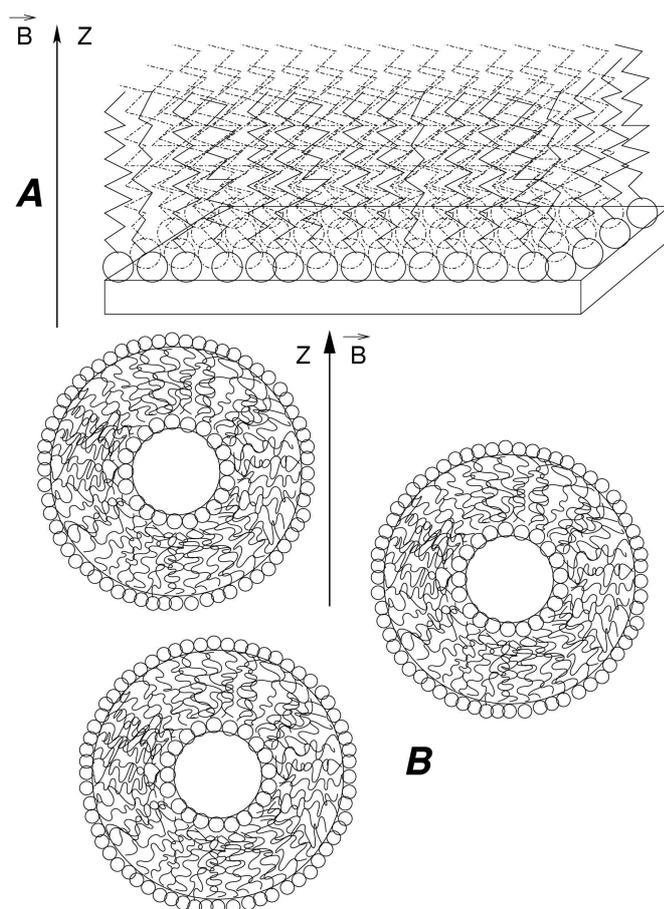


Gráfico 3.19: muestra las dos posibles orientaciones de la normal a la bicapa respecto al campo magnético externo. El gráfico 3.4-A esquematiza el caso típico de una muestra tipo “Langmuir-Blodgett”, donde es posible definir una dada orientación de la muestra respecto al campo magnético. El gráfico 3.4-B presenta el ejemplo de una muestra miscelar, donde las bicapas existen en todas las orientaciones posibles respecto al campo magnético.

de distribuciones isotrópicas del vector normal a las bicapas.

Para calcular este tipo de muestras NO-orientadas (-B) es necesario incorporar en el cálculo, la integral sobre todo ángulo Ω (ángulo entre la normal a la muestra, **Z** y el campo magnético **Z**):

$$\bar{I} = \frac{1}{4 \cdot \pi} \int_0^\pi I(B) [2 \cdot \pi \cdot \sin \Omega \cdot d\Omega] \quad [3.29]$$

Ω : ángulo entre \vec{H} y \perp bicapa

La integral de la ecuación 3.2 representa la suma de los espectros obtenidos para las distribuciones cónicas antes descritas, pero para todas las posibles orientaciones de la muestra.

Si ahora consideramos un Marcador Estático en una única Dirección, pero una muestra tipo **NO orientada** (Gráfico 3.20-A), debemos incorporar en el cálculo, la integral (ecuación 3.2) sobre todo ángulo Ω . Es importante destacar, que el mismo resultado se obtendría si la muestra estuviera Orientada respecto al campo externo, pero los marcadores dentro de la bicapa presentarían diferentes orientaciones respecto a la normal a la bicapa (diferentes Ω), o bien si un único marcador se estuvieran moviendo lentamente dentro de la muestra. Al decir movimientos lentos, se hace referencia a la movilidad del marcador, en relación a un tiempo característico del experimentos de RPE, del cual se hablará más adelante.

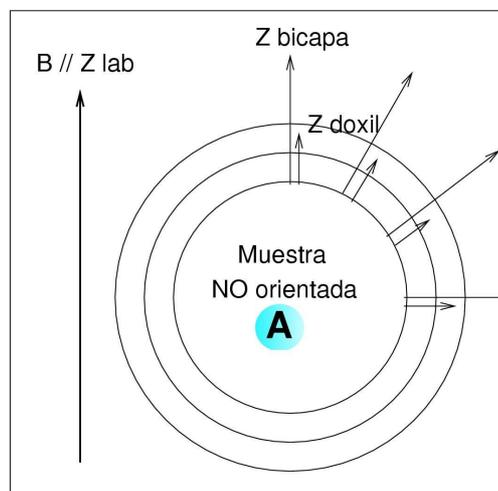


Gráfico 3.20: esquematiza a una muestra NO orientada (miscelar), donde puede observarse que el marcador puede alcanzar todas las orientaciones dentro de ella.

El Gráfico 3.21 muestra los espectros obtenidos para 2 distribuciones uniformes de vectores estáticos (límite de movimientos lentos) dentro de conos de 30° y 60° , para una muestra NO orientada. Puede apreciarse que los espectros de ambas distribuciones son similares al de un espectro de “polvo”, debido a que al integrar estamos teniendo en cuenta todas las orientaciones posibles dentro de una esfera, independientemente de

la distribución empleada.

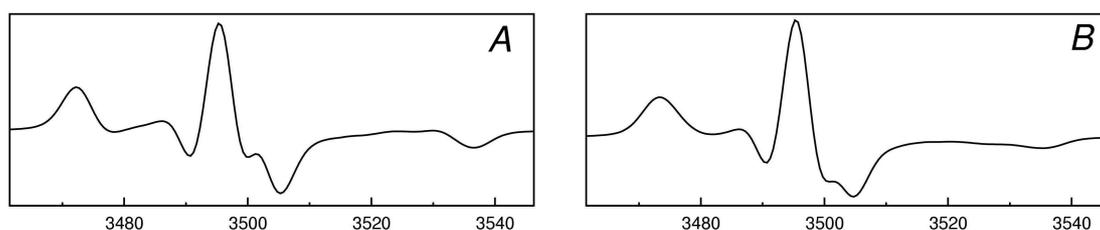


Gráfico 3.21: espectros calculados para una distribución estática de vectores, correspondientes a 2 conos de semiapertura 30° y 60° (A y B respectivamente), en una muestra NO orientada.

En el Gráfico 3.22 se muestran los espectros obtenidos para las 2 distribuciones anteriores, donde el marcador se mueve rápidamente. Estos espectros son marcadamente diferentes entre sí y difíciles de prever sin hacer los cálculos correspondientes. Si se puede decir que a medida que la amplitud de la distribución disminuye (tendiendo a representar un único vector) el espectro se parece a un espectro de “polvo”. Esto es razonable, ya que sería equivalente a tener un único vector sumado sobre todas las orientaciones posibles, en una esfera.

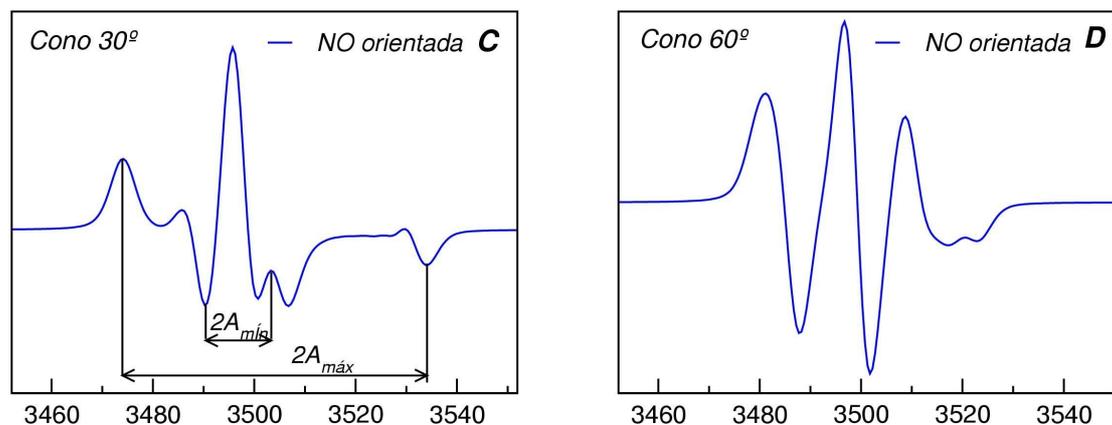


Gráfico 3.22: los espectros C y D corresponden a muestras NO orientadas, calculadas para 2 distribuciones cónicas de 30° y 60° , respectivamente (vectores en el límite de movimientos rápidos).

3.5. Resultados del Modelo para Movimientos Intermedios

En esta sección analizaremos los cambios que surgen en el espectro cuando la movilidad del marcador hace que no caiga dentro de los extremos de movimientos muy rápidos o muy lentos, analizados en secciones

anteriores. Se calcularon espectros de RPE para distribuciones uniformes de vectores magnetización dentro de conos de distinta semiapertura (30° , 60°), en muestras NO orientadas, y se probaron distintos tiempos de correlación que simularan distinto grado de movilidad.

3.5.1. Resultados cono de 60°

Es conveniente aquí, recordar que un cálculo con un $F_C(\tau_{RPE})=0.0$, hará que los parámetros A, y g tiendan a sus valores promedio, pero dentro del cono de distribución y no al promedio isotrópico. Y un $F_C(\tau_{RPE})=1.0$, hará que los parámetros alcancen los valores extremos de A y g, dentro del cono.

En el Gráfico 3.23 se muestran espectros de RPE obtenidos para 2 distribuciones cónicas uniformes de 30° y 60° de semiapertura, **para una bicapa NO orientada**. Se emplearon funciones $F_C(\tau)$ tales que al ser evaluadas en τ_{RPE} permitieran obtener los siguientes valores deseados de $F_C(\tau_{RPE})$ (ecuación. 3.1):

Tabla 3.1: muestran los distintos valores de $F_C(\tau_{RPE})$ utilizados en el cálculo de los espectros, para cada cono de distribución.

	Cono 30°	Cono 60°
$F_C(\tau_{RPE})=0.00$	I	II
$F_C(\tau_{RPE})=0.46$	III	
$F_C(\tau_{RPE})=0.62$		IV
$F_C(\tau_{RPE})=1.00$	V	VI

En el cálculo se emplearon los valores de $F_C(\tau_{RPE})$ mostrados en la Tabla 3.1. En línea negra se muestran los espectros suma (de las tres proyecciones de espín nuclear, $I=-1$, $I=0$, $I=+1$, en verde el espectro correspondiente a la proyección de espín $I=0$ y en rojo $I=-1$).

Si observamos el Gráfico 3.23 II, $F_C(\tau_{RPE})=0.0$ notaremos que

es un espectro tipo “solución”, muy promediado, al cual le corresponde un Parámetro de Orden Aparente (Sapp) de 0.38. Es razonable pensar que si tenemos un cono de distribución muy amplio (semiamplitud 60°), moviéndose muy rápidamente el espectro se va asemejar al de un marcador moviéndose libremente en “solución”. Si lo comparamos con el espectro 3. Gráfico 3.23 VI , $F_C(\tau_{RPE})=1.0$ notaremos que este último es del tipo espectro de “polvo”, con Sapp de 0.95. Esto último se puede explicar si pensamos que con una función $F_C(\tau_{RPE})=1.0$ estamos sumando todas y cada uno de los vectores, por lo que es razonable obtener un espectro tipo “polvo”. Además y como era esperable el espectro para un $F_C(\tau_{RPE})=0.62$, da un espectro de características intermedias entre los 2 anteriores, con un Sapp de 0.65.

En el Gráfico 3.23, se muestra además la contribución de los picos $l=0$ e $l=-1$ al espectro total. Es conveniente recalcar aquí, que el espectro de RPE representa la derivada del espectro de absorción, por lo que el valle A y el pico B del pico $l=-1$ representan, el primero y último punto de inflexión respectivamente, en el espectro de absorción total. Por lo que su distancia representa una medida del ancho del pico. Puede observarse el corrimiento hacia campos menores del pico B y hacia campos mayores del valle A, con lo que el ancho del pico va aumentando a medida que el $F_C(\tau_{RPE})$ tiende a 1 (menos promediado).

También puede observarse que el valle A se corresponde perfectamente con el valle del espectro total, lo cual resulta razonable, dado que la máxima separación de línea estará dada por este pico. Puede apreciarse además, que el pico B presenta la máxima correspondencia con el pico X del espectro total (altura y posición), para un $F_C(\tau_{RPE})=0.0$. Lo cual indica que el pico X, del espectro total, representa en forma mayoritaria al pico B del espectro del pico $l=-1$, y que por lo tanto casi no existe solapamiento entre los picos $l=0$ e $l=-1$. Notar la muy buena correspondencia de la “posición” del pico B con el pico X del espectro total, a pesar del aumento del solapamiento de los picos.

3.5.2. Resultados cono de 30°

Si observamos el Gráfico 3.23-I ($F_C(\tau_{RPE})=0.0$), notaremos que el espectro, nos dá un espectro tipo “polvo”, a diferencia del cono de 60° (tipo “solución”). Esto resulta razonable si tenemos en cuenta que, si bien este espectro corresponde a la situación de máxima promediación, al ser de una semiamplitud significativamente menor al de 60°, el espectro de cada orientación de la bicapa es diferente de otra, haciendo que al sumar sobre todas las orientaciones posibles de la bicapa nos termine dando un espectro tipo polvo donde contribuyen cada uno de los promedios de esos conos. El S_{app} obtenido de este espectro fué 0.88. Si lo comparamos con el espectro calculado con $F_C(\tau_{RPE})=1.0$ notaremos que este último mantiene su aspecto tipo espectro de “polvo”, con S_{app} de 0.99. Además y como era esperable el espectro para $F_C(\tau_{RPE})=0.46$, dá un espectro de características intermedias entre los 2 anteriores, con un S_{app} de 0.87.

En el Gráfico 3.23. I, III, V, se muestra la contribución de los picos $I=0$ e $I=-1$ al espectro total. Puede observarse el corrimiento hacia campos menores del pico B y hacia campos mayores del valle A, con lo que el ancho del pico va aumentando a medida que el $F_C(\tau_{RPE})$ tiende a 1 (menos promediado). Pero este efecto es menos pronunciado que para los espectros correspondientes al cono de 60°.

Al igual que para el cono de 60°, el valle A se corresponde perfectamente con el valle del espectro total, y se puede justificar de la misma manera. En este cono, el pico B no presenta la misma correspondencia con el pico X del espectro total, en altura y posición (como lo hacía el espectro del cono de 60°), para un $F_C(\tau_{RPE})=0.0$. Esto podría explicarse, si observamos el extenso solapamiento que existe entre el pico $I=0$ e $I=-1$, aún para un $F_C(\tau_{RPE})=0.0$. Este solapamiento es consecuencia de la baja semiamplitud de este cono. De todas maneras, notar la muy buena correspondencia de la “posición” del pico B con el pico X del espectro total.

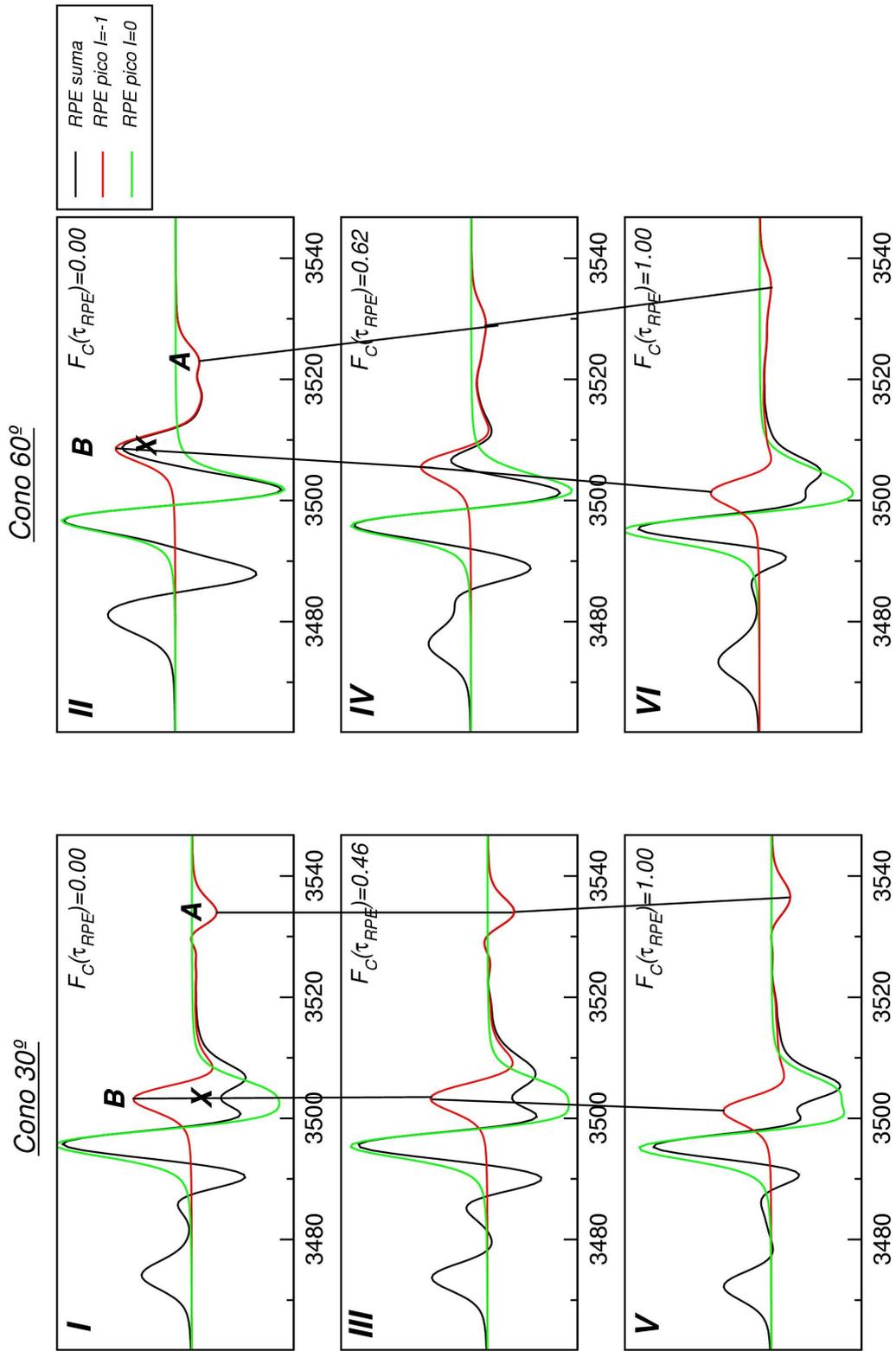
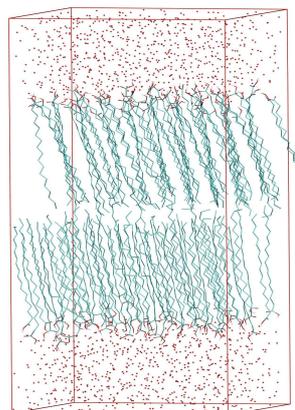


Gráfico 3.22: espectros de RPE obtenidos para 2 distribuciones cónicas uniformes de 30° y 60° de semiapertura, para una bicapa NO orientada. Se emplearon los valores de $F_C(\tau_{RPE})$ mostrados en la Tabla 3.1. En línea negra se muestran los espectros suma (de las proyecciones de espín nuclear, $l=-1, l=0, l=+1$), en verde el espectro correspondiente a la proyección de espín $l=0$ y en rojo $l=-1$.

CAPITULO 4



4. Bicapas de AE

4.1. Construcción de una bicapa de ác. esteárico

Las moléculas de ácido esteárico (AE) se construyeron “de novo” empleando, ángulos y distancias de enlaces estándares. Los ángulos diedros de las colas hidrocarbonadas se construyeron en conformación “*trans*”, por ser esta la más estable.

Las moléculas de AE se distribuyeron en una bicapa empleando un programa construido “ad hoc” en lenguaje fortran. El mismo emplea el método “skew start”[Refson, 2001] para contruir una grilla bidimensional (x, y) donde ubicar copias de la molécula de ácido esteárico, previamente armado, con una distribución regular en x,y no periódica. El empleo de esta distribución no periódica de los lípidos evita iniciar la simulación desde una una situación ficticia, símil cristal, y de esta manera acortar el tiempo necesario para que el sistema alcance el equilibrio.

Para nuestra bicapa se decidió trabajar con una distancia entre las cabezas hidrofílicas de cada monocapa (espesor inicial) de 49 Å y una dispersión de esta distancia de 1 Å. De esta manera las colas hidrocarbonadas no se contactaban, y dejamos por cuenta de la simulación el acortamiento de las distancias entre monocapas.

La superficie expuesta por molécula de AE es conocida

experimentalmente a partir de curvas de tensión superficial de monocapas tipo Langmuir [Menger y col., 1988.] y estudios cristalográficos [Goto y Asada, 1978], su rango oscila entre 21 y 24 Å² dependiendo de la presión lateral (Π). Para nuestra bicapa se decidió trabajar con una superficie de 21 Å². Este valor hace que la distribución superficial de las moléculas sea físicamente realista y evita que gran cantidad de moléculas de agua sean colocadas entre los ácidos esteáricos, durante la construcción de la caja de simulación.

Se prepararon una serie de bicapas con distintos parámetros geométricos (“k” desde 3 hasta 10) y distinto número de ácidos esteáricos por monocapa de 65 a 75, empleando el método “skew start”, antes citado. Este número de lípidos genera un número de átomos totales que pueden ser simulados en tiempos razonables para las facilidades computacionales disponibles y se halla dentro de las cantidades de lípidos habitualmente empleadas en simulaciones de bicapas. Cada una de las bicapas construidas fueron observadas cuidadosamente con el programa VMD (Visual Molecular Dynamics) [Humphrey y col. 1996], para seleccionar aquella configuración que presentara la menor cantidad de espacios o cavidades en los bordes de la caja, ya que los mismos generan comportamientos indeseables en los primeros pasos de la simulación como consecuencia de la distribución irregular de los lípidos en esas zonas. Finalmente se seleccionó el arreglo correspondiente al valor de “k” 6 y 70 lípidos por monocapa.

A esta bicapa “seca” se les generó una caja rectangular de simulación, cuyos límites en x e y se hallara a una distancia máxima de 0.1 Å. Así logramos que la caja encierre ajustadamente a todos los lípidos, cuya área ya fue definida cuando construimos la bicapa. Los límites en z (caras perpendiculares a z) se impusieron fijando un largo total en z de la caja de 70 Å, y centrando los lípidos a la caja, con lo cual quedó una distancia aproximadamente de 21 Å desde las cabezas lipídicas hasta la cara perpendicular al eje z más próxima.

Se realizó una primera minimización de energía del sistema antes descripto, empleando el método de descenso más abrupto, hasta que la fuerza máxima sobre un átomo cualquiera del sistema fuera inferior a 200 kj

mol⁻¹ nm⁻¹ para permitir que las moléculas de lípidos se reacomoden entre sí, de una manera físicamente razonable. Luego de esta etapa, se aproximaron las monocapas para disminuir las distancias entre las colas hidrocarbonadas y se volvió a minimizar la energía del sistema.

Posteriormente se insertaron moléculas de agua, modelo SPC (Single Point Charge), a partir de una caja de aguas pre-equilibradas a 300 K. Durante el procedimiento, se eliminaron todas aquellas moléculas de agua que se hallaran a una distancia menor de 1.05 Å de los lípidos. Posteriormente se eliminaron todas aquellas moléculas de agua que se ubicaron en la interfase de cada monocapa y entre los lípidos de cada monocapa.

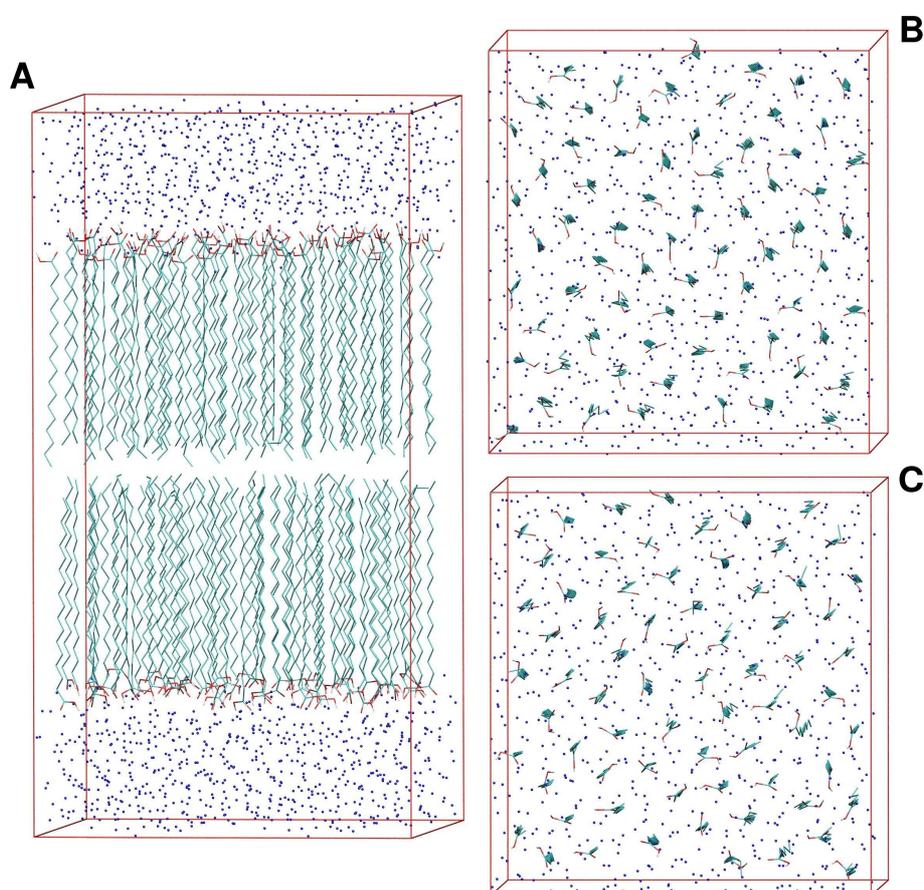


Gráfico 4.1: imágenes de la caja de simulación preparada para iniciar la simulación de DM. Los gráficos 4.1 B y C muestran las vistas superior e inferior de la caja de simulación respectivamente. Las moléculas de AE aparecen en palitos finos, con código de colores tipo CPK, y solo se muestran los O de las moléculas de agua como pequeñas esferas azules. Para mayor simplicidad se eliminó en cada uno de ellos (4.1 B y C) la monocapa de moléculas que se hallaba a mayor distancia de la vista.

Finalmente se realizó una minimización de la energía total del sistema para eliminar todos los contactos atómicos (átomos demasiado

próximos) que se pudieran haber generado durante el agregado del agua y su posterior manipulación. En el Gráfico 4.1 se muestran imágenes de la caja de simulación inicial.

4.2. Protocolo de Preparación de la Bicapas

Los tiempos necesarios para que los sistemas simulados, mediante DM alcancen el equilibrio termodinámico, suelen ser largos, y por lo tanto costosos computacionalmente. Además, el espacio conformacional explorado a una dada temperatura suele no alejarse demasiado de la configuración inicial. Es por estos 2 hechos que se realizó un protocolo de recocido simulado, para acortar los tiempos de simulación y evitar el sesgo de la configuración inicial.

En todas las etapas de la preparación de la bicapa, así como en la simulaciones posteriores se empleó un acoplamiento a un baño térmico [Berendsen, 1991] con un tiempo de acoplamiento de 0.1 ps.

- **Simulación a T,P = cte (300 K, 1 atm), 200 ps**, se realizó una simulación a T y P constantes, 300 K y 1 atm, respectivamente, con el objetivo de ajustar el tamaño de la caja a valores de presión razonables. En esta etapa de preparación se empleó un acoplamiento a un regulador de presión [Berendsen y col., 1984] tipo semi-isotrópico (isotrópico en x, y, e independiente de z) , con un tiempo de acoplamiento de 4 ps y una constante de compresibilidad de $6 \cdot 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$.
- **Calentamiento de 300 K a 350 K en 200 ps**, a partir del paso anterior se realizó un calentamiento del sistema de 300 a 350 K, aplicando una restricción suave en las posiciones de los carbonos C2 de las cabezas, en la dirección Z (70 KJ/mol.nm^2). Los átomos restringidos se mantuvieron a la distancia promedio de sus cabezas. Estas restricciones se emplearon para evitar que algunos ácidos se salieran de la bicapa durante este proceso, pero a la vez permitirles moverse libremente en el plano de la bicapa. Los baños térmicos y de presión empleado fueron los mismos que los empleados en el ítem anterior.
- **Enfriamiento de 350 K a 300 K en 800 ps**, a continuación del paso previo

se realizó un enfriamiento del sistema, manteniendo las mismas restricciones anteriores. El objetivo fue equilibrar el sistema a la temperatura deseada de 300 K. Se le dio un mayor tiempo de equilibrio (800 ps) para permitirle al sistema explorar distintas configuraciones de alta temperatura antes de alcanzar la T deseada, y evitar de esta forma que el sistema pudiera quedar atrapado en una configuración de un mínimo local.

- **Simulaciones a la T de 300 K (cte) y tensión superficial = cte (1206 bar.nm)**, a partir de la configuración del paso anterior se realizaron simulaciones a la T deseada de simulación aplicando las mismas restricciones anteriores, pero disminuyendo en cada etapa la K de restricción. Se realizaron 3 simulaciones sucesivas tomando como configuración inicial, la final de la etapa precedente (K = 50, 30, 15 KJ/mol.nm²). Se decidió tomar una tensión superficial de 1206 bar.nm para el sistema simulado por ser este valor el doble (2 monocapas) del valor experimental para una monocapa de AE.

4.3. Dinámica Molecular a distintas temperaturas

A la configuración final obtenida del proceso de recocido simulado se realizaron simulaciones a varias temperaturas de baño térmico (285 K, 300 K, 315 K, 330 K) de 8 ns, con tiempo de integración de 2 fs. Para ello se empleó un acoplamiento a un baño térmico [Berendsen, 1991][Berendsen H.J.C.(1991)] con un tiempo de acoplamiento de 0.1 ps y un acoplamiento a un regulador de presión [Berendsen y col., 1984] tipo tensión-superficial constante (1206 bar.nm), con una presión normal a la bicapa de 1 atm., con un tiempo de acoplamiento de 4 ps y una constante de compresibilidad de $6 \cdot 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$.

Para evaluar si el sistema se hallaba en equilibrio en la etapa de producción (donde se calcularon las propiedades que se detallan más abajo), se analizó la evolución del área por molécula a lo largo del tiempo de simulación. En el Gráfico 4.2 solo se muestra para mayor simplicidad la evolución del área a 300K. Notar que dicho parámetro se muestra estable, sin tendencia a aumentar o disminuir con el tiempo.

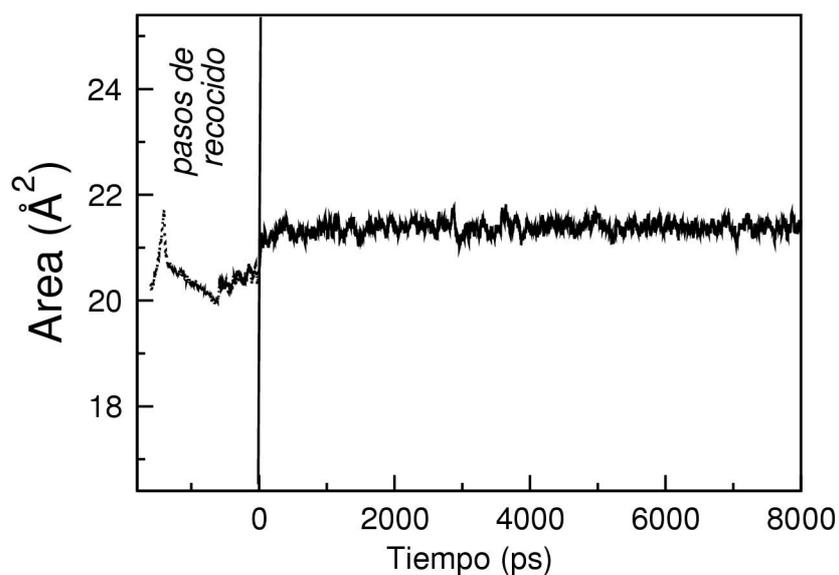


Gráfico 4.2: evolución del área por molécula de AE vs. Tiempo de simulación. Notar que el sistema tomó un valor de área estable enseguida después del proceso de recocido.

4.4. Propiedades Estructurales

A continuación se detallan resultados que son parámetros de interés en toda simulación de bicapas modelo, y que se relacionan directa o indirectamente con datos experimentales. Con fines cualitativos se muestran los últimos arreglos de lípidos obtenidos a 300 K (Gráfico 4.3).

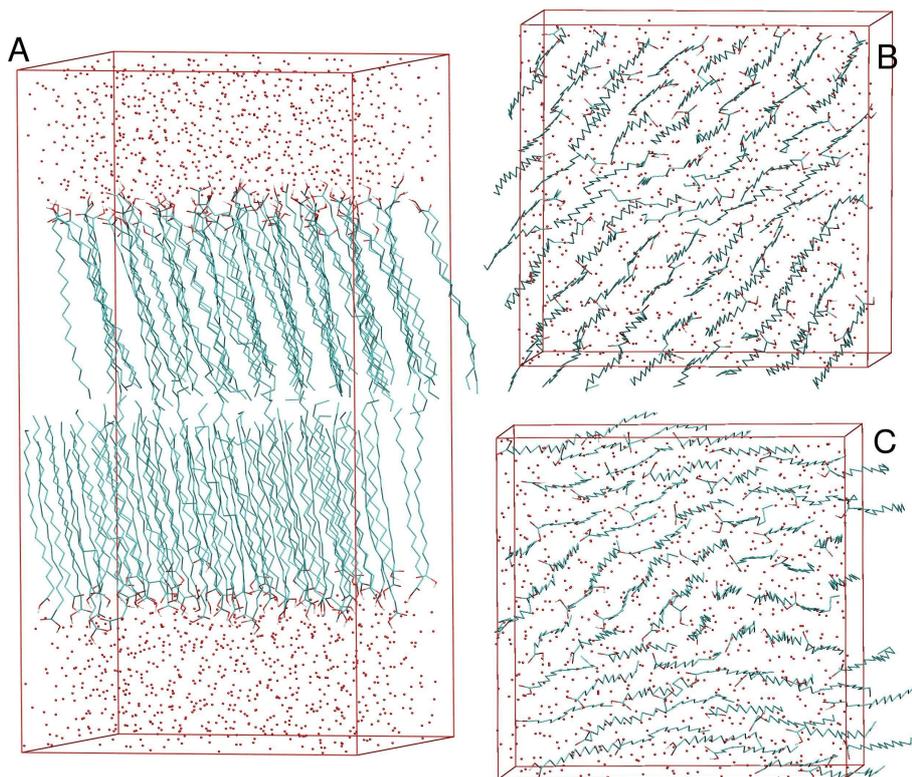


Gráfico 4.3: se realizó empleado el mismo código de formatos y colores que el empleado para el gráfico 4.1. Notar la inclinación del eje principal (tomado éste, desde el carbono 1 (C1) hasta el carbono 18 (C18)) respecto a la normal a la bicapa.

Puede observarse que las moléculas presentan una tendencia colectiva a aumentar la inclinación del eje principal (tomado éste, desde el carbono 1 (C1) hasta el carbono 18 (C18)) respecto a la normal a la bicapa. Esta inclinación molecular respecto a la normal es usualmente denominado “tilt”, y es un fenómeno observado en las bicapas de distintas composiciones [Höltje y col., 2001].

4.4.1. Fracción de Diedros en Conformación *trans*

La fracción de diedros en *trans* se calculó como el promedio temporal y espacial de todos los diedros de las colas hidrocarbonadas (C1 a C18) que se hallan en conformación *trans* (180 °) respecto al número total de diedros.

En el Gráfico 4.4 se observa que la fracción *trans* va disminuyendo con la temperatura, desde 0.98 (285 K, 12 °C) a 0.95 (330 K, 57 °C). Esta pequeña variación se puede justificar por el aumento de *E* cinética del sistema, que permite que algunos diedros pasen de *trans* (ángulo de

mínima energía potencial) a gauche (de mayor energía).

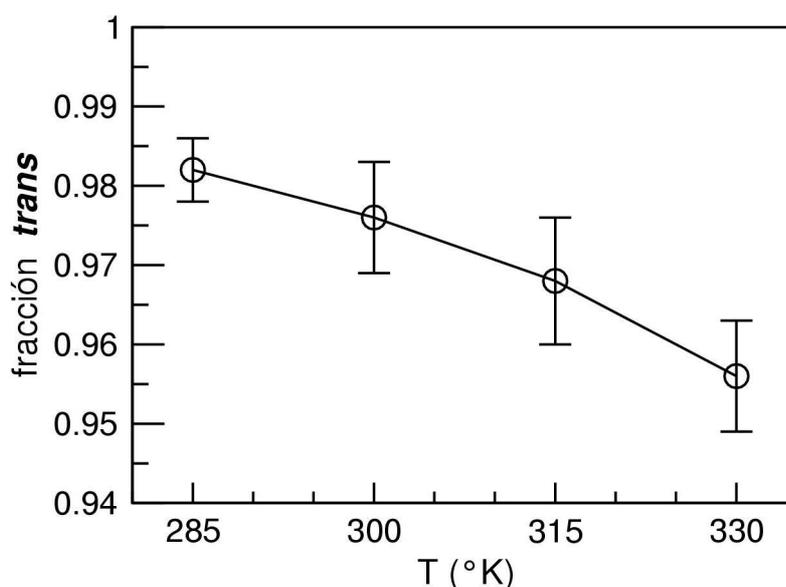


Gráfico 4.4: evolución de la fracción “trans” con la variación de T (K), para cada simulación. Puede apreciarse la disminución de la fracción “trans” con el aumento de la T, así como el aumento de su dispersión.

También se observa que la *dispersión de la fracción trans* va aumentando con la temperatura, lo cual indica que el número de transiciones trans-gauche por unidad de tiempo del sistema también está aumentando con la temperatura. Es decir que si se observa a distintos tiempos el sistema a temperatura elevada notaremos mayores diferencias en la composición trans-gauche que a menor temperatura.

Estos resultados son consistentes con la disminución del largo promedio de las moléculas de AE, y también con la fluctuación del largo promedio de las mismas. Cada vez que aparece un diedro en gauche en una molécula, su largo disminuye. Además como la composición en diedros gauche esta variando más a mayor temperatura el largo promedio de las moléculas también lo hace.

4.4.2. Superficie por Molécula

Se calculó como la superficie de la caja de simulación (x, y) dividido el número de moléculas en una monocapa (70), promediada para un intervalo el intervalo de tiempo de 2000 a 4000 ps.

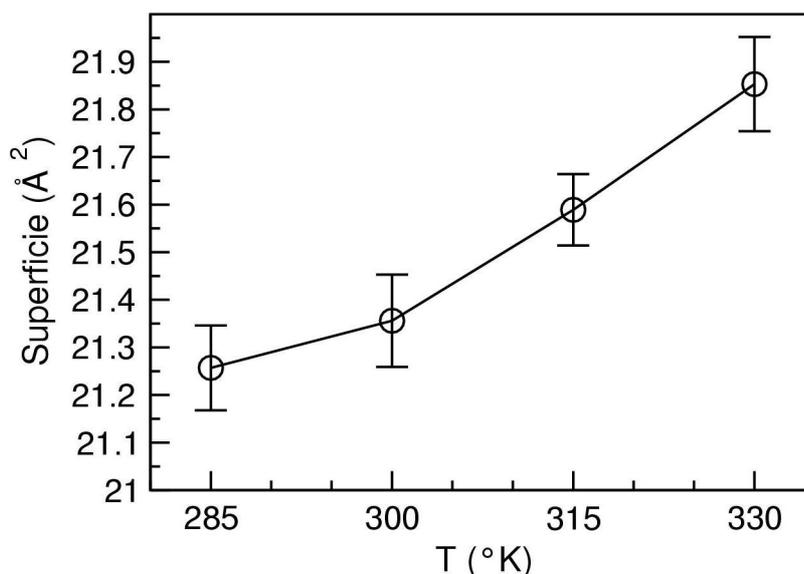


Gráfico 4.5: superficie por molécula de ácido esteárico (Å²) a distintas temperaturas de simulación. Puede observarse el incremento de este parámetro con la temperatura.

Se observa en el Gráfico 4.5 una tendencia a aumentar la superficie por molécula a mayor temperatura de simulación. Esa tendencia puede explicarse, al menos en parte por el aumento de las transiciones trans-gauche, que aumentan el número de impedimentos estéricos en las colas hidrocarbonadas, necesitando cada molécula de ácido esteárico mayor superficie para efectuar los mismos movimientos.

4.4.3. Tilt Z

El tilt z se definió como el ángulo formado por el vector entre el carbono C1 del grupo químico carboxilo y el átomo C18 del metilo terminal con el eje z del sistema, el cual está definido como normal a la bicapa. Este vector “promedio” se calculó como el promedio sobre todos los AE de cada monocapa, en los 2 ns finales de producción.

En el Gráfico 4.6 se graficó el tilt z promedio vs temperatura y con barras de error el desvío estándar promedio del tilt z (promedio temporal del desvío estándar del tilt z).

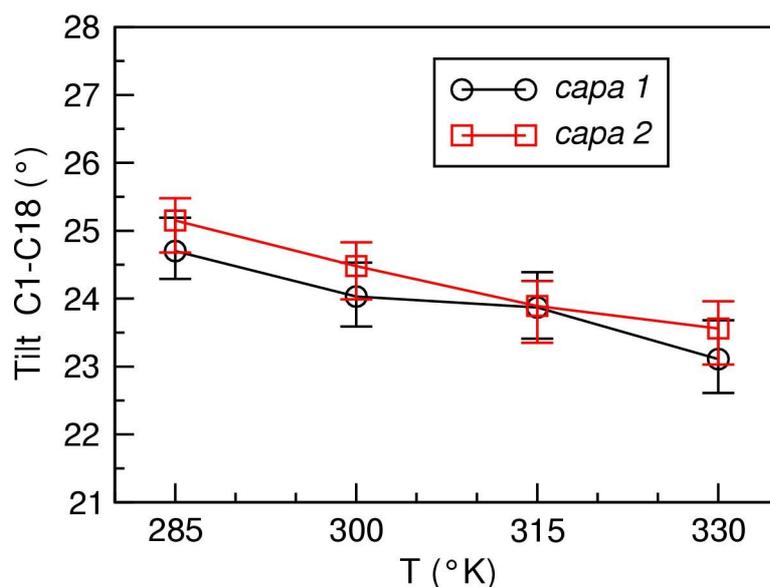


Gráfico 4.6: variación del tilt (ángulo entre la normal a la bicapa y el eje longitudinal de la molécula). El tilt promedio es de aproximadamente 25°, con valores que oscilan entre 20° y 30°.

Puede observarse una pequeña pero significativa disminución del tilt con el aumento de la T.

Para poder establecer si el tilt de los AE era colectivo o al azar, se calculó el ángulo azimutal del vector "tilt", definiendo a este como el ángulo formado por la proyección del vector C1-C18 sobre el plano xy (plano paralelo a la superficie de la bicapa) y el eje x. Si el desvío estándar del ángulo azimutal es muy pequeño, indica que los AE se hayan inclinados todos en la misma dirección. Los valores del desvío estándar del ángulo azimutal fueron: 1.5°, 1.7° 1.9° y 2.3° para las T, 285K, 300K, 315K y 330K respectivamente. Esto indica claramente que los AE se hallan con un tilt colectivo, lo cual se corresponde con la imagen global de la bicapa (), donde puede apreciarse visualmente este efecto.

4.4.4. Factor de Estructura

El factor de estructura como se describió en el capítulo 2 de teoría, permite analizar la existencia de algún ordenamiento bidimensional en un sistema de partículas.

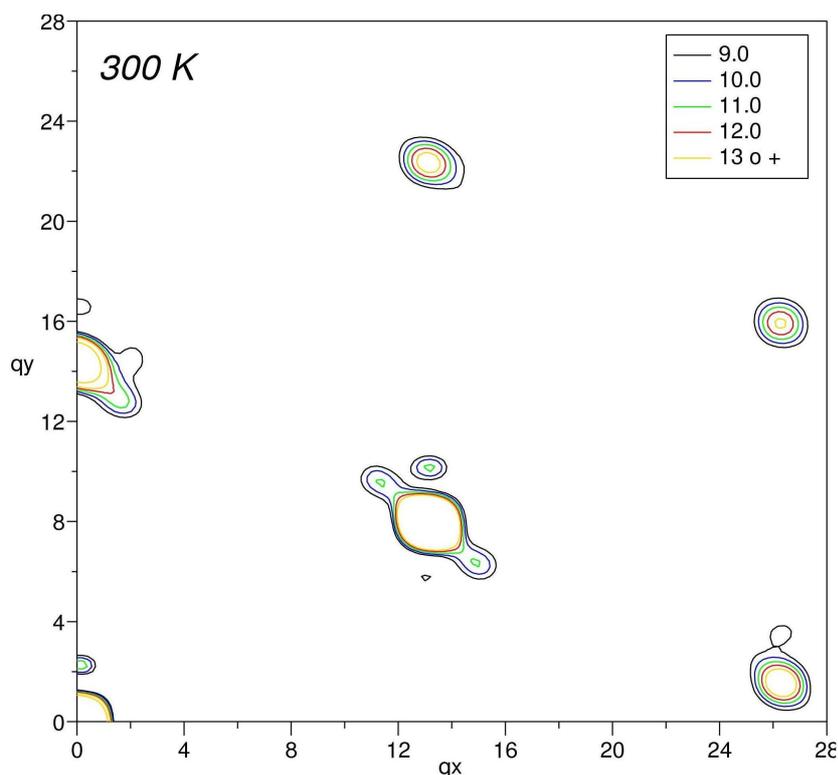


Gráfico 4.7: líneas de contorno del Factor de Estructura en función de los parámetros q_y y q_z , para distintas temperaturas. La presencia de los picos observados, indican cierta regularidad de corto alcance, y un estado de fase gel o líquido ordenado.

En nuestro caso particular, queríamos saber si el sistema pasaba por algún ordenamiento de sus átomos al variar la temperatura de simulación. De existir algún ordenamiento, el mismo podría estar relacionado con un cambio de fase del sistema en estudio.

El cálculo se realizó buscando alguna regularidad de los átomos de carbono C3 próximos a las cabezas polares sobre el plano xy, por lo que el factor de estructura calculado de esta manera es solo función de dos variables (q_x, q_y). De existir alguna ordenamiento regular deberían aparecer picos uniformemente espaciados, como se ejemplificó en el capítulo 2.

En el Gráfico 4.7 se muestra un gráfico de contorno con los valores del factor de estructura en función de q_x y q_y , para 300K.

Puede apreciarse que existen varias zonas de valores altos, que indican la presencia de una regularidad espacial de corto alcance. A las otras T estudiadas se obtuvieron picos en las mismas posiciones que las mostradas en el Gráfico 4.7, pero menos intensos, lo cual puede interpretarse como

debido al aumento de los movimientos de los AE, que hace que las posiciones de los átomos disminuyan su ordenamiento, pero manteniendo la regularidad de corto alcance.

4.4.5. Momento Dipolar

El Grafico 4.8 muestra los valores de las componentes x , y , z del vector momento dipolar, calculado para una monocapa (promedio sobre todos los AE, de la misma (70)), a distintos tiempos de simulación. Se puede observar que el promedio de las componentes x e y , se mantienen próximas a cero, lo que indica que los AE no poseen una orientación preferencial de sus dipolos en el plano de la bicapa. En cambio el promedio de la componente z tiene un valor claramente distinto de 0, y que es el responsable de otorgarle polaridad a la bicapa. A los fines de la comparación se agregó en gráfico de barras, el promedio y el desvío estándar de las componentes del vector momento dipolar de un AE aislado. Notar que sus fluctuaciones son mayores que las del promedio, indicando que las cabezas polares de los AE tienden a orientarse de manera de disminuir su momento dipolar en el plano de la bicapa.

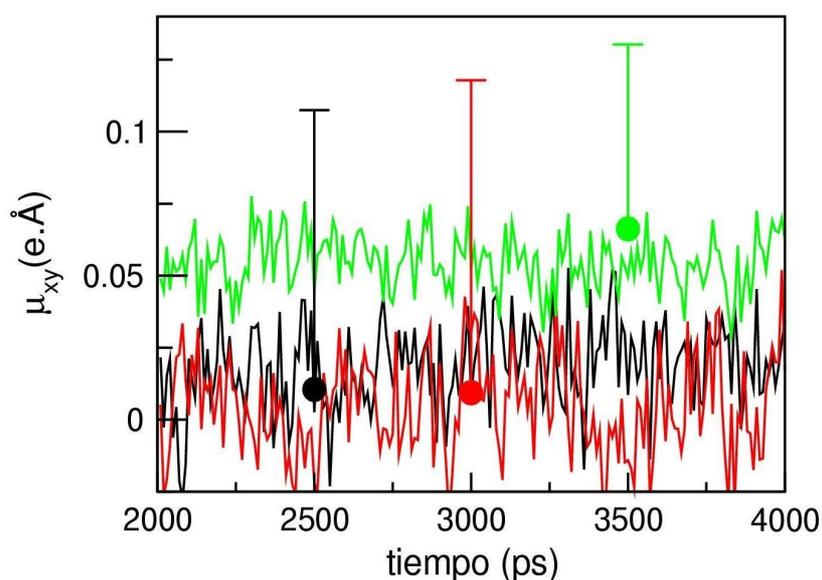


Gráfico 4.8: evolución de las componentes x , y , z del vector momento dipolar, calculado para una monocapa (promedio sobre todos los AE, de la misma (70)), a distintos tiempos de simulación. Las líneas negra y roja representan la proyección x , y del vector momento dipolar, mientras que la línea verde la proyección z . Notar que las proyecciones x , y tienden en promedio a un valor próximo a 0, mientras que la Z posee un valor positivo, el cual es responsable de la polaridad de la bicapa. En círculos y barras de error se muestran las componentes x , y , z del momento dipolar de un AE aislado, tomado al azar.

4.5. Parámetros Dinámicos

Dentro de este apartado se analizan aquellos parámetros que se hallan relacionados a propiedades dinámicas del sistema como son los parámetros de orden (S_{zz}) de los átomos de las cadenas hidrocarbonadas. Estos valores de S_{zz} , como ya se desarrollo en el ítem 3.3, surgen como una medida del orden molecular.

Puede observarse en el Gráfico 4.9 que tanto los átomos de carbono próximos al agua como los próximos a la interface con la otra monocapa presentan el mayor grado de desorden, reflejada por los valores más bajos de la componente z del tensor parámetro de orden (S_{zz}). Mientras que los átomos de carbono de ubicados en el centro de la monocapa presentar la menor movilidad (S_{zz} más altos). Notar que las diferencias en los valores de S_{zz} de cada monocapa son muy pequeños, lo cual indica que su comportamiento es semejante desde un punto de vista dinámico. Los valores hallados en el centro de la capa (C3 a C14) son próximos al valor esperado para un tilt de aproximadamente 25° y una dispersión de 5° (0.73), lo que indica la existencia de una buena correlación entre el tilt hallado y los S_{zz} calculados.

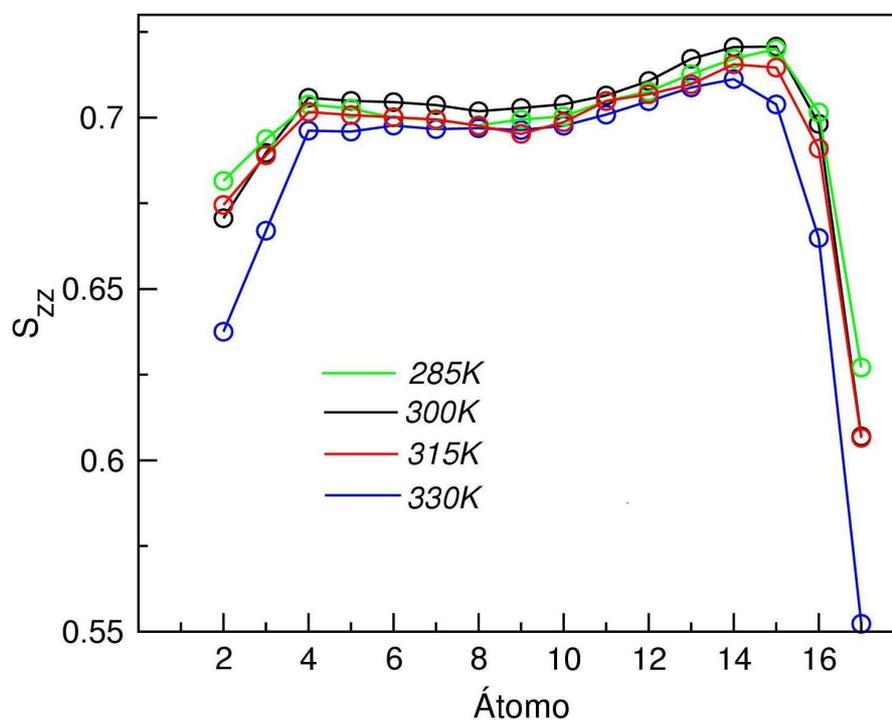
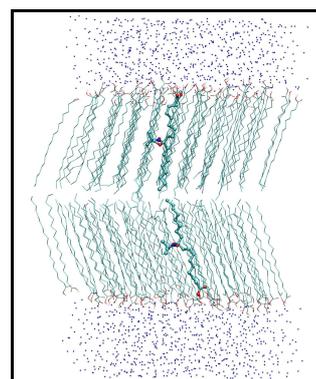


Gráfico 4.9: parámetros de orden para cada átomo de la cadena hidrocarbonada de los ácidos esteáricos.

Puede observarse que los átomos próximos al agua (C2, C3) y los próximos a la interface con la otra monocapa (C16, C17) presentan el mayor grado de desorden (menor parámetro de orden). Se observan además una zona de poca variación, que corresponde a los átomos (C5 al C10), de la zona central de cada monocapa. Notar que el mayor aumento del desorden producido por el incremento de la temperatura, se da a nivel de las colas y las cabezas “hidrofílicas”. Además puede apreciarse en el gráfico la escasa variación de los valores de S_{zz} con la temperatura.

CAPITULO 5



5. Bicapas de Ácido Esteárico Marcadas con Ácido 10 doxil esteárico

5.1. Construcción de una bicapa de AE marcada con 10-doxil-AE (AE*)

Se decidió construir en una primera etapa del trabajo el ácido 10-doxyl esteárico (10-doxil-AE). En este caso el marcador doxil (4,4-dimetiloxazolidina N-oxil) se halla ubicado aproximadamente en el centro geométrico de la molécula.

Para construir la molécula del 10-doxil-AE, en primera instancia se buscó en la base de datos estructurales Cambridge [Allen, 2002], empleando el software ConQuest [Bruno y col., 2002] todas aquellas moléculas para las que se contara con datos de su estructura cristalográfica y presentaran el grupo doxyl (Gráfico 5.1); hallándose las mostradas en el Gráfico 5.2.A [Bordeaux y col. 1983], 5.2.B [Bordeaux y Lajzerowicz-Bonneteau, 1974] y 5.2.C [Gleason, 1973]. En la Tabla 5.1, se detallan los datos estructurales más relevantes encontrados para las moléculas anteriores.

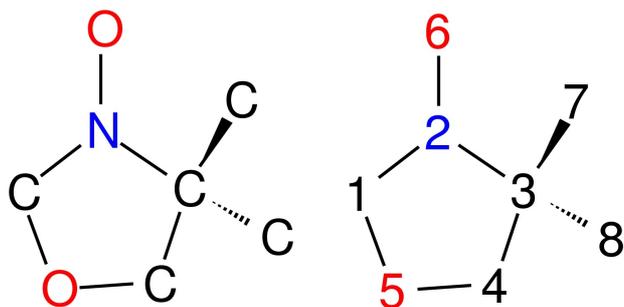


Gráfico 5.1: estructura química utilizada como base para la búsqueda en la base cristalográfica de Cambridge (CCDC)

Con estos datos se construyó “*de novo*” la estructura molecular del 10-doxil-AE, con todos los enlaces de la cadena hidrocarbonada en configuración *trans*. Esta estructura se remitió para el armado de la topología al servidor PRODRG [van Aalten y col., 1996]. Se decidió emplear la topología

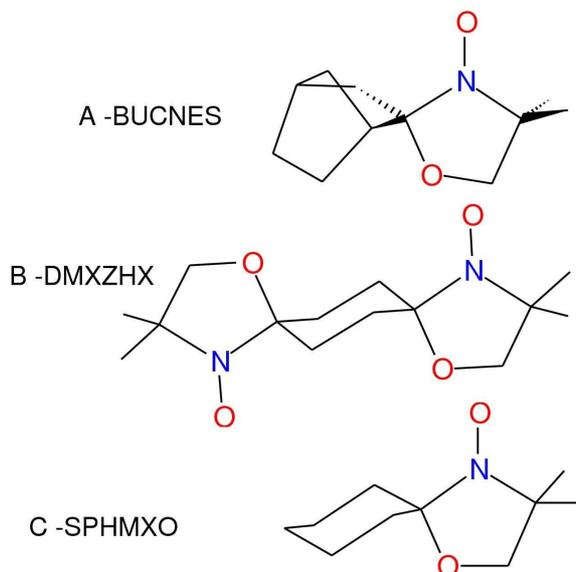


Gráfico 5.2: moléculas encontradas en la base cristalográfica Cambridge, que contenían el grupo doxil.

remitida por el servidor pero optimizando las cargas empleando un cálculo “*ab initio*” sobre el grupo doxil, el cual se detalla en el próximo ítem.

Tabla 5.1: se detallan los valores encontrados para las distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulo diedros de las moléculas encontradas en la base cristalográfica de Cambridge, que sirvieron de guía en la construcción de la molécula de ácido esteárico marcado en posición 10.

Distancias de enlace								
Enlace	1_2	2_3	3_4	4_5	5_1	2_6	3_7(up)	3_8(down)
bucnes	1.48	1.48	1.52	1.41	1.44	1.27	1.53	1.55
dmxzhx	1.51	1.53	1.54	1.35	1.42	1.25	1.51	1.53
sphmxo	1.46	1.48	1.51	1.32	1.39	1.26	1.52	1.52

Ángulos de enlace												
Ángulo	123	234	345	451	512	126	623	237	238	738	734	834
bucnes	112.80	98.84	105.38	107.89	100.32	123.36	123.58	109.23	109.46	111.48	115.59	111.42
dmxzhx	108.89	101.21	107.72	114.30	103.37	124.65	126.35	110.87	110.03	112.19	110.00	115.88
sphmxo	112.90	98.80	111.58	114.39	102.33	123.33	123.77	109.10	109.10	111.82	113.55	113.55

Ángulos Diedros					
	Propios				Impropios
Diedros	1234	2345	3456	4561	1623
bucnes	10.50	-29.81	40.87	31.95	174.07
dmxzhx	-4.63	16.31	-23.88	19.95	175.68
sphmxo	0.00	0.00	0.00	0.00	180.00

5.2. Optimizando la carga del grupo doxil

Para optimizar la carga del grupo doxil y que la misma fuera consistente con la cargas empleadas por el campo de fuerza empleado en las simulaciones de las bicapas de ácido esteárico (gromos96, ffG43a2), se procedió de la siguiente manera:

- a) Cálculo “*ab initio*” sobre la estructura del grupo doxil y de ácido acético (cabeza polar del ác. esteárico) .
- b) Asignación de cargas, empleando el algoritmos CHELPG [Breneman y Wiberg, 1990].
- c) Escalado de las cargas del grupo doxil acorde a la proporción observada entre la carga obtenida para el ácido acético (parte cargada del ácido esteárico) y la carga asignada en la parametrización del las moléculas de ác. esteárico.

Los cálculos “*ab initio*” se realizaron con un nivel teoría Hartree-

Fock y para dos conjuntos de bases: 3-21G y 6-311G con el programa GAMESS [Schmidt y col., 1993]. Para el grupo doxyl se empleó como estructura molecular inicial la mostrada en la gráfico 5.2 (A-Bucnes) [Bordeaux y col. 1983] y para el ácido acético se empleó la estructura molecular del grupo carboxilato del ácido esteárico empleado en las simulaciones previas. El cálculo se realizó optimizando la geometría molecular del anillo doxil. Esta optimización se realizó restringiendo las distancias y ángulo de enlace que se muestran en la Gráfico 5.3, las cuales evitan un cambio conformacional no compatible con la inserción del grupo doxil en la molécula de ác. esteárico. La optimización se realizó hasta un criterio de convergencia de $1 \cdot 10^{-5}$ unidades de carga de diferencia entre dos iteraciones sucesivas (default).

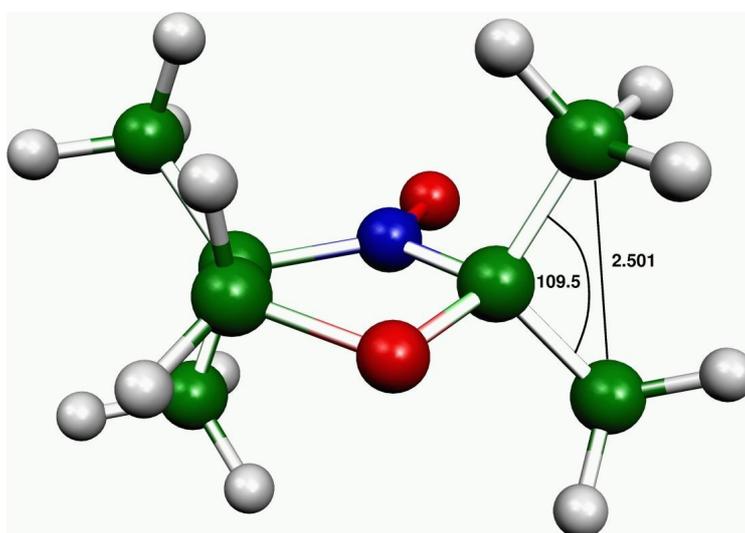


Gráfico 5.3: estructura molecular del anillo doxil, con distancias y ángulos de enlace correspondientes a la estructura 5.2 (A-Bucnes). Se muestra además la distancia y ángulo mantenidos constantes durante el cálculo cuántico.

En la Tabla 5.2, se muestran los resultados obtenidos para el carboxilato. Puede notarse que la relación entre las cargas utilizadas para el carboxilato en la parametrización “Gromos 96”, son significativamente menores que la calculada mediante cálculo “*ab initio*” (50 % menores) y con la aproximación CHELPG. También se observa que la diferencia hallada para el cálculo realizado con la base 6-311G es ligeramente mayor que el obtenido con la base 3-21G.

Tabla 5.2: Comparación de las cargas obtenidas empleando la aproximación CHELPG (aplicada sobre cálculos "ab initio" con bases 321G y 6311G), con las cargas parametrizadas en el campo de fuerza "Gromos 96". Puede observarse que las cargas calculadas por métodos "ab initio", son un 50 % máyores que las correspondientes al mismo tipo de átomo para el campo de fuerza Gromos 96.

Átomos	Carboxilato					
	H	OH	O	C	Carga_tot.	Rel_promedio
Gromos 96	0.40	-0.55	-0.38	0.53	0.00	
6_311G	0.53	-0.89	-0.75	1.20	0.10	
Relación (Gromos96/3_11G)	0.75	0.62	0.51	0.44		0.58
3_21G	0.48	-0.79	-0.66	1.08	0.11	
Relación (Gromos96/3_21G)	0.83	0.69	0.58	0.49		0.65

De acuerdo a estos resultados se decidió trabajar con un factor de escala único (0.58) para establecer las cargas del anillo doxilo, mientras se mantuvieron el resto de las cargas atribuidas por PRODRG para el resto de la molécula (10-doxyl esteárico).

Se insertaron 2 moléculas de 10-doxil-AE en la bicapa, una en cada monocapa. Para ello se decidió trabajar a partir de una bicapa ya equilibrada con AE a 285 K, la cual proveería un entorno de inicio suficientemente regular. Se reemplazaron 2 moléculas de AE (una en cada monocapa) que se hallaban suficientemente separadas entre sí (en el plano xy), por 2 moléculas de 10-doxil-AE (**AE***). Posteriormente se realizó una minimización de la energía total del sistema hasta que la fuerza máxima sobre un átomo cualquiera del sistema fuera inferior a $200 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ para eliminar todos los contactos atómicos (átomos demasiado próximos) que se pudieran haber generado durante la manipulación de las moléculas.

5.3. Protocolo de Preparación de la Bicapas

Se empleó el mismo protocolo de recocido simulado descrito en el apartado 4.4 con el agregado de restricción suaves en la dirección Z, en las posiciones de los C2 de las moléculas de AE-marcado. Estas restricciones fueron de la misma magnitud que las empleadas para los carbonos C2 de las cabezas de los AE.

5.4. Dinámica Molecular a distintas temperaturas

A esta configuración inicial se le realizaron simulaciones de 12 ns a varias temperaturas de baño térmico (285° K, 300 °K, 315 °K, 330 °K) y una tensión superficial constante (1206 bar.nm), con tiempo de integración de 2 fs. Para ello se empleó un acoplamiento a un baño térmico [Berendsen, 1991] con un tiempo de acoplamiento de 0.1 ps y un acoplamiento a un regulador de presión [Berendsen y col., 1984] tipo tensión superficial constante, con un tiempo de acoplamiento de 4 ps y una constante de compresibilidad de $6 \cdot 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$.

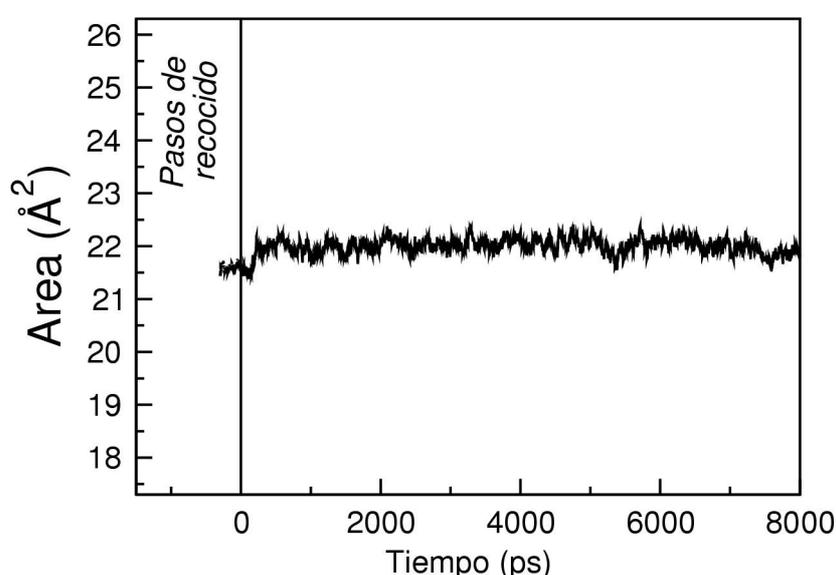


Gráfico 5.4: evolución del área por molécula de AE durante el tiempo de simulación a 300K. Notar que el sistema adopta valores de área relativamente constantes, sin tendencia a aumentar o disminuir. Igual comportamiento se observó en los sistemas a 285K y 315K.

En el Gráfico 5.4 se muestra la evolución del área por molécula de AE a lo largo de la simulación a 300K (igual comportamiento pudo apreciarse para las simulaciones a 285K y 315K). Puede apreciarse que el área se mantiene constante luego del período de recocido, por lo que que consideramos que el sistema se halla equilibrado y utilizamos los últimos 2 ns como período de producción.

5.5. Propiedades Estructurales

El Gráfico 5.5 muestra la configuración del último frame de la simulación a 300 K. Puede observarse que las moléculas presentan una

inclinación colectiva de su eje principal, similar a la ya observada para el sistema AE puro. Visualmente, la inserción de la molécula marcada no parece perturbar seriamente el comportamiento global de los lípidos, pero esto será analizado con más detalle en los próximos ítems. Todos los cálculos estructurales que se muestran a continuación se realizaron con las mismas definiciones y métodos de cálculo detallados en el capítulo 4 (AE puro), por lo que sólo se repetirán donde se haya efectuado algún cambio en los mismos o para enfatizar algún resultado particular.

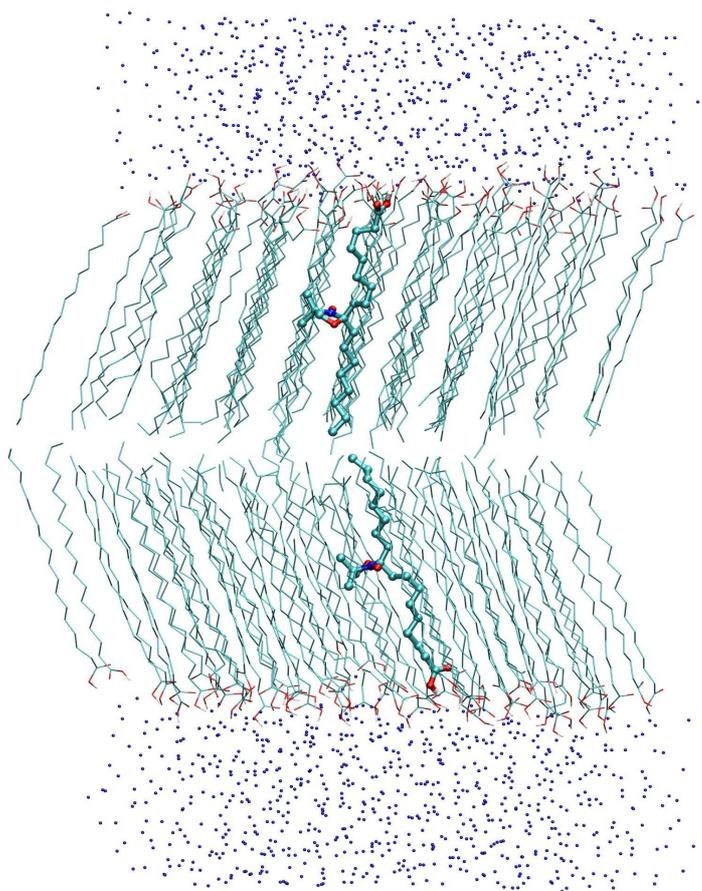


Gráfico 5.5: arreglo molecular final de una bicapa de ác. esteárico (139 moléculas), dibujadas con palitos finos. Las dos moléculas de AE se dibujaron como modelos de esferas y palitos. Los átomos de AE y AE* se colorearon de acuerdo al modelo CPK. Para mayor simplicidad, solo se dibujaron los átomos de O de las moléculas de agua como esferas de color azul.*

5.5.1. Fracción de Diedros en Conformación *trans*

En el Gráfico 5.6 se muestra en cuadrados rojos los valores de la fracción ***trans*** correspondientes a los AE del sistema simulado con el

marcador. Puede observarse que la fracción **trans** va disminuyendo con el aumento de la temperatura, desde 0.975 (285 °K) a 0.948 (330 °K) (promedios entre las 2 capas) lo cual representa aproximadamente 103 y 215 **gauche** por capa respectivamente.

Si recordamos que hay 69 AE por capa, esto implica que algunos AE aún a 285 °K, presentan más de un diedro **gauche** en su molécula. Este hecho se puede justificar por el aumento de E cinética del sistema, que permite que algunos diedros pasen de conformación **trans** (ángulo de mínima energía potencial) a **gauche** (de mayor energía).

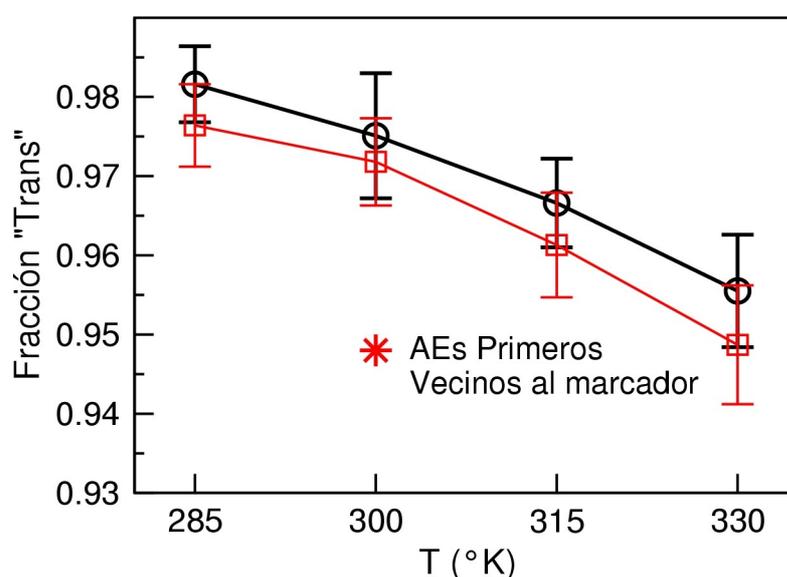


Gráfico 5.6: variación de la fracción de diedros en conformación **trans** en los ácidos esteáricos de la bicapa (sin incluir el marcado) por efecto de la T. A los fines de la comparación se muestra en color negro los mismos parámetros para las simulaciones realizadas con AE puro y en color rojo el resultado de las simulaciones realizadas con el marcador.

Puede observarse que la fracción de diedros en **trans** disminuye con la temperatura y su dispersión aumenta. Notar que la fracción **trans** en las simulaciones realizadas con AE puro muestran valores más elevados que en las simulaciones realizadas con el marcador, indicando que el marcador perturba el sistema en alguna medida. Con un asterisco se muestra el cálculo de la fracción **trans** de la primer capa de AE vecinos al marcador. Notar que es significativamente menor que el resto de los AE del sistema, indicando que son marcada y diferencialmente perturbados. También se muestra en el Gráfico 5.6, la fracción **trans** de los AE del sistema simulado sin el marcador

(círculos negros). Puede apreciarse que la fracción **trans** en el sistema con el marcador es solo 0.5 % más baja que en la realizada sin el marcador, a cada T estudiada. Nos preguntamos entonces, si esta pequeña diferencia hallada, era consecuencia de un efecto local alrededor del marcador de espín o era un efecto colectivo. Para ello calculamos la fracción trans correspondiente a los primera, segunda capa de vecinos al marcador y como control, la fracción trans de un grupo alejado del marcador. Encontramos que la fracción trans de la primer capa de AE era significativamente más baja que el resto de los mismos, alcanzando los segundos vecinos valores semejantes a los del grupo control. A 300 K se obtuvo: 0.948 (primeros vecinos), 0.974 (segundos vecinos) y 0.976 (grupo control). Si los comparamos contra el promedio global: 0.974 (simulación con el marcador) podemos afirmar que el marcador afecta solo a sus primeros vecinos, y que la diferencia observada entre los sistemas simulados con y sin el marcador, es una consecuencia de esta inhomogeneidad. En el Gráfico 5.6 se incluyó con un asterisco el valor promedio de fracción trans de los primeros vecinos al marcador.

5.5.2. Superficie por Molécula

La superficie de por molécula se calculó como el área de la caja de simulación (x, y) dividido el número de moléculas en una monocapa (70), promediada para un intervalo en los últimos 2ns de la etapa de producción de la DM.

El Gráfico 5.7 muestra en círculos negros abiertos la superficie por molécula para el sistema AE/AE-marcado para cada T de simulación y se agregó a los fines de la comparación la superficie por molécula para el sistema AE puro (círculos rojos llenos). Puede observarse que la superficie muestra una tendencia a aumentar con el incremento de la T. Esa tendencia puede explicarse, al menos en parte por el aumento de la fracción **gauche** con el aumento de la T. Esto se traduce en un aumento del número de impedimentos estéricos en la colas hidrocarbonadas, necesitando cada molécula mayor superficie para efectuar los mismos movimientos.

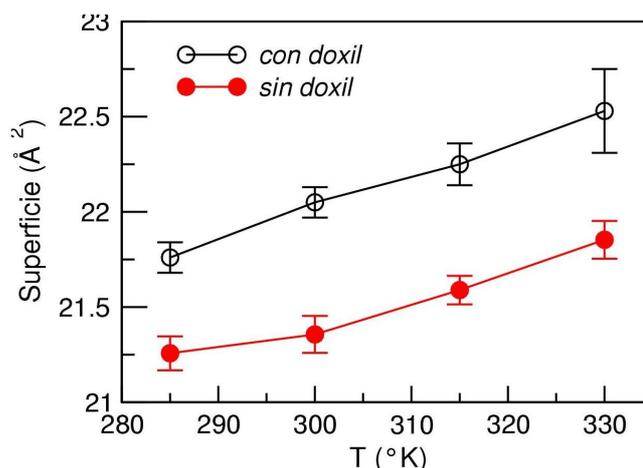


Gráfico 5.7: superficie por molécula (\AA^2) a distintas temperaturas de simulación. A los fines de la comparación se muestra en color rojo los resultados obtenidos para las simulaciones realizadas con AE puro.

Podemos apreciar que los valores de superficie por molécula para el sistema AE/AE* es superior a los del sistema AE puro. Si supusiéramos que el área ocupada por cada AE no se modifica con el agregado de un AE-marcado, el área que le correspondería al AE* sería de aproximadamente 35 \AA^2 , el cual se halla en el intervalo hallado experimentalmente para el sistema ácido mirístico/AE* (12-marcado) (38 \AA^2 a 28 \AA^2 para presiones laterales entre 21 y 32 dinas/cm) [Cadenhead y Müller-Landau, 1976].

El método recién empleado para el cálculo de la superficie por molécula a partir del tamaño de la caja de simulación, es un método comúnmente empleado tanto en sistemas puros como mixtos. Pero esta forma de cálculo tiene la desventaja de que no permite realizar ninguna estadística sobre la cantidad estudiada, y en particular en sistemas mezclas se debe asumir que el área de la caja de simulación se divide homogéneamente entre las moléculas constituyentes, lo cual es un tema controvertido [Falck y col., 2004]. Es por esto que se decidió emplear un segundo procedimiento de cálculo del área basado en la ocupación estadística promedio de cada especie molecular en una grilla de puntos definida en una capa de la caja de simulación (plano perpendicular a la caja simulación). En este método el área de cada molécula o especie molecular puede calcularse independientemente.

Antes de mostrar los resultados obtenidos con el segundo

procedimiento de cálculo de áreas moleculares, es conveniente introducir algunas apreciaciones cualitativas acerca del sistema estudiado (AE/AE*), que servirán como base para su interpretación.

Podemos asumir a partir de la sola observación de la estructura del marcador de espín que su área molecular es considerablemente mayor que la de los AE no marcados, debido a la presencia del anillo doxil. Además debido a la ubicación del anillo doxil también podemos aceptar que su superficie molecular no es homogénea a lo largo del eje largo de la molécula, como sí lo es una molécula de AE no marcado. Los dos conceptos anteriores se pueden resumir diciendo que el marcador es una molécula cuya forma estructural es diferente a la de los AE del sistema. Debido a estos hechos es esperable que el AE* no se ajuste a la estructura ordenada de la bicapa de AE puro, y que por lo tanto se produzca una disminución de la energía de cohesión en el sistema marcado. Las simulaciones se llevaron a cabo a tensión superficial constante, por lo que podría esperarse que la inclusión del marcador de espín produzca un incremento en el área total por AE. Es importante destacar que el área calculada de esta manera no es la suma de las áreas moleculares debido a que existen huecos o espacios vacíos entre ellas. Resulta obvio que las áreas moleculares calculadas con éste método no son directamente comparables a los valores obtenidos a partir de las dimensiones de la caja de simulación. Pero no obstante, las área obtenidas con el método desarrollado por Falck y col. [Falck y col., 2004] son una medida de la superficie ocupada por cada molécula, lo cual permite una comparación entre los diferentes sistemas estudiados. El área obtenida para los AE en los sistemas AE puro y AE/AE* fué de: $13.33 \text{ \AA}^2 \pm 0.02$ y $13.64 \text{ \AA}^2 \pm 0.02$, respectivamente. Estos resultados muestran la misma tendencia calculados por los 2 métodos y son consistentes con la hipótesis descrita más arriba, donde se postuló que la introducción del marcador de espín, cuya forma no se ajusta a la del sistema AE puro (muy compacto), debe resultar en una disminución de la E de cohesión de sus moléculas y en un aumento del área. El área del marcador calculada a la profundidad donde se hallaba el anillo doxil fué de 28 \AA^2 en buen acuerdo con los valores obtenidos por Cadenhead y col [Cadenhead y Müller-Landau, 1976].

Como consecuencia del aumento del área de los AE es esperable que se produzca un incremento en el ángulo de tilt para que las colas alquílicas se aproximen entre ellas. Este efecto es apreciable a la composición de las simulaciones realizadas (1.4 % de moléculas del marcador) y sería más pronunciado a mayores concentraciones.

5.5.3. Tilt Z

Las moléculas de AE en los sistemas AE y AE/AE marcado presentan un tilt colectivo como puede apreciarse en las Gráficos 4.3 y 5. respectivamente, así como es también reflejado por su cálculo a partir del factor de estructura, mostrado en el capítulo 4. Para estudiar esta característica del sistema seguimos el comportamiento del vector C1-C18 de las moléculas de AE, promediado sobre todas las moléculas de AE del sistema, y sobre todo el tiempo de simulación productiva. Caracterizamos el tilt con el ángulo de inclinación promedio (θ ángulo comprendido entre este vector y la normal a la bicapa). También se monitoreó el desvío estándar del ángulo azimutal del vector C1-C18 (ángulo entre la proyección xy de este vector y el eje x) para establecer que este efecto fuera realmente colectivo.

La Tabla 5.3 muestra el ángulo de inclinación promedio para los sistemas AE puro y AE/AE* a distintas T. Se indica además el desvío estándar del ángulo de inclinación y azimutal. El pequeño valor de dispersión del ángulo azimutal indica que la inclinación de las moléculas de AE es global y homogénea, y en este caso la llamaremos “tilt”, para diferenciarla de la inclinación que pudiera darse en forma aleatoria entre las moléculas. El valor de tilt promedio hallado resultó en perfecto acuerdo con el obtenido a partir del factor de estructura a 300 K. Puede apreciarse **un significativo aumento del ángulo de tilt** de las moléculas de AE cuando se introduce el marcador al sistema. Estos resultados muestran que ambos sistemas presentan pequeñas fluctuaciones del ángulo de tilt, que no cambian substancialmente con la T.

Tabla 5.3: ángulo de inclinación promedio (θ), desvío estándar del ángulo de inclinación (σ_θ) and desvío estándar del ángulo azimutal (σ_ϕ) para ácidos esteáricos en el sistema AE puro y AE/AE. Unidades en grados.*

	Sin AE*				Con AE*			
	285K	300K	315K	330K	285K	300K	315K	330K
θ	24.7°	24.0°	23.9°	23°	26°	27°	26°	26°
σ_θ	0.8°	0.9°	0.9°	1°	1°	1°	1°	2°
σ_ϕ	1.5°	1.7°	1.9°	2.3°	1.4°	1.2°	1.6°	2.6°

Para determinar si el tilt era un efecto local o si solo afectaba a las primeras moléculas vecinas al marcador SA*, se calcularon los promedios locales de ángulo de tilt y azimutal para la primera y segunda capa de AE vecinos al AE*. Se observó que estas cantidades se desviaban mucho menos del valor promedio que la diferencia entre los sistemas marcado y sin marcar, por lo que concluimos que el cambio de tilt **es un efecto colectivo** y no una consecuencia de inhomogeneidades locales sobre el promedio.

5.6. Parámetros Dinámicos

5.6.1. Parámetros de Orden de los AE

Dentro de este apartado se analizan aquellos parámetros que se hallan relacionados a propiedades dinámicas del sistema como son los parámetros de orden (S) de los átomos de las cadenas hidrocarbonadas de los AE. Para evitar confusiones, debemos recordar que en este sistema es posible calcular los S de los C de los **AE sin marca** y en forma separada los S de los **AE-marcados**. En este apartado nos concentramos en el comportamiento de los AE sin marca y dejamos para el ítem siguiente el de los AE-marcados.

Usamos el “tensor parámetro de orden” S, para caracterizar el orden direccional de las colas alquílicas de los AE, en las diferentes posiciones de sus átomos de C constituyentes. Si tomamos z como la dirección normal a la bicapa, el elemento diagonal del tensor a lo largo de esta orientación es:

$$S_{zz}(i) = \langle \left[\frac{1}{2} (3 \cos^2(\theta_i) - 1) \right] \rangle$$

donde $\theta(i)$ es el ángulo definido por el vector que une los átomos de C de las posiciones i-1 e i+1 de la cadena y la dirección z. El paréntesis angular

representa el promedio temporal de la cantidad encerrada y eventualmente el promedio sobre todas las especies moleculares. La cantidad a ser promediada toma valor +1 si el eje molecular apunta en la dirección del eje z, y -1/2 si lo hace perpendicular a él. Por otra parte $S_{zz}(i)$ toma el valor 0 para una distribución isotrópica de ejes moleculares locales y este hecho justifica su uso para caracterizar el orden direccional. No obstante, la orientación promedio de los ejes moleculares también afecta el valor del parámetro de orden y debe tenerse en cuenta en el análisis cuando existe una inclinación colectiva (tilt) de las moléculas estudiadas. El Gráfico 5.8 muestra los perfiles $S_{zz}(i)$ a lo largo de la cadena alquílica para los sistemas AE puro y AE/AE* a distintas T. Podemos observar que ambos sistemas y a todas las T estudiadas presentan un perfil de parámetros de orden con un plateau característico que se extiende desde C4 a C15. Los valores constantes de los parámetros de orden en la región recién descrita son consistentes con la naturaleza compacta y ordenada de la fase del sistema. Más allá de estos límites los parámetros de orden disminuyen hacia los grupos cabeza y cola. Lo cual es esperado debido a la mayor movilidad que pueden alcanzar las moléculas en estas zonas. Los perfiles $S_{zz}(i)$ de los sistemas AE puro son afectados levemente por el efecto de la T (círculos llenos), pero se debe destacar que los correspondientes a los sistemas AE/AE* se desplazan en la dirección esperada, mostrando ser más sensible al efecto del aumento de la T.

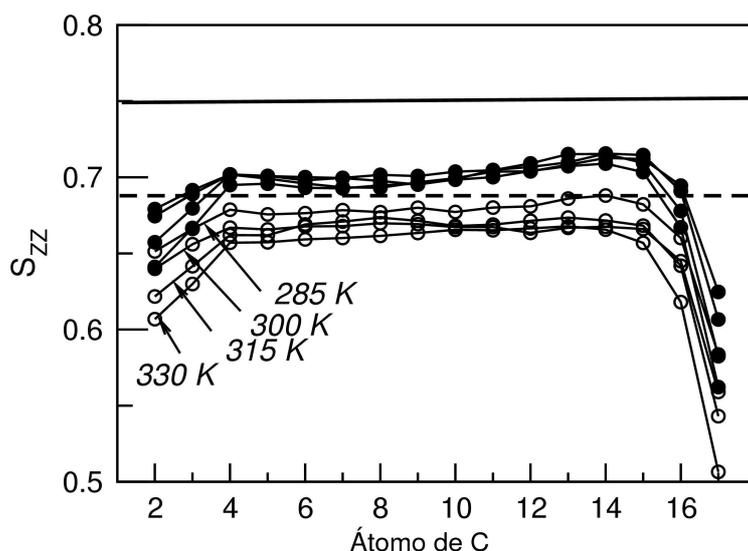


Gráfico 5.8: muestra los valores de $S_{zz}(i)$ calculados para las cadenas alquílicas de los AE como función de la posición de los átomos de C en el sistema AE puro (círculo llenos) y AE/AE* (círculos vacíos). En el texto se describe el significado de las líneas sólida y de trazos mostradas.

Además puede apreciarse que existe un cambio significativo entre los perfiles $S_{zz}(i)$ de los sistemas AE puro y AE/AE*. Nos preguntamos entonces si este cambio estaba relacionado a la variación del ángulo de tilt entre los 2 sistemas o a un incremento en el orden conformacional. Las líneas horizontales del Gráfico 5.8 representan el perfil ideal que tendría una cadena alquílica rígida, con todos sus diedros en conformación trans, que presentara un ángulo de tilt igual al promedio para el sistema AE puro (línea llena) y AE/AE* (línea de trazos). Puede notarse que las diferencias entre ambos perfiles, son más pequeñas que sus respectivos valores ideales, lo cual sugiere que estas diferencias pueden explicarse completamente debido al cambio en el ángulo de tilt.

Esta hipótesis puede confirmarse mediante la diagonalización del tensor promedio $\mathcal{S}(i)$. El promedio del tensor $\mathcal{S}(i)$ sobre todas las moléculas y sobre el tiempo de simulación es un tensor de orden 3 que puede diagonalizarse mediante un conveniente cambio del sistema de referencia. Usando este procedimiento se puede encontrar una dirección principal asociada al mayor autovalor de $\mathcal{S}(i)$. Este eje principal representa la orientación preferida de los vectores C(i+1)-C(i-1), y el mayor valor del parámetro de orden del tensor diagonalizado, $S_M(i)$, representa el parámetro de orden asociado a esta dirección. Los valores de $S_M(i)$ próximos a 1 indican

un sistema altamente ordenado en la dirección del eje principal. Por el contrario valores de $S_M(i)$ próximos a 0, indican que no existe una orientación preferencial de orientación. Este procedimiento elimina la incidencia del ángulo tilt sobre los parámetros de orden. Se pueden extraer conclusiones útiles del análisis combinado de los perfiles $S_{zz}(i)$ y $S_M(i)$. El primero es determinado por la orientación promedio de los ejes moleculares alrededor de la normal a la bicapa y también por otros momentos de la distribución de estas direcciones, particularmente su ancho. Por el contrario, los perfiles $S_M(i)$ son solo dependientes de la dispersión direccional de las cadenas alquílicas. Estas características permiten definir la orientación y el movimiento de las moléculas en un dado sistema.

El Gráfico 5.9 muestra los perfiles de los autovalores máximos del tensor S (S_M) calculados para los AE de los sistemas AE puro y AE/AE*. Como se podía anticipar, estos perfiles se desplazan a valores mayores que los encontrados para $S_{zz}(i)$ como consecuencia del nuevo sistema de referencia empleado. La característica más significativa es que los perfiles para el sistema AE puro (x) y AE/AE* (círculos) son casi coincidentes. Este hecho permite explicar las diferencias encontrada entre los perfiles $S_{zz}(i)$ en ambos sistemas como debido a la diferencia de tilt observada entre ellos; sobre todo ante la evidencia de que prácticamente no había diferencias significativas en las fracciones de ángulos diedros en conformación trans, que pudieran justificar un distinto grado de “desorden” entre los sistemas.

Podemos analizar el comportamiento del tensor S para la cadena alquílica de la molécula marcada en el sistema AE/AE*. Este análisis es particularmente relevante debido a que el comportamiento de los $S_{zz}(i)$ evaluados en la posición donde se une el anillo doxil está directamente relacionado al espectro de resonancia paramagnética electrónica (RPE) de la muestra. En el Gráfico 5.10 se muestran los diferentes perfiles $S_{zz}(i)$ identificados según se detallan en la leyenda del gráfico. La primera característica para señalar es que los perfiles $S_{zz}(i)$ (cuadrados llenos) y $S_M(i)$ (círculos llenos) calculados para el marcador (SA*) son diferentes de los encontrados para las moléculas de AE sin marcar (x). Esto indica que el

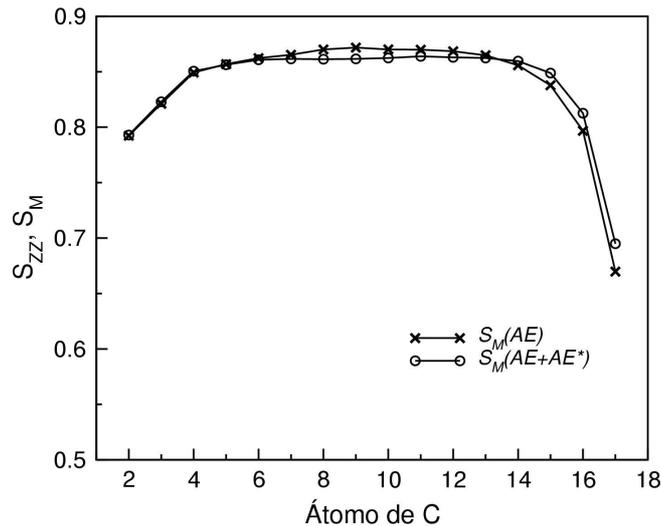


Gráfico 5.9: $S_{ZZ}(i)$ y $S_M(i)$ calculados para los ácidos esteáricos en el sistema AE puro y AE/AE* como una función de la posición de los átomos de C de la cadena alquílica. Por simplicidad solo se incluyen los resultados correspondientes a la simulación realizada a 300 K.

marcador no reproduce los parámetros de orden correspondientes a las moléculas del sistema donde se halla inserto. El mismo comportamiento general se observó también para el resto de las T estudiadas.

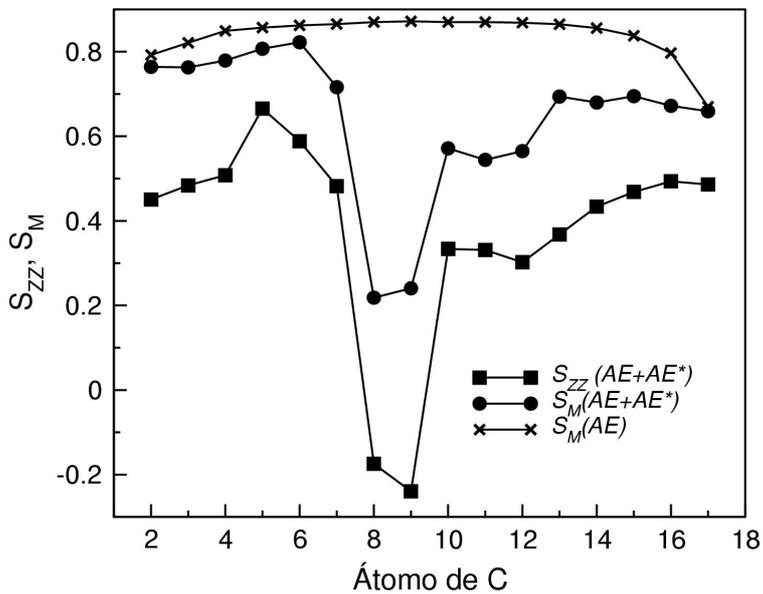


Gráfico 5.10: se muestran los perfiles $S_{ZZ}(i)$ (cuadrados llenos) y $S_M(i)$ (círculos llenos) de AE* calculados para el sistema AE/AE* a 300 K. Se agregó con fines comparativos el perfil $S_M(i)$ del sistema AE puro (x).

Observamos que la forma general de los perfiles $S_{ZZ}(i)$

(cuadrados llenos) y $S_M(i)$ (círculos llenos) presentan rasgos similares, estando el último desplazado a valores mayores debido al cambio local del sistema de referencia. El perfil $S_{zz}(i)$ de la molécula marcada presentó variaciones apreciables en tiempos del orden de 1 ns debido a que el promediado temporal es solo sobre una molécula (AE*) por capa (es decir, no es un valor autopromediado, como lo era para las otras especies moleculares).

En vista de lo detallado más arriba, podemos concluir que los carbonos C8 y C9 de la cadena alquílica de la molécula marcada presentan la mayor dispersión de orientaciones de su eje molecular (menor parámetro de orden, $S_M(i)$). También se observa que el carbono C10, el cual está unido al anillo doxil, presenta una menor movilidad en relación a los 2 anteriores, y similar a los carbonos que se hallan en dirección a la cabeza y al final de la cadena alquílica.

Las variaciones observadas en los $S_{zz}(i)$ nos condujo a preguntarnos si sería posible relacionar los perfiles $S_{zz}(i)$ calculados para un intervalo reducido de tiempo con algún conjunto particular de conformaciones de la molécula marcada. Si fuera este el caso, el perfil $S_{zz}(i)$ calculado como el promedio sobre toda la simulación, podría obtenerse como una superposición de perfiles componentes asociados con diferentes conformaciones moleculares del marcador, con pesos convenientes.

5.6.2. Análisis de Clusters y P.O. del Marcador

El perfil de los P.O. (S) de los átomos de carbono del AE* mostraron como rasgo característico importantes fluctuaciones cuando eran calculados en distintos intervalos de tiempo. Sin embargo, los perfiles de S de AE aislados (no marcados) obtenidos en diferentes intervalos de tiempo fueron muy homogéneos. Esto indica que las fluctuaciones en los S observadas para el AE* no son solo debidas a una falta de promediación por tratarse de una única molécula. Adicionalmente los perfiles de AE* resultaron significativamente distintos de los de las moléculas de AE no marcadas. A partir de estos resultados, nos preguntamos entonces si estas fluctuaciones podían estar asociadas a un conjunto finito de conformaciones posibles de la molécula marcada en la bicapa. Entendiendo por conformaciones distintos

aspectos del plegamiento de la cadena acíclica. Para ello se agruparon las moléculas de 10-doxil-AE, obtenidas de la simulación, en conjuntos que presentaran similitudes estructurales. Para ello se empleó el algoritmo de Daura y col. [Daura y col., 1999], el cual clasifica las estructuras como pertenecientes a un mismo cluster o grupo, cuando las mismas presentan un desvío cuadrático (RMSD) menor a un valor de corte (cutoff) establecido, previo ajuste de las estructuras analizadas.

En el Gráfico 5.11 se muestran los porcentajes de estructuras pertenecientes a los principales clusters (encontrados a lo largo de la serie

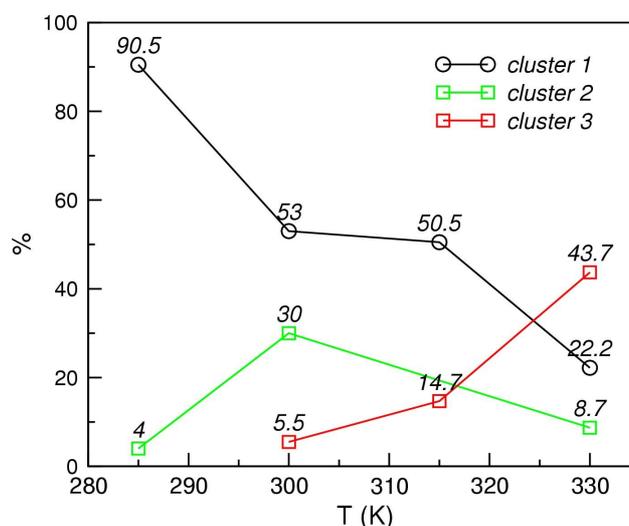


Gráfico 5.11: porcentajes de estructuras pertenecientes a cada uno de los principales clusters encontrados para cada una de las T estudiada. Notar la disminución del número de estructuras del cluster 1 y el aumento de las estructuras en el cluster 2.

temporal) respecto del total de estructuras analizadas, para cada T.

Los clusters mayoritarios fueron aquellos que contaron con el mayor número de estructuras respecto del total analizado (300K) y se denominaron en forma decreciente como, cluster 1, cluster 2 y cluster 3.

Puede observarse en el Gráfico 5.11 que el cluster1 muestra una clara tendencia a disminuir con la T, mientras que el cluster 3 comienza a aumentar en forma significativa a partir de 300 K. El cluster 2, muestra un comportamiento indefinido; comienza con un valor bajo a 285 K (4 %), aumenta en forma importante a 300 K (30 %), disminuye a valores muy bajos a 315 K; para finalmente aumentar a 330 K (9 %). Si analizamos estos resultados teniendo presentes las estructuras que representan estos clusters

(Gráfico 5.12), notaremos que el número de segmentos de cadenas alquílicas con defectos **gauche** (mostrado con líneas de colores) aumenta del cluster 1 (2 **gauche**) al cluster 2 (3 **gauche**) y cluster 3 (3 **gauche**), y esto puede explicarse por el efecto del aumento de T, que hace posible el pasaje de las conformaciones **trans** a **gauche** (de menor a mayor energía potencial). Se puede destacar, desde un punto de vista cualitativo que la combinación de 2 diedros en conformación **gauche** producen el menor desvío de la linealidad de la cadena alquílica (cluster 1, más poblado a todas las T), y de esta manera puede ajustarse mejor dentro de este sistema tan regular y compacta.

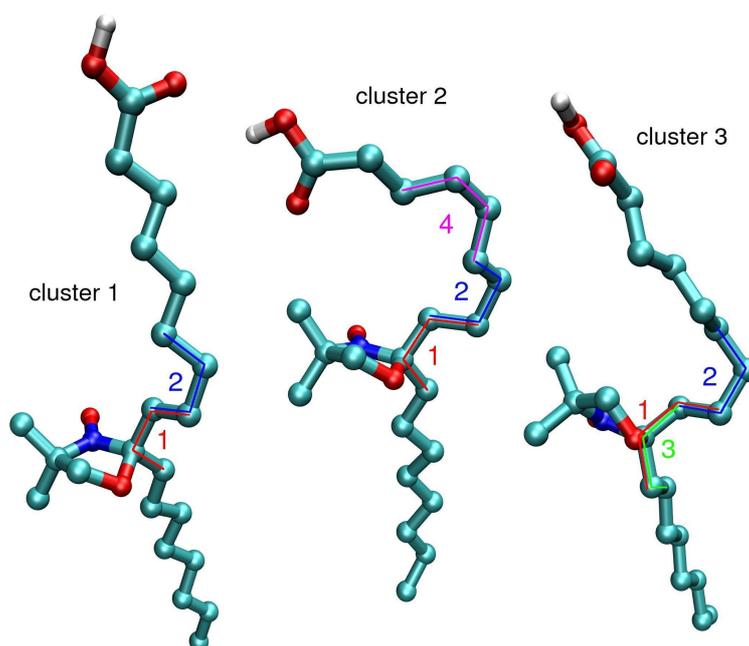


Gráfico 5.12: estructuras moleculares que representan a cada uno de los clusters encontrados. Se resaltó en líneas de distinto color los diedros que se hallaban implicados en los cambios conformacionales más importantes de la molécula. Puede observarse que el cluster 1 posee solo 2 diedros en conformación **gauche**, mientras que los clusters 2 y 3, presentan 3. Notar además que el diedro 1 (en color rojo) y el diedro 2 (en color azul) se hallan presentes en los 3 clusters, siempre en conformación **gauche**. El cluster 2 incorpora el diedro 3 (color verde) por debajo del anillo doxil. Finalmente el cluster 3 introduce el diedro 4 (color magenta), el cual le otorga a la molécula una forma de gancho.

Si observamos el Gráfico 5.13 que muestra la distribución de ángulos encontradas a distintas temperaturas para los 4 diedros que presentaron defectos **gauche** en los clusters, notaremos que los **diedros 1 y 2**, que se hallan presentes en todos ellos, muestran una clara preferencia por la conformación **gauche**, pero que esa tendencia va disminuyendo con la T. Notar que a 285 K, el **diedro 1** permanece a lo largo de la simulación en conformación **gauche** (-), mientras que a las otras T este defecto oscila entre

gauche (+) y **gauche** (-), debido al aumento de la E cinética del sistema. Además puede apreciarse que el diedro 3 (cluster 3) va aumentando su frecuencia desde 300 K a 330K, lo cual se corresponde con el aumento del cluster 3 en el sistema con el aumento de T. Observar que las distribuciones de frecuencia de todos los diedros van disminuyendo con la T lo cual se corresponde con la disminución del número de estructuras que se pueden clasificar dentro de estos 3 clusters (ver Gráfico 5.11). Es decir, la suma de de las estructuras que componen a cada cluster va disminuyendo con el aumento de T. Además, los diedros 1 y 2 a 285 K muestran una clara preferencia por solo una de las conformaciones posibles (+60° o -60°), mientras que a medida aumenta la T se van poblando los 2 mínimos posibles para esta conformación.

De igual manera el diedro característico del cluster 2 (diedro 4), hace su aparición a la T de 300 K, para luego disminuir. El Gráfico 5.14 muestra que el número de transiciones sufridas por cada cluster (hacia o desde un dado cluster) va aumentando con la T. Esto nos indica que los clusters tienden a permanecer menos tiempo en su conformación y por lo tanto, a pasar de uno a otro con mayor rapidez.

Mediante este análisis podemos identificar a qué cluster pertenece cada molécula a lo largo de la simulación, y de esta manera obtener los perfiles de parámetros de orden $S_{zz}^{\alpha}(i)$ asociados a ese cluster, para una dada T. El muestra los perfiles de parámetros de orden $S_{zz}(i)$ para las simulaciones realizadas a 285K, 300K y 330K.

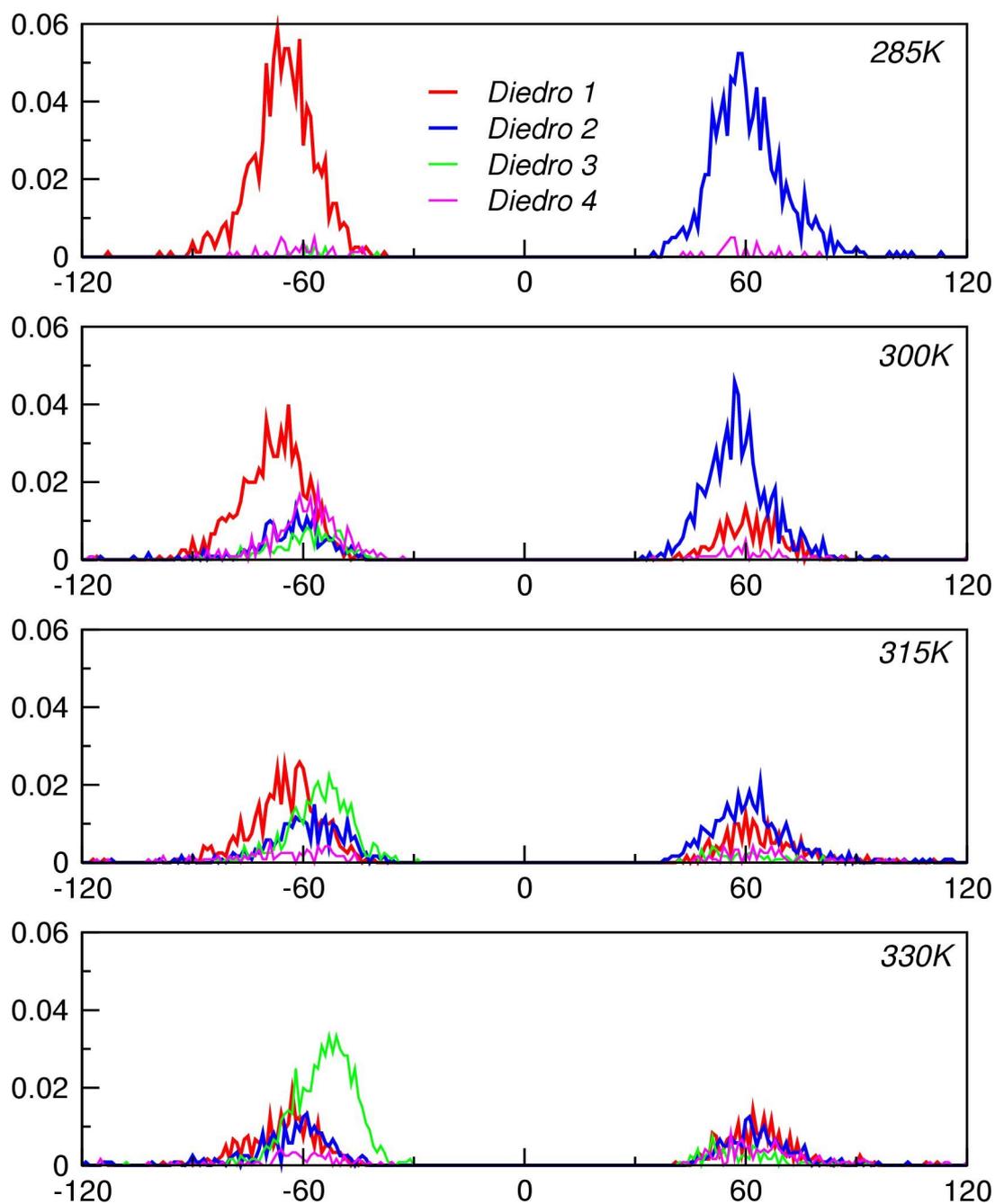


Gráfico 5.13: distribución de frecuencias de ángulos encontradas a distintas temperaturas para los 4 diedros que presentaron defectos **gauche** en los clusters. En color rojo se muestra el diedro 1, en color azul el diedro 2, en color verde el diedro 3 y en color magenta el diedro 4.

En los mismos gráficos se incluyeron también los perfiles componentes $S_{zz}^{\alpha}(i)$ calculados a partir de los tiempos donde se identificó cada cluster, con su correspondiente factor de peso a la temperatura citada. Solo los perfiles componentes que tuvieron una participación mayor a el 25 % fueron incluidos en el gráfico, aunque varios otros componentes contribuyen al perfil total con menor peso, como puede observarse del Gráfico 5.11 (gráfico

de porcentaje de aparición de clusters).

El parámetro de orden $S_{zz}(10)$, que corresponde a la posición donde se une el anillo doxil, disminuye con el aumento de la T (marcado con flechas en el Gráfico 5.15 y también incluidos en la Tabla 5.4). A 300 K, (5.15-B) puede observarse que existe contribución de las conformaciones moleculares correspondientes al cluster 2, que luego desaparecen a mayor T. La conformación molecular de este cluster exhibe una interacción electrostática entre el anillo doxil y la cabeza polar debido a su proximidad espacial. A menor T este componente tiene una participación menor debido a que es más difícil acomodar esta geometría molecular en una estructura compacta. A mayor T, la contribución entrópica domina sobre la interacción electrostática favorable, y la participación de este componente también disminuye.

El -B muestra que la contribución $S_{zz}^{\alpha}(i)$ del cluster 2 (triángulos invertidos) conduce a la disminución de los valores de $S_{zz}(i)$ (círculos llenos) desde el C2 al C4 de la cadena alquílica. Por el contrario, el perfil $S_M(i)$ (círculos llenos) no muestran tal disminución. Si observamos las estructuras moleculares mostradas en el Gráfico 5.12, resulta claro que estas

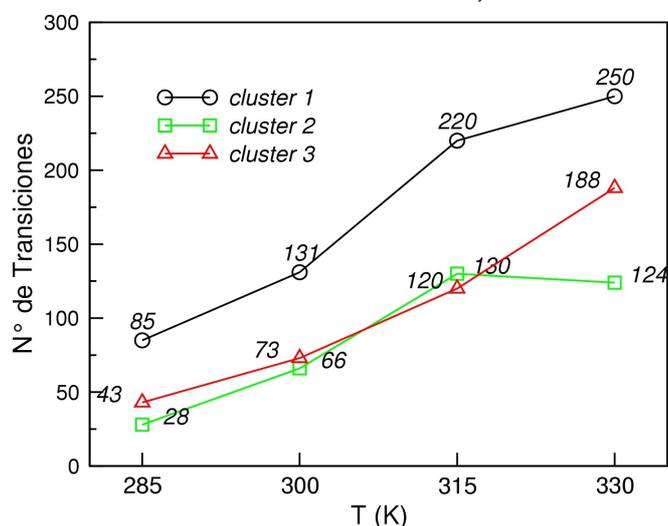


Gráfico 5.14: número de transiciones desde o hacia cada cluster en función de la T de simulación. Las transiciones se cuentan como el número de veces que una estructura llega (se integra al cluster) o sale desde un dado cluster (para pasar a otro). Notar que el número de transiciones siempre aumenta con la T. Esto nos indica que los clusters tienden a permanecer menos tiempo en su conformación y por lo tanto, a pasar de uno a otro con mayor rapidez, facilitado por el aumento de la E cinética promedio del sistema. características de los perfiles se deben principalmente al cambio en la orientación del eje molecular principal en la vecindad de la cabeza polar. No

obstante, existe una ligera disminución de los $S_M(i)$ desde C2 al C4 que puede explicarse como una contribución de desorden orientacional del cluster 2. A diferencia de este resultado, la caída de los $S_{ZZ}(i)$ y $S_M(i)$ en los carbonos C8 y C9, es común a ambos tipos de perfiles, lo cual indica que esta disminución, está directamente relacionada a una dispersión orientacional y no a una reorientación promedio del eje molecular local. El análisis previo de las transiciones **trans-gauche** en estas posiciones también muestran un cambio en la dinámica de la molécula para poder acomodarse a las restricciones impuestas por el sistema. A 315 K la contribución del cluster 3 es relevante (no mostrado) debido a la activación de más defectos **gauche** próximos al anillo doxil.

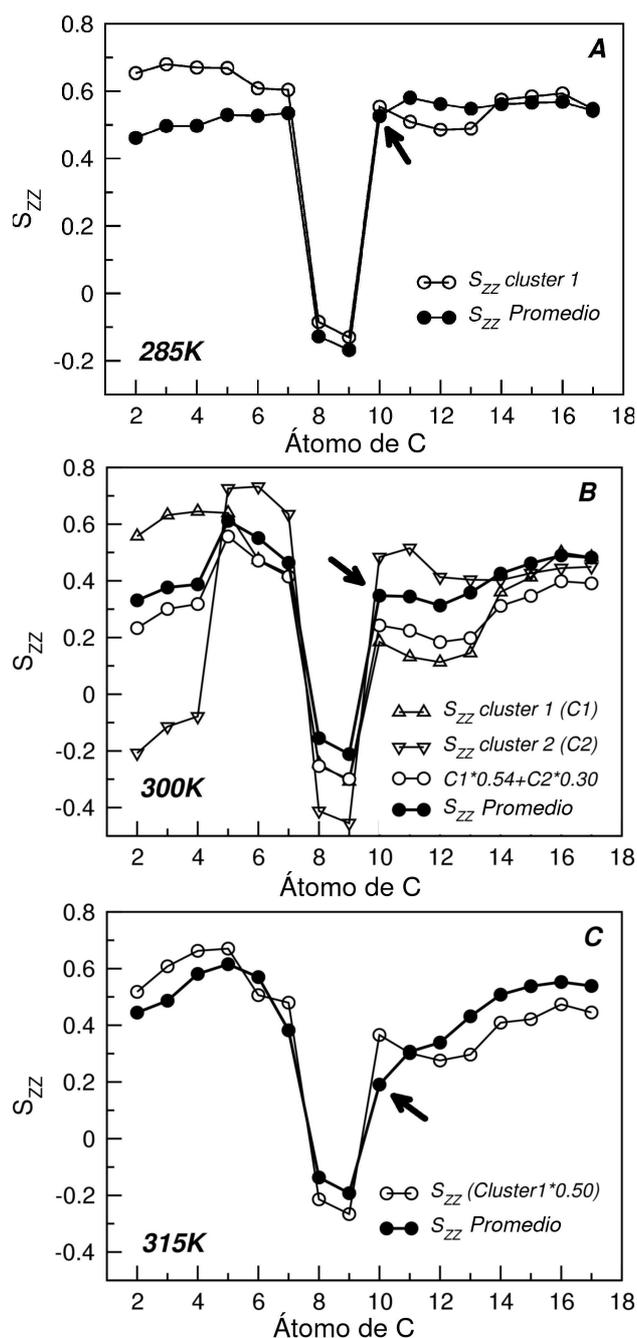


Gráfico 5.15: perfiles $S_{ZZ}(i)$ de las cadenas alquílicas de AE*, calculados para el sistema AE/AE* a 285 K, 300 K y 315 K. Con círculos llenos se muestran los valores de $S_{ZZ}^{\alpha}(i)$ y con triángulos los valores calculados para cada componente mayor α encontrado a 300 K. Los círculos abiertos muestran los valores $S_{ZZ}(i)$ obtenidos por superposición de los componentes mayores con sus respectivos factores de peso.

La Tabla 5.4, resume los valores de $S_{ZZ}(10)$ y $S_M(10)$ para la posición del carbono C10 de las moléculas no marcadas (AE) y marcadas (AE*). Puede observarse que los valores encontrados para las moléculas de AE, tanto en la fase “simil gel” de los sistemas AE puro y AE/AE* no presentan dependencia con la T. Sin embargo los valores de $S_{ZZ}(10)$ y $S_M(10)$ de las

moléculas AE* muestran una significativa disminución con la T, en los mismos sistemas. La mayor dependencia con la T que muestran los valores de $S_{zz}(10)$ respecto a los de $S_M(10)$ indican que existe un cambio en la distribución de orientaciones de los ejes moleculares $C_{i+1} - C_{i-1}$, así como también en su dispersión. Estos ejes moleculares se orientarían con mayores ángulos de inclinación respecto a la normal a la bicapa, a mayor T. De igual modo, la dispersión de estos ángulos también aumenta con la T, como puede deducirse de los cambios observados en los valores de $S_{zz}(10)$. Se puede concluir de estos resultados que los valores de $S_{zz}(10)$ y $S_M(10)$ de la molécula marcada son muy sensibles a los cambios de T, pero no siguen los cambios en los parámetros de orden de las moléculas de AE, al menos en la fase “símil gel”.

Tabla 5.4: valores de $S_{zz}(10)$ y $S_M(10)$ de las moléculas de AE y AE* en los sistemas AE puro y AE/AE* a las T estudiadas (285K, 300K y 315K).

		Temperatura		
		285 K	300 K	315 K
Sistema AE puro	$S_{z,z}(10)$ de SA	0.67	0.66	0.66
	$S_M(10)$ de SA	0.85	0.85	0.85
y	τ^A of SA en el sistema A	22 ps	16 ps	14 ps
	τ^A of SA en el sistema A*	22 ps	15 ps	12 ps
AE/AE*	$S_{z,z}(10)$ de SA*	0.58	0.36	0.19
	$S_M(10)$ de SA*	0.76	0.47	0.39

5.6.3. Funciones de Autocorrelación angular

El movimiento de las cadenas alquílicas de los AE marcados y sin marcar pueden caracterizarse siguiendo las funciones de autocorrelación angular de vectores apropiados. Para las moléculas no marcadas (AE) se definió un vector $\mathbf{n}(t)$ apuntando en la dirección C_{i+1} a C_{i-1} , y el vector $\mathbf{p}(t)$ apuntando en la dirección normal al plano definido por las posiciones C_{i+1}, C_i y C_{i-1} .

Para las moléculas marcadas se definió un vector normal al anillo doxil $\mathbf{n}_D(t)$, y otro paralelo a este plano $\mathbf{p}_D(t)$. Usaremos la función de autocorrelación $\langle \mathbf{n}(t) \cdot \mathbf{n}(t+t) \rangle$ caracteriza el movimiento de tambaleo o “wobbling” de los ejes moleculares largos de los AE, alrededor de su posición

promedio y la función $\langle \mathbf{n}_D(t') \cdot \mathbf{n}_D(t'+t) \rangle$ para caracterizar el movimiento de tambaleo de la normal al anillo doxil respecto a su posición promedio. Llamaremos a estas funciones “funciones de autocorrelación de wobbling” (F_C^W).

Por otra parte definimos las funciones $\langle \mathbf{p}(t') \cdot \mathbf{p}(t'+t) \rangle$ y $\langle \mathbf{p}_D(t') \cdot \mathbf{p}_D(t'+t) \rangle$ para caracterizar el movimiento de rotación de los grupos respectivos alrededor de los ejes largos de las moléculas de AE y AE*, respectivamente. Las llamaremos “funciones de correlación axial” (F_C^A). En el sistema marcado AE/AE*, las funciones de autocorrelación de las moléculas de AE (no marcadas), se calcularon realizando el promedio temporal sobre todas las moléculas.

El Gráfico 5.16 muestra las funciones de autocorrelación de los ácidos esteáricos marcados (AE*) y sin marcar (AE). Las funciones de autocorrelación de los AE no marcados se calcularon empleando las definiciones antes descritas aplicadas a la posición del carbono C10. Las funciones de autocorrelación de wobbling (F_C^W) muestran un típico comportamiento de una fase gel, donde el tambaleo de los ejes moleculares largos está inhibido por la estructura compacta de la bicapa. Por otra parte las funciones de autocorrelación axial (F_C^A) presentan características muy diferentes a las encontradas en los sistemas de fosfolípidos en fase gel. En este sistema las moléculas de AE son capaces de rotar libremente sobre su eje principal debido al pequeño volumen de sus cabezas [Hautman y Klein, 1990] (cita 41). Las funciones de autocorrelación de las cadenas alquílicas presentan tiempos de correlación muy cortos como se muestran en la Tabla 5.4. Puede observarse que los tiempos de correlación axial disminuyen con el aumento de T. Esta tendencia se observa tanto en las bicapas marcadas (sistema AE/AE*) y no marcadas (sistema (AE puro)). Los tiempos de correlación en las bicapas marcadas son ligeramente más bajos que sus contrapartes no marcadas debido a la mayor área por lípido disponible en este sistema, como ya fue mencionado. Aunque los valores de $S_{zz}(10)$ de la molécula marcada no sigue a los de las moléculas no marcadas, ellos muestran ser muy sensibles a los cambios de los tiempos de correlación axial de los AE (no marcados). Podemos concluir entonces que los $S_{zz}(10)$ de los

AE* y los espectros de RPE relacionados a ellos, sensarían los tiempos de correlación axial de las moléculas lipídicas no marcadas, en fase gel.

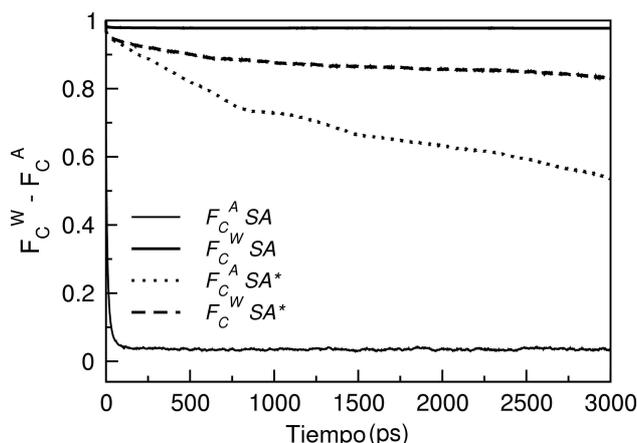


Gráfico 5.16: funciones de autocorrelación axial y de wobbling para AE y AE* en el sistema AE/AE* a 300K.

A partir de la primer parte de las funciones de autocorrelación de wobbling de los AE* y asumiendo un decaimiento exponencial, se puede estimar un tiempo de correlación $\tau_D^W \sim 37ns$ a 300K. Para este caso el movimiento de wobbling del anillo doxil está solo restringido parcialmente por el orden global de la bicapa. Los tiempos de correlación axial del anillo doxil son muy sensibles a los de los AE no marcados, resultando en un $\tau_D^A \sim 8ns$ a 300K. Ambos tiempos de correlación disminuyen con el aumento de la T. Estos hechos son razonables si tenemos presente que el grupo doxil en un entorno compacto y muy regular, de moléculas lineales (como los es el sistema A*) tiene posibilidades de rotar sobre un eje imaginario sobre el plano del anillo (tambalearse) debido al espacio generado por su misma presencia. Pero a su vez su rotación axial se ve impedida por los contactos con los AE vecinos. Los últimos valores son solo aproximados debido a que los tiempos de simulación no son suficientemente largos para permitir su determinación precisa.

5.7. Análisis de los Perfiles de Densidad

Los perfiles de densidad se calcularon dividiendo la caja de simulación en 50 capas de igual espesor en la dirección Z y calculando el número de átomos promedio en cada una de ellas, a lo largo de la simulación. Este análisis permite observar la ubicación de los diferentes átomos del marcador 10-doxil-AE en relación a átomos de otras moléculas, como por

ejemplo los AE, o bien entre sí.

El Gráfico 5.17-A, muestra con fines ilustrativos, una imagen de la bicapa orientada según los cortes realizados para el análisis de densidades de átomos. El Gráfico 5.17-B muestra la densidad de átomos totales (NO pertenecientes al agua) encontrados a diferente profundidad de la bicapa. En color verde se muestra el perfil obtenido para la simulación realizada a 300 K con el marcador (AE/AE*) y en color negro (para comparación) el perfil obtenido para la simulación realizada en el sistema AE puro, a la misma T.

Puede notarse la gran similitud entre ambos perfiles, lo cual se repitió a las otras T estudiadas; con una ligera tendencia a expandirse en la dirección Z de la caja, con el agregado del marcador. Esto indica que en las condiciones de presión simuladas, la T no afecta significativamente al sistema. Recordemos que las T de simulación ensayadas estuvieron por debajo del punto de fusión de AE (70°C), por lo que es razonable que no se observara un cambio marcado en la densidad del sistema. Los perfiles observados pueden describirse:

- Zona I, la densidad de átomos crece rápidamente correspondiente a la aparición de las “cabezas hidrofílicas” de ambas monocapas (1 nm) y (6 nm) respectivamente. Este aumento alcanza un máximo, debido a la geometría particular de la “cabeza” hidrofílica de los AE (O-C-O en hibridización sp^2) que permite ubicar los O de una misma cadena a la misma profundidad de la bicapa (un mismo intervalo de profundidad).
- Zona II, tipo meseta, correspondiente a los átomos ubicados por debajo de la “cabeza hidrofílica” hasta el inicio de la interface con la otra monocapa.

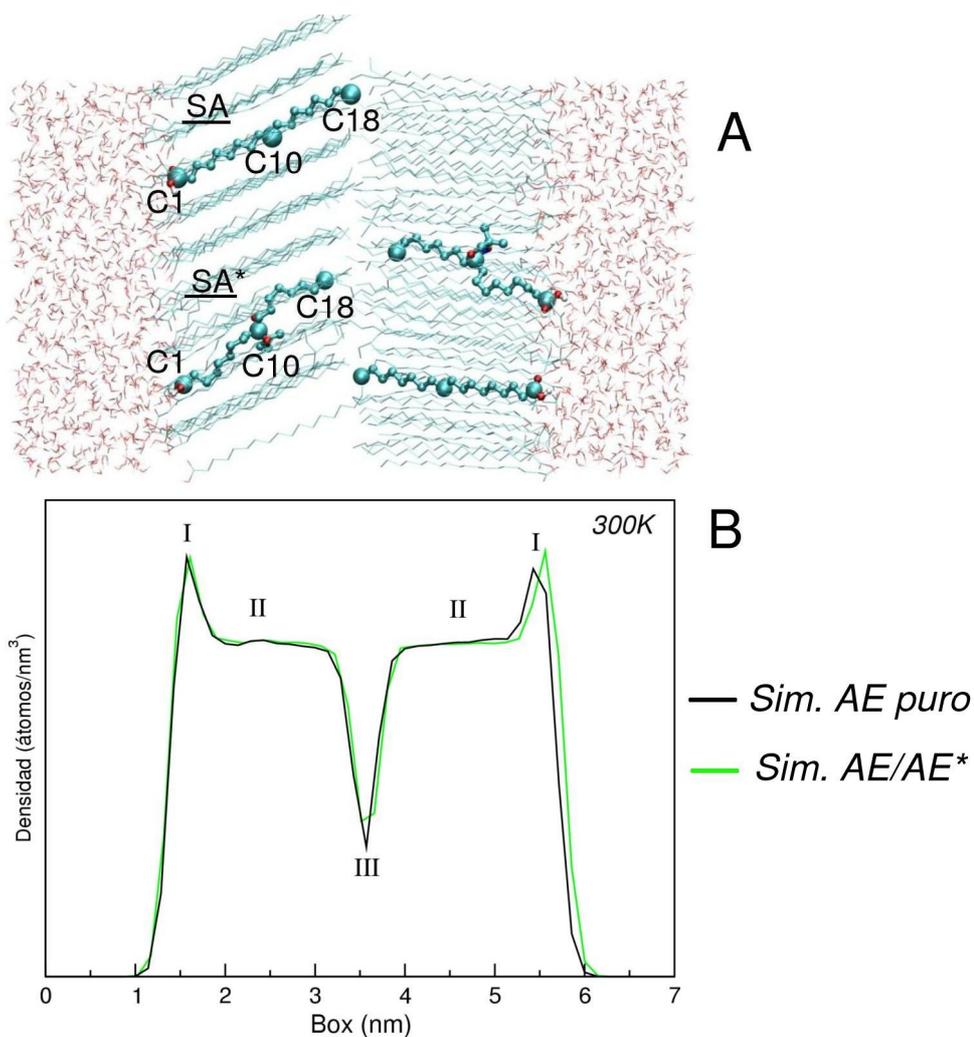


Gráfico 5.17: el gráfico-A, muestra con fines ilustrativos, una imagen de la bicapa orientada según los cortes realizados para el análisis de densidades de átomos. El Gráfico 5.18-B muestra la densidad de átomos **totales** (NO pertenecientes al agua) encontrados a diferente profundidad de la bicapa (200 cortes). En color verde se muestra el perfil obtenido para la simulación realizada a 300 K con el marcador (AE/AE*) y en color negro (para comparación) el perfil obtenido para la simulación realizada en el sistema AE puro, a la misma T. Puede notarse la semejanza entre ambos perfiles, lo cual se repitió a las otras T estudiadas; con una ligera tendencia a expandirse en la dirección Z de la caja, con el agregado del marcador.

- Zona III, se observa una franca disminución de la densidad de átomos y corresponde a la zona donde se encuentran las “colas hidrofóbicas” de los AE de ambas monocapas (interface entre las 2 monocapas). Esto indica que NO existe interdigitación de la colas hidrofóbicas.

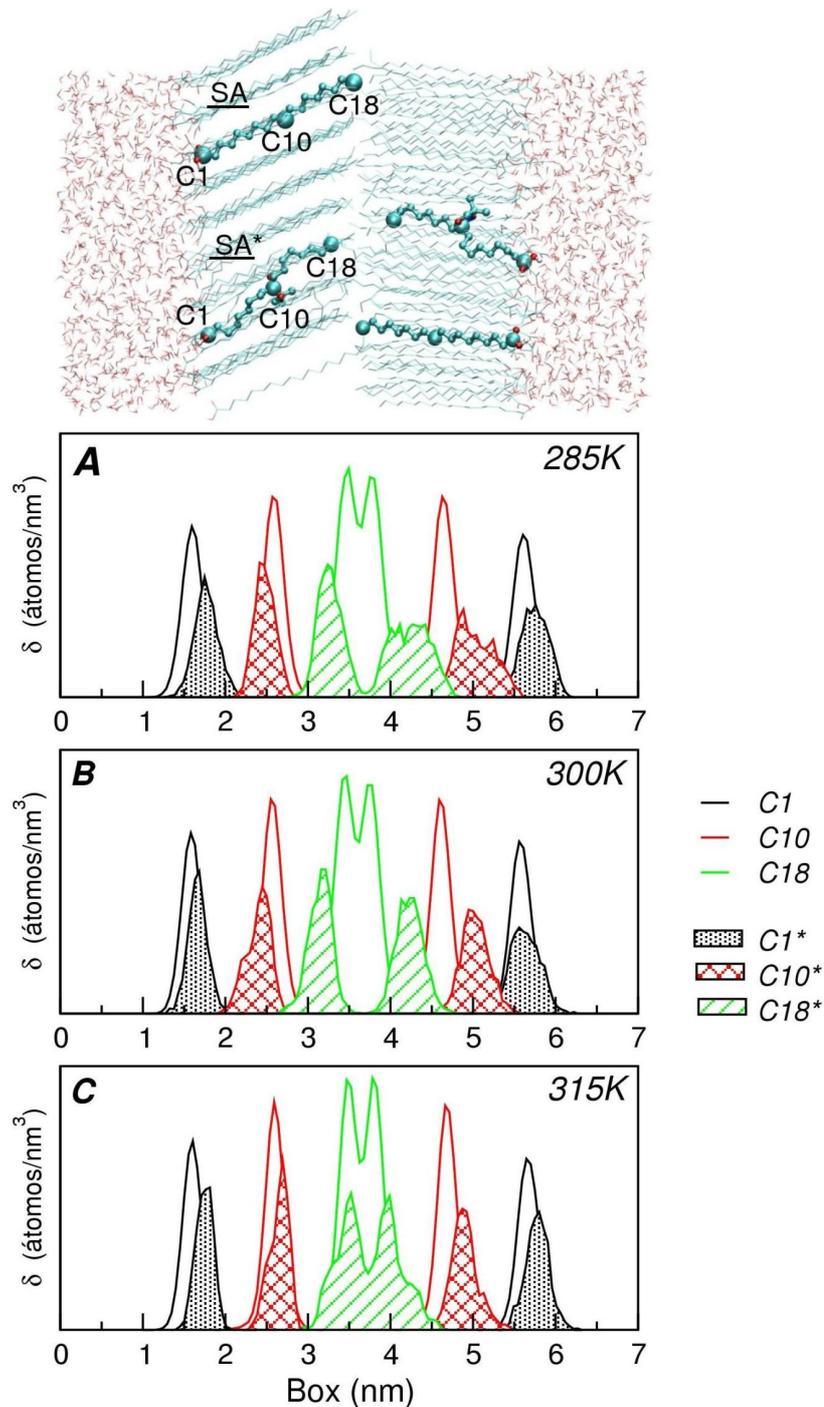


Gráfico 5.18: muestran los perfiles de densidad de los átomos de C (C1, C10, C18) de AE (picos no rellenos) y de los átomos de C (C1*, C10*, C18*) de 10-doxil-AE (picos rellenos). Dado la baja relación de 10-doxil-AE/AE (1/69), se escaló la densidad promedio del 10-doxil-AE por un factor de 50, de manera tal que, las densidades fueran menores en altura que los picos de densidad del AE y que pudieran observarse claramente.

Los Gráfico 5.18 A, B y C, muestran los perfiles de densidad de los átomos de C (C1, C10, C18) de AE (picos no rellenos) y de los átomos de C (C1*, C10*, C18*) de 10-doxil-AE (picos rellenos), para facilitar la ubicación de la “cabeza hidrofílica” de la molécula (C1 o C1*), la zona del carbono donde

se inserta el anillo doxil (C10, C10*) y la “cola hidrofóbica” de la molécula (C18, C18*).

Estos perfiles permiten conocer la ubicación de los átomos del marcador (10-doxil-AE) en relación con los mismos átomos del AE dentro de la bicapa, por lo que la descripción se realizará sobre la base de ésta comparación:

La presencia de 2 o más defectos gauche en la cadena alquílica de la molécula marcada, hace que las distancias C1*-C18*, C1*-C10* sean menores que para los AE no marcados. Estas distancias dependen de las configuraciones de diedros presentes (ver análisis estadístico de clusters,). De acuerdo a los clusters que predominen en el espacio conformacional de cada molécula marcada, cada una de ellas acomodará sus átomos de C respecto de las moléculas no marcadas de AE vecinas.

En general puede observarse que los átomos C18* de la molécula marcada están a menor profundidad que los correspondientes átomos de los AE no marcados. En la mayoría de los casos, el C10* (el cual corresponde al punto de unión del anillo doxil con la cadena hidrocarbonada), se halla también a menor profundidad que sus homólogos de las moléculas marcadas. Estas características se vuelven menos acentuadas al aumentar la T.

En general puede decirse que los átomos de C* presentan un perfil de densidad más ancho y más irregular que cualquiera de los AE de la bicapa, debido a los cambios conformacionales de la molécula marcada (a esa T, P_z y γ).

5.8. Espectros de RPE calculados a partir de la DM

Se calcularon los espectros de RPE a partir de la distribución estática de los ángulos Θ y Φ que forma el vector normal al anillo doxil, respecto al campo magnético, según el formalismo descrito en el capítulo 3. En el Gráfico 5.19 se muestra en líneas de nivel la densidad de probabilidad del vector normal al anillo doxil, en función de los ángulos Θ , Φ para cada T.

Para mayor simplicidad solo se muestra la distribución de probabilidad del vector normal al anillo en una de las monocapas. Notar que el vector seleccionado está orientada en sentido contrario al eje Z de la bicapa, de allí que tome valores superiores a 90°. Puede observarse que la orientación del vector normal tiende a ir inclinándose respecto al eje Z de la bicapa a medida que la T aumenta ($\bar{\theta}$), con un aumento de la dispersión.

Notar que el ángulo Φ si bien presenta una dispersión siempre mayor al del ángulo θ , no alcanza en el tiempo de la simulación a realizar una rotación completa sobre su eje, ya que de haber sido así, Φ debería ser un diagrama de contorno alargado, que tomara todos sus posibles valores.

Resulta claro de estas distribuciones de densidad de probabilidad del vector normal al anillo, que el marcador tiene un movimiento restringido por la gran regularidad del sistema en estudio.

Los parámetros empleado en el cálculo para las componentes del tensor g y T fueron los descriptos para el marcador 12 doxil en el trabajo de Risse y col [Risse y col., 1998b], por ser éste el más próximo al empleado en la simulación (10 doxil):

$$g_{xx}=2.0089 \quad g_{yy}=2.0063 \quad g_{zz}=2.0027$$

$$A_{xx}=6.1 \text{ G} \quad A_{yy}=5.6 \text{ G} \quad A_{zz}=32.7 \text{ G}$$

Los parámetros empleados para describir el ensanchamiento de las líneas espectrales fueron, empleando las ecuaciones descriptas en el capítulo 3:

$$\Gamma_L=2.0 \quad \Gamma_{L\theta}=0.6 \quad \Gamma_{L\Phi}=0.2$$

$$\Gamma_G=2.0$$

La función de correlación $F_C(\tau)$ estimada independientemente para el movimiento de rotación axial (rotación alrededor del eje principal) y para el movimiento de tambaleo (precesión sobre el eje principal), como ya se describió más arriba. Para la $F_C(\tau)$ axial la estimación se realizó ajustando

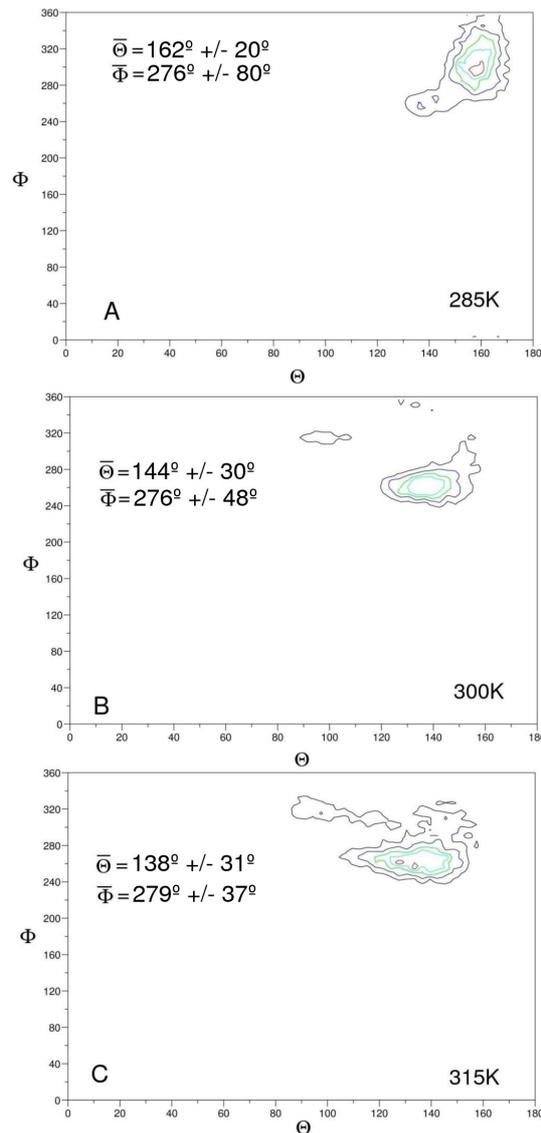


Gráfico 5.19: densidad de probabilidad del vector normal al anillo doxil, en función de los ángulos Θ , Φ para cada T . Para mayor simplicidad solo se muestra la distribución de probabilidad del vector normal al anillo en una de las monocapas. Notar que el vector seleccionado está orientada en sentido contrario al eje Z de la bicapa, de allí que tome valores superiores a 90° . Puede observarse que la orientación del vector normal tiende a ir inclinándose respecto al eje Z de la bicapa a medida que la T aumenta (disminución $\bar{\Theta}$), con un aumento de la dispersión.

una función bi-exponencial a la función de autocorrelación del vector **paralelo** al anillo doxil (Gráfico 5.20) extraído de la DM. Y la $F_c(\tau)$ de tambaleo, se estimó ajustando una función bi-exponencial a la función de autocorrelación del vector **normal** al anillo doxil (Gráfico 5.20).

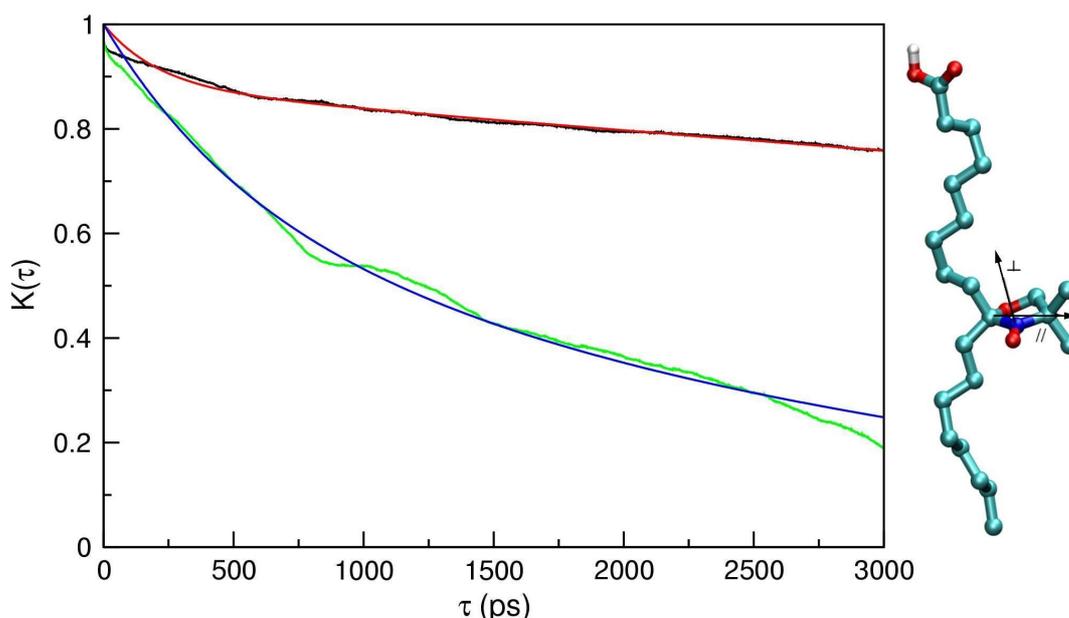


Gráfico 5.20: muestra en líneas de color negro y verde las funciones de autocorrelación de los vectores perpendicular y paralelo al anillo (mostrados sobre la molécula de AE* a la derecha del gráfico) calculadas de la DM. En color rojo y azul se muestran las funciones bi-exponenciales ajustadas a las 2 anteriores y utilizadas para describir matemáticamente el movimiento de tambaleo (vector perpendicular) y de rotación axial (paralelo) respectivamente. Para mayor simplicidad del gráfico solo se muestra los resultados de los ajustes para la simulación a 300K.

En la Tabla 5.5 se muestran los parámetros obtenidos en el ajuste, para cada temperatura.

Tabla 5.5: Ajuste de una función bi-exponencial a las funciones de correlación de los vectores normales y paralelos al anillo obtenidos de la DM

$$F_C(\tau) = (1 - a_0) \cdot 10^{(-\tau/\tau_{C1})} + a_0 \cdot 10^{(-\tau/\tau_{C2})}$$

	a_0		$\tau_{C1}(ps)$		$\tau_{C2}(ps)$		χ^2	
	T	RA	T	RA	T	RA	T	RA
285K	0.952	0.954	23	24	74398	46835	0.00	0.04
300K	0.881	0.670	210	538	20115	3017	0.13	0.93
315K	0.882	0.774	86	1086	16382	1093	0.38	21.9

T: Tambaleo RA: Rotación Axial

En la tabla superior en negritas se muestran los parámetros de la exponencial que tiene más peso en el cálculo de $F_C(\tau)$ (tiempos largos). Notar que las exponenciales decaen más lentamente a medida que la T disminuye, esto se debe a la disminución de E cinética del sistema.

Recordemos antes de analizar la Tabla 5.5, que estas funciones

se utilizarán posteriormente para estimar el grado de promediación por movimiento que tendrán los tensores g y A . Para ello se calculan los valores que toman estas funciones al tiempo τ_{RPE} , el cual depende de la amplitud de la distribución. Por ejemplo, los valores extremos que toma τ_{RPE} (dependiendo de la orientación de la muestra) para un cono de distribución de 30° van de 90 a 100 ns. Esto implica que estas funciones se extrapolan a tiempos muy largos, en relación al tiempo en que fueron calculadas, por lo que se puede anticipar que el error que se comete al hacer esta aproximación es alto. En virtud de esta interpretación, podemos analizar los movimientos del marcador teniendo en cuenta la parte de las exponenciales que dominan a tiempos largos (marcados en negritas en la Tabla 5.5).

Notar que las exponenciales decaen más lentamente a medida que la T disminuye. Esto se podría justificar si pensamos que la disminución de la E cinética del sistema, disminuye la movilidad de todas las moléculas de la bicapa, incluido el marcador. Además el efecto se da tanto para el movimiento de tambaleo, como para el de rotación axial.

En este punto nos detenemos para realizar una comparación, directamente relacionada con el objetivo de la tesis. ¿ Es el comportamiento dinámico de un AE cualquiera del sistema AE puro, similar al indicado por el marcador en el sistema AE/AE* ?. Para ello se seleccionó un AE al azar del sistema AE puro (AE 15) y se le calcularon las funciones de correlación de tambaleo o wobbling F_c^W , a partir de la evolución temporal del vector definido por los átomos C9-C11 y la función de correlación rotación axial F_c^A a partir del vector perpendicular al anterior. La dinámica de estos vectores representa el tipo de movimiento efectuado por una molécula del sistema al mismo nivel de profundidad que lo haría el marcador.

El Gráfico 5.21 muestra las F_c^A y F_c^W de la molécula AE 15 calculadas para un período de 2 ns de la simulación y se agregó para su comparación las correspondientes al marcador a la misma T . Podemos apreciar que la F_c^W calculada para el AE15 (línea roja) decae mucho más lentamente que la correspondiente al marcador (línea negra). Este resultado

indica que el empaquetamiento compacto de los AE del sistema hacen que sus movimientos de tambaleo se vean severamente restringidos. Por otra las moléculas de AE (lineales) que rodean al anillo doxil del marcador no logran cubrirlo completamente por encima y por debajo, dejándole espacio para realizar movimientos de tambaleos más pronunciados que los propios.

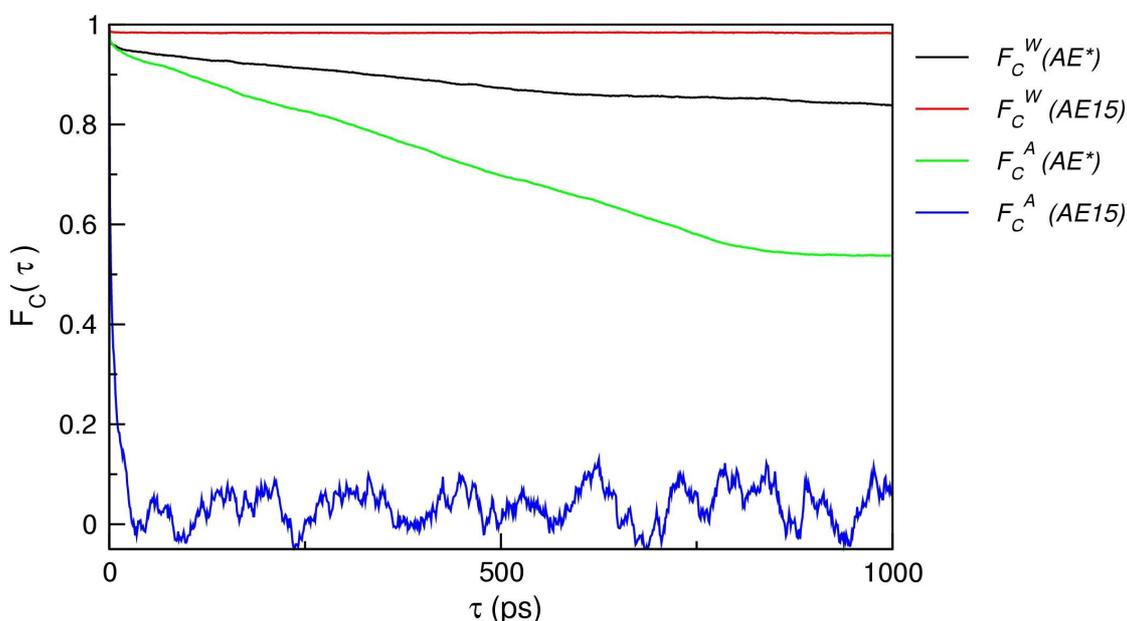


Gráfico 5.21: se muestra las F_C^A y F_C^W de la molécula AE 15 calculadas para un período de 2 ns de la simulación y se agregó para su comparación las correspondientes al marcador a la misma T. Puede apreciarse que la F_C^W calculada para el AE15 decae muy lentamente (línea roja). Este resultado indica que el empaquetamiento apretado de los AE del sistema hacen que sus movimientos de tambaleo se vean severamente restringidos. Si comparamos la F_C^W del AE 15 con la del vector normal al anillo (línea negra) notaremos que pierde correlación más lentamente que éste.

Por el contrario la F_C^A de los AE no marcados (línea azul) decae mucho más rápido que la del marcador (línea verde). Esto se puede racionalizar si tenemos en cuenta que las moléculas de AE al ser lineales, pueden rotar con cierta libertad, como ya ha sido descrito [Hautman y Klein, 1990] y por lo tanto su función de autocorrelación axial decaerá a cero muy rápidamente. En cambio el grupo doxil inserto en una molécula lineal de AE dentro de este sistema muy compacto tendrá dificultad en realizar movimientos de rotación, por lo que su F_C^A decaerá más lentamente que la correspondiente a los AE.

En el Gráfico 5.22 se muestran los espectros de RPE, obtenidos a partir de las orientaciones del vector normal al anillo doxil y de las funciones

de autocorrelación de tambaleo y rotación axial, antes descritas, para cada temperatura. Puede decirse en forma general que los 3 espectros son de tipo “polvo”, mostrando características más marcadas el espectro a 285 K. Los espectros a 300K y 315K muestran una serie de oscilaciones en el tercer pico, probablemente relacionadas a la naturaleza discreta de la distribución de orientaciones utilizadas.

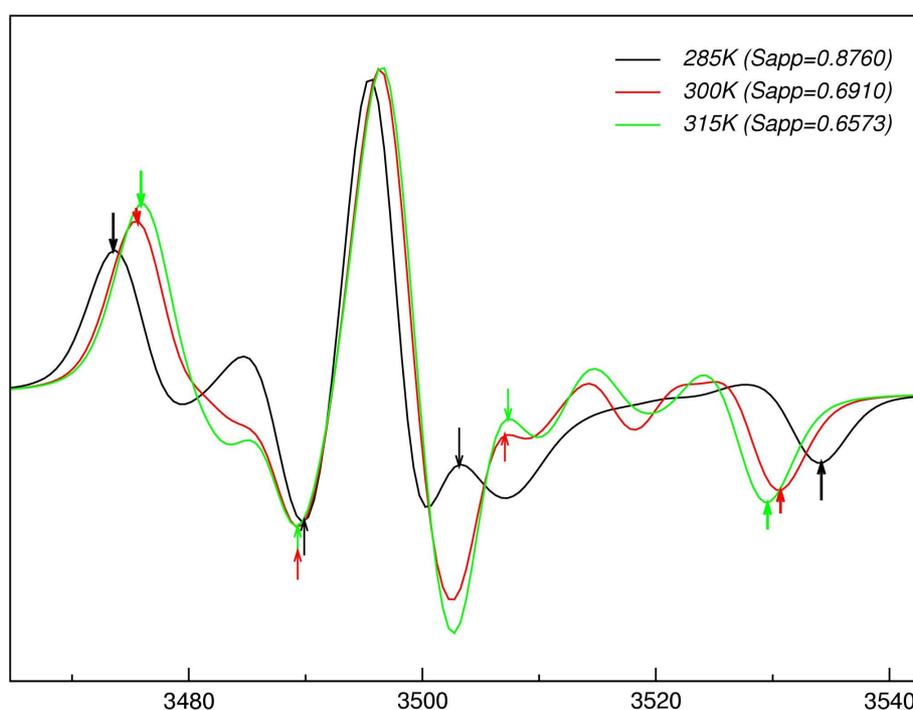


Gráfico 5.22: espectros de RPE calculados a partir de las distribuciones estáticas de los ángulos θ y ϕ del vector normal anillo, para cada temperatura. En el gráfico se señala con flechas los picos utilizados en la estimación del parámetro de orden aparente (S_{app}) de cada espectro. Las flechas gruesas muestran los picos utilizados en la obtención de $2 \cdot A_{máx}$ y con flechas finas los picos utilizados en la obtención de $2 \cdot A_{mín}$.

Los S_{app} obtenidos de los espectros, muestran una tendencia a ir disminuyendo con la T, lo que indica un aumento del desorden del anillo doxil con la T.

Si comparamos los valores de S_{app} obtenidos de estos espectros, notaremos que existe una clara correspondencia entre los valores de S_M y S_{app} , siendo los primeros más elevados.

Esta diferencia podría explicarse si pensamos que el S_{app} , contiene un factor de promediación por movimientos que se haya ausente en el

S_M , obtenido directamente de la simulación.

Con el objetivo de comparar el espectro obtenido del AE* con el espectro hipotético de un AE sin marca (obtenido del sistema AE puro) se calculó el espectro de RPE a partir de las F_C obtenidas para el AE 15, y de la distribución orientacional de sus vectores C9-C11 (definido por los átomos

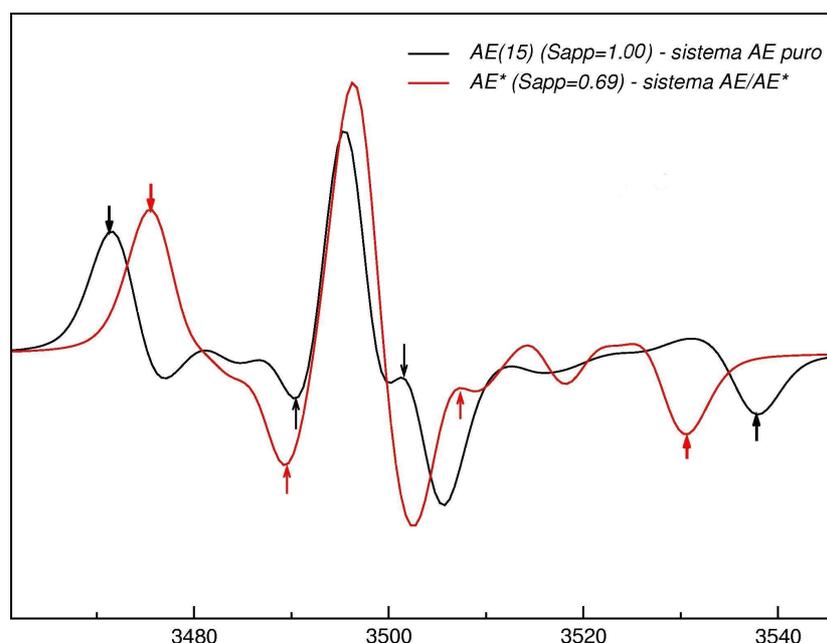


Gráfico 5.23: espectros de RPE obtenidos para un AE sin marca (vector C9-C11// línea negra entera) y el de AE* (vector normal al anillo doxil // línea de trazos negra). Puede apreciarse que ambos espectros son de tipo “polvo”, mostrando que ambos sistemas son muy ordenados. Pero el S_{app} obtenido del AE* (0.69) es marcadamente menor al del AE 15 (1.00), lo cual indica que el marcador está más “desordenado” que el AE 15. Esto puede deberse a las restricciones estéricas que presenta el marcador para acomodar el anillo doxil en un sistema muy empaquetado.

C9-C11). El Gráfico 5.23, muestra el espectro de RPE obtenido del AE 15 (AE puro a 300 K) y el espectro de RPE del sistema AE/AE*, obtenido a partir del comportamiento del vector normal al anillo doxil.

Puede apreciarse que ambos espectros son de tipo “polvo”, lo cual indica que los AE del sistema (representados por el AE 15), así como el AE marcado presentan grandes restricciones al movimiento. Pero el espectro del AE 15 muestra un valor de $2A_{máx}$ mayor y $2A_{mín}$ menor que el del AE marcado, por lo que su S_{app} es marcadamente mayor (1.00). Este valor de S_{app} es compatible con el estado “gel” que se está simulando para el AE (AE por debajo de su punto de fusión). Por otra parte el S_{app} obtenido para el AE*

(0.69) indica que el marcador no puede alcanzar el grado de orden del sistema AE. Tal vez la imagen que refleja este comportamiento es la del anillo doxil realizando permanentes cambios orientacionales en la búsqueda de acomodarse en un espacio muy estrecho.

5.8.1. Comparación con Espectros Experimentales

En este apartado se realizará la comparación de los espectros de EPR obtenidos en forma teórica a partir de las simulaciones del marcador en las bicapas modelo de AE, con los espectros obtenidos de 3 sistemas modelos experimentales: monocapas de Langmuir de AE, marcadas con AE marcado (C5, C12, C16), Multicapas de Fosfolípidos marcadas con 12-doxil-AE y Multicapas de Dipalmitoil-Fosfatidilcolina (DPPC).

5.8.2. Monocapas de Langmuir de AE

Las monocapas de Langmuir de AE/ AlO_3 marcadas con 5, 12 y 16 doxil-AE han sido estudiadas por NEXAFS (Near Edge X Ray absorption Fine Structure) y RPE [Risse y col. 1998a][Risse y col., 1998b]. El Gráfico 5.24 (en líneas y círculos) muestra los espectros obtenidos para 2 orientaciones: 0° (Gráfico 5.24-A) y 60° (Gráfico 5.24-B) de una muestra marcada con 5-doxil-AE. Las orientaciones de la muestra se definieron a través del ángulo entre la normal a la muestra y el campo magnético externo.

Puede notarse que no se observan diferencias significativas entre ambos espectros (se muestran con flechas los picos que definen los $2A_{\text{máx}}$ de cada espectro) , lo cual indica que el marcador no presenta una orientación preferencial dentro de la muestra.

En ese trabajo, se compara además el espectro de absorción de Rx (NEXAFS: Near Edge X-ray Absorption Fine Structure) de una muestra de AE pura, la cual presentó un marcado orden con una inclinación del eje principal de 37° . Este valor resulta mayor al valor de 25° (promedio de tilt C1-C18) , obtenido de nuestras simulaciones de AE puro a varias T. El valor de tilt obtenido por estos autores resulta mayor al de otros trabajos también realizados con monocapas de AE, pero sobre distintos soportes [Allara y Nuzzo, 1985a][Allara y Nuzzo, 1985b].

Para la muestra marcada en la interfase AlO₃, estos investigadores encontraron **un descenso del orden significativo**, lo cual indica que el marcador perturba significativamente la monocapa de AE y es consistente con la isotropía mostrada por el espectro de RPE a distintas orientaciones. Además se discute el efecto de la concentración relativa del marcador en la monocapa, la cual los autores estiman del orden del 1 %.

Ahora compararemos estos espectros experimentales con los obtenidos a partir de las simulaciones de bicapas de AE/AE*. A diferencia de los resultados de Risse y col, nuestras simulaciones indican que el marcador presenta una **clara orientación preferencial**. Si comparamos los espectros teóricos (simulación del marcador a 300K) calculados para la muestra orientada con el eje de tilt paralelo a B (en rojo), con la muestra orientada con la normal a su superficie paralela a B (en negro), notaremos que ambos espectros presentan 3 picos bien definidos, presentando la muestra con su eje de tilt orientado paralelo a B el mayor ancho de línea (mayor $2A_{\text{máx}}$) como se podría haber anticipado.

Estos resultados resultan razonables, si tenemos en cuenta:

- La muestra rotada con el eje de tilt paralelo a B (normal al anillo doxil // a B) presentará el máximo valor de A_{zz} (capítulo 3).
- La muestra rotada con la normal a la bicapa paralela a B, presenta el eje de tilt desplazado en aproximadamente 25° respecto a B, lo cual hace que los valores de A_{zz} no alcance sus valores máximos.

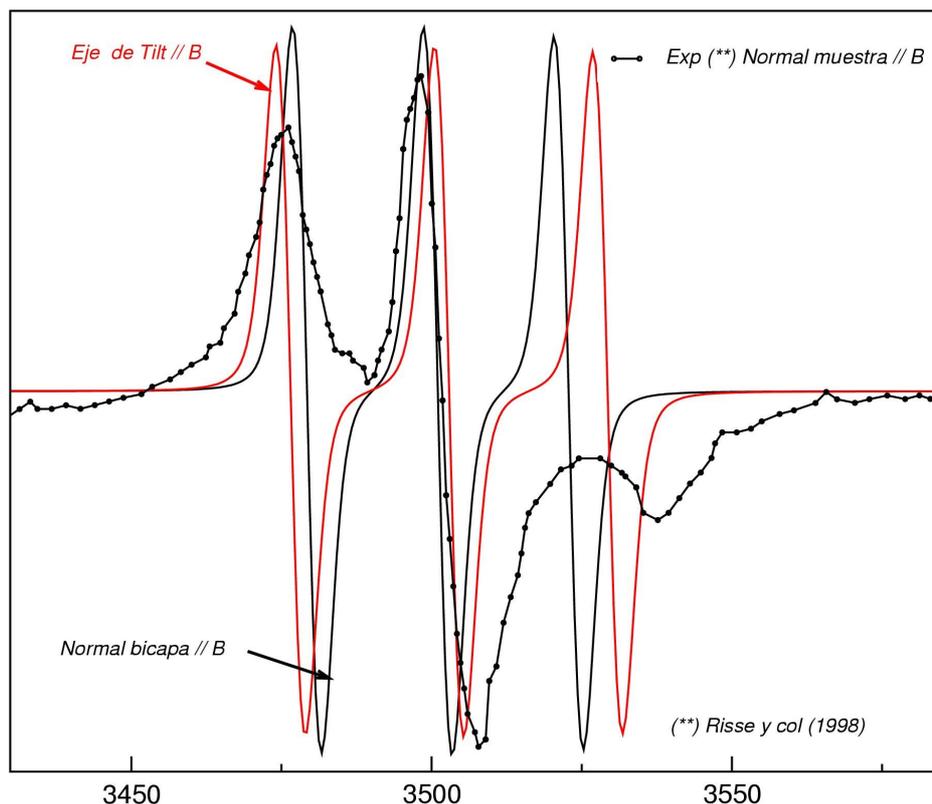


Gráfico 5.24: espectro obtenidos para una monocapa de AE (Langmuir) experimental, marcada con 12-doxil-AE a 300 K [Risse T. (1998)][Risse T. y col (1998)] (líneas y círculos). Los espectros en línea completa muestran los espectros simulados obtenidos a 300 K, para 2 orientaciones de la muestra: en rojo con el eje de tilt paralelo a B, y en negro con la normal a la bicapa paralela a B. En estos trabajos experimentales no observaron diferencias significativas con la variación de la orientación de la muestra con respecto B. Además los espectros experimentales mostraron ser tipo “polvo”, indicando que el marcador no presenta una orientación preferencial dentro de la muestra.

Además nuestros resultados de parámetros de orden S_{zz} y S_M (Tabla 5.4), calculados para AE y AE* indican que el marcador no parece perturbar el orden del sistema más allá de sus próximos vecinos. Esta importante diferencia encontrada con el trabajo de Risse, podría explicarse si el número de moléculas de AE dentro de la monocapa experimental fuera superior a un 1 %, con lo cual la cantidad de moléculas distorsionadas dentro del sistema aumentaría significativamente. Estos autores observan que el comportamiento de la intensidad de la señal de EPR con la concentración de marcadores en solución es no lineal, por lo que les resulta difícil establecer cuantos marcadores han sido absorbidos en la monocapa y su ubicación, por este motivo la inesperada isotropía de sus espectros podría deberse a una amplia distribución de orientaciones que eventualmente podría incluir la

existencia de marcadores en la superficie de la monocapa.

Para poder dar una idea de la distribución de orientaciones del marcador en la muestra de Risse y col., en el Gráfico 5.25 se agregaron los espectros teóricos obtenidos de una distribución cónica de vectores magnetización, correspondientes a un semi-ángulo de 60° y 85° , para una muestra orientada a 0° . Se decidió mostrar los espectros teóricos correspondientes al límite de promediación por **movimientos muy lentos**, ya que los calculados con algún factor de promediación tienden a dar espectros tipo marcador en “solución”, con tres picos bien definidos, muy distintos a los experimentales (tipo “polvo”).

Puede notarse, que los espectros correspondientes al cono de 60° , a pesar de lo amplio de la distribución usada para el cálculo, muestra diferencias significativas con la muestra experimental orientada a 0° con respecto a B.

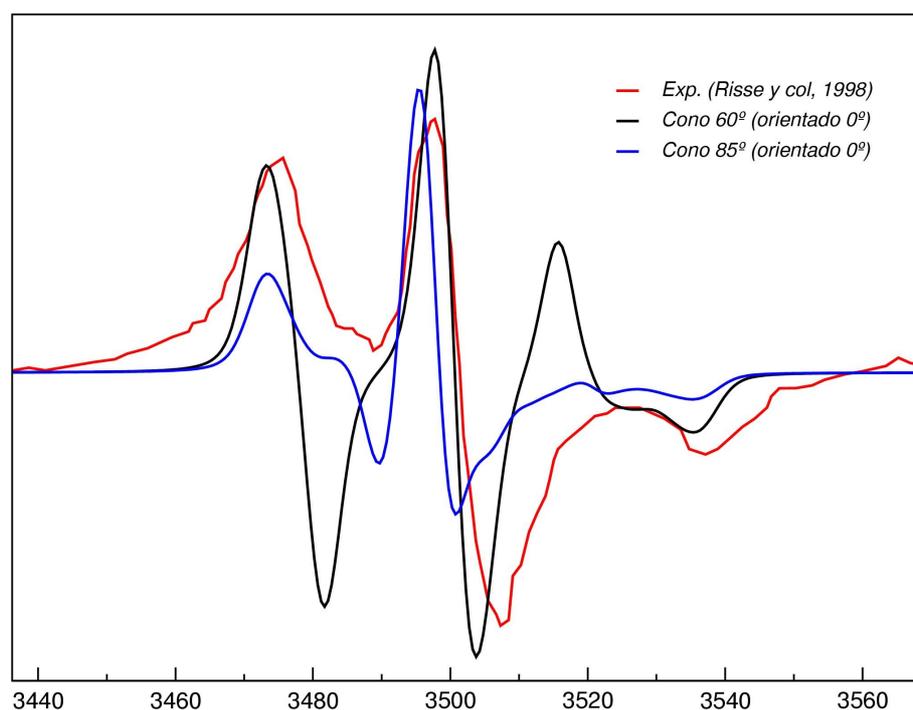


Gráfico 5.25: A los espectros experimentales de Risse y col., antes mostrados se agregaron para comparar los espectros teóricos obtenidos de una distribución cónica de vectores, correspondientes a un semi-ángulo de 60° y 85° , para una muestra orientada a 0° .

El espectro teórico realizado para un distribución cónica de

vectores de semi-ángulo de 85° (amplitud del cono 170°) pudo representar relativamente bien las características del espectro experimental, el cual mostró ser de tipo “polvo”, indicando que el marcador en la muestra experimental, probablemente este distribuido en todas las orientaciones posibles (isotrópico), con un comportamiento “cuasi”estático.

5.8.3. Multicapas de Fosfolípidos

Muestras Orientadas (Lecitina vs Teóricas)

Los Gráfico 5.26-A y B, muestran los espectros de RPE obtenidos para multicapas de lecitina de huevo, orientadas a 0° y 90° (línea con círculos negra) respecto a la normal a la bicapas; marcadas con 12-doxil-AE [Jost y col., 1971]. Junto a los espectros de muestran las representaciones esquemáticas de la orientación de los vectores: normal a la muestra, normal a la bicapa y paralelo al eje de tilt de los AE, con respecto al campo magnético externo. Puede apreciarse que **los espectros experimentales** presentan una clara orientación preferencial, mostrado por las diferencias halladas entre los espectros a 0° (5.26-A) y 90° (5.26-B). En el 5.26-A se incluyeron los espectros calculados (teóricos) de nuestra simulación a 300 K, para una muestra orientada a 0° (normal a la muestra paralelo a B) (figura I derecha) y para una muestra orientada con la dirección del tilt paralelo al campo externo (B) (figura II). Notar que la máxima separación de líneas en **los espectros teóricos** se obtiene para la muestra orientada con la dirección del tilt aproximadamente paralelo al campo. Esto indica que el vector normal al anillo doxil (vector magnetización) se halla inclinado un ángulo semejante al tilt de las moléculas de AE, respecto de la normal a la muestra. Por lo que al rotar el sistema de manera que la dirección de tilt se ubique paralelo al campo magnético, obtenemos los mayores valores de las proyecciones de A_{zz} y por lo tanto la máxima separación de línea (ver capítulo 3).

En el Gráfico 5.26-B se muestran: el espectro experimental de la misma muestra de lecitina de huevo, rotado 90° (normal a la muestra perpendicular a B); un espectro teórico calculado para una muestra orientada con la normal a la bicapa perpendicular al campo B (Figura III); y un espectro teórico de una muestra orientada con el eje de tilt perpendicular al

campo(Figura IV). Notar que la muestra experimental, presenta valores de $2A_{\text{máx}}$ que son **menores** que los obtenidos de nuestras simulaciones con la muestra orientada con el eje de tilt paralelo al campo magnético (5.26 A - II), pero **mayores** que los correspondientes a la muestra orientada con la normal a la bicapa paralela al campo magnético (5.26 A - I). En el mismo sentido, los valores de $2A_{\text{mín}}$ de la muestra experimental es **mayor** que el correspondiente a la muestra simulada con una orientación del eje de tilt perpendicular al campo magnético (5.26 B IV) , pero **menor** que el de la muestra orientada con la normal a la bicapa perpendicular al campo magnético (5.26 B - III).

El trabajo de Jost y col [Jost y col., 1971] encuentra que los 4 marcadores empleados (5, 7, 12, 16-doxil-AE) tienden a alinearse con sus ejes largos , perpendiculares a la laminilla de vidrio empleada como soporte.

Podemos decir en base a estos resultados que, a diferencia de esta muestra experimental, nuestra bicapa tiende a orientarse con el eje principal **inclinado** respecto a la normal a la muestra. Esto queda comprobado por el aumento de $2A_{\text{máx}}$ y la disminución de $2A_{\text{mín}}$ obtenido cuando la muestra se rotó el ángulo necesario para que los ejes principales de las moléculas de AE queden paralelos y perpendiculares a B, respectivamente. Este inclinación colectiva del eje largo de las moléculas de AE es un hecho experimental bien conocido, para monocapas tipo L-B de AE puro, y que parece ser descripta apropiadamente por el marcador 10-doxil-AE inserto en la misma.

También puede observarse, si comparamos el espectro experimental del gráfico superior, con los de las muestras de AE (teóricas) rotadas según II, que la forma del espectro de las multicapas de lecitina se corresponde a una distribución de vectores magnetización más amplia que la de la muestra de AE. Notar la amplitud de distribución de tercer pico (campo más alto) respecto a los tres picos uniformes de la muestra de AE marcada. Si además recordamos que la muestra experimental se halla en estado“gel” (T ambiente), podemos asumir que la promediación de los movimientos del marcador no será completa dentro de los tiempo característicos del experimento de RPE. Entonces, la amplitud del tercer pico, nos muestra

fundamentalmente la dispersión de los vectores dentro de la muestra.

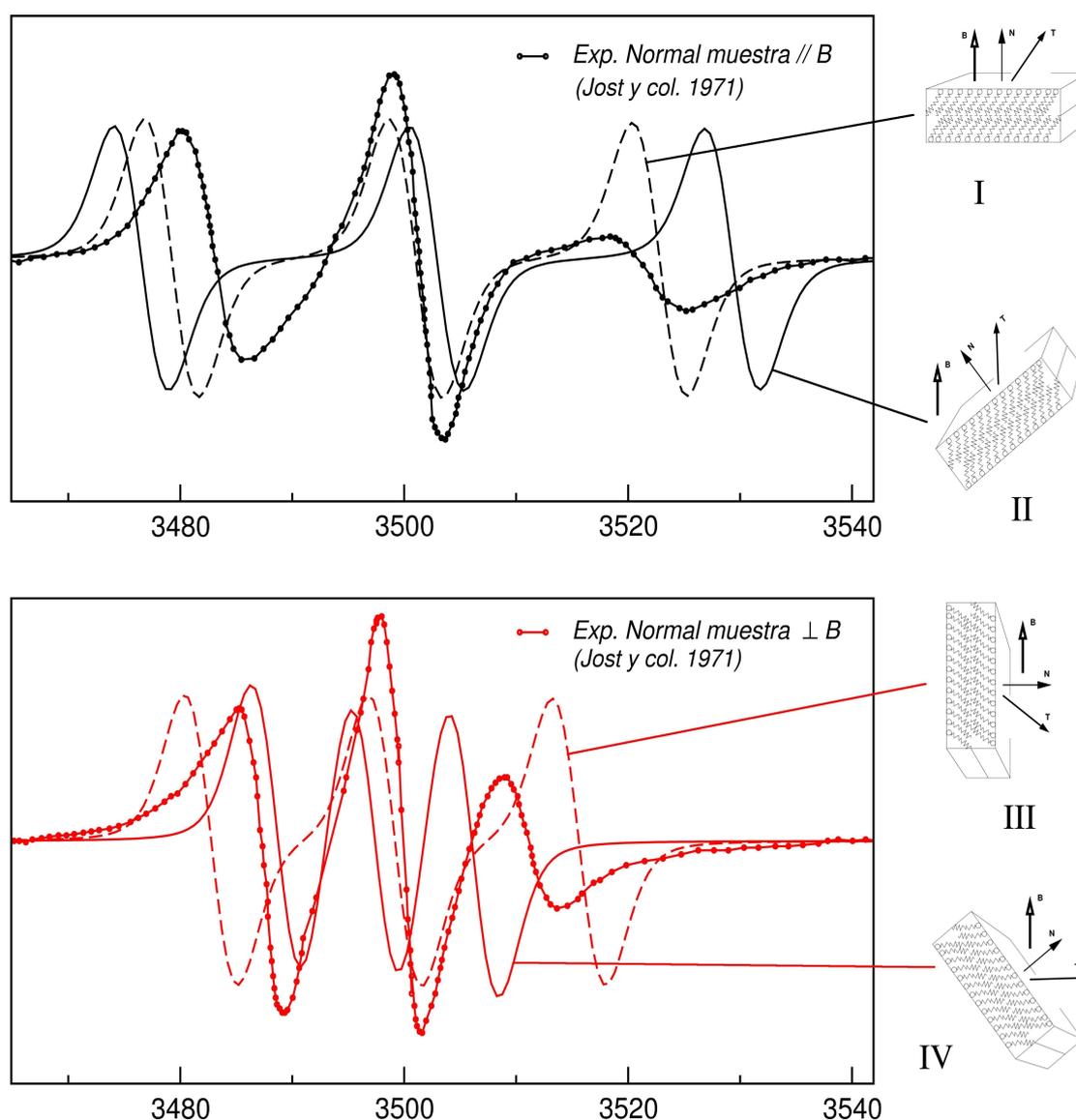


Gráfico 5.26: los gráficos 5.26-A y B, muestran los espectros de RPE obtenidos para multicapas de lecitina de huevo, orientadas a 0° y 90° (línea con círculos negra) respecto a la normal a la bicapas; marcadas con 12-doxil-AE ([Jost P.(1971)]). Se incluyeron en el gráfico 5.26-A los espectros calculados (teóricos) de nuestra simulación a 300 K, para una muestra orientada a 0° (normal a la muestra paralelo a B) (figura I derecha) y para una muestra orientada a la dirección del tilt paralelo al campo externo (B) (figura II). En el gráfico 5.-B se muestran: el espectro experimental de la misma muestra de lecitina de huevo, rotado 90° (normal a la muestra perpendicular a B); un espectro teórico calculado para una muestra orientada con la normal a la bicapa perpendicular al campo B (figura III); y un espectro teórico de una muestra orientada con el eje de tilt perpendicular al campo(figura IV).

Muestras NO orientadas (Lecitina vs DPPC vs Teóricas)

En el Gráfico 5.27 se muestran 2 espectros de 12-doxil-AE en **muestras no orientadas**; uno en lecitina de huevo (línea gruesa negra) [Griffith y Jost, 1976], y el otro en una muestra de dipalmitoilfosfatidilcolina

(DPPC) (línea entera verde) (Dra. Ana Genaro, comunicación personal), además se agregó el espectro de 10-doxil-AE (simulación) (línea roja) calculado para una muestra NO orientada. Puede observarse que los 3 espectros presentan características intermedias entre un espectro de “polvo” y de un marcador en “solución”. Notar que el espectro de la muestra de DPPC presenta resto de marcador libre, reflejado por los picos marcados con óvalos, y que por lo tanto no serán utilizados en la comparación. El valor de S aparente obtenido de los espectros para las multicapas de fosfolípidos es de aprox. 0.41, el de DPPC 0.65 y la muestra simulada de AE es de 0.69. La diferencia encontrada entre la muestra DPPC y la lecitina de huevo puede explicarse, si tenemos en cuenta que la lecitina es una mezcla de fosfolípidos, rica en DPPC pero que además contiene lípidos insaturados, que pueden aumentar su fluidez y desorden.

Se puede agregar, basándonos en los valores de S calculados, que la muestra de AE presenta un mayor ordenamiento en la zona del C10 que la muestra de lecitina de huevo, lo cual resulta razonable dado que el empaquetamiento de los AE dentro de la bicapa restringe marcadamente las posibilidades de moverse al marcador (al corresponder a una fase sólido), induciendo un mayor “orden” en relación a las multicapas de fosfolípidos.

Por otra parte el valor de S aparente calculado para las bicapas de AE es similar al obtenido para la muestra de DPPC en estado “gel”. Si comparamos la superficie por molécula del AE (exp. y teórica) 21 \AA^2 , con la correspondiente a DPPC (exp. y teórica) 64 \AA^2 , podemos adelantar que el empaquetamiento del sistema AE será mucho más compacto y por lo tanto con un mayor ordenamiento que el DPPC. Sin embargo, el orden estimado a partir de los valores de S parecen indicar un orden similar. Este resultado, tal vez pueda explicarse por la mayor movilidad relativa que presenta el AE* dentro del bicapas de AE, debido a los severos impedimentos estérico que le impone ese sistema tan ordenado (discutido en párrafos anteriores) y que hace que el AE* encuentre su situación de equilibrio con un aumento de su entropía.

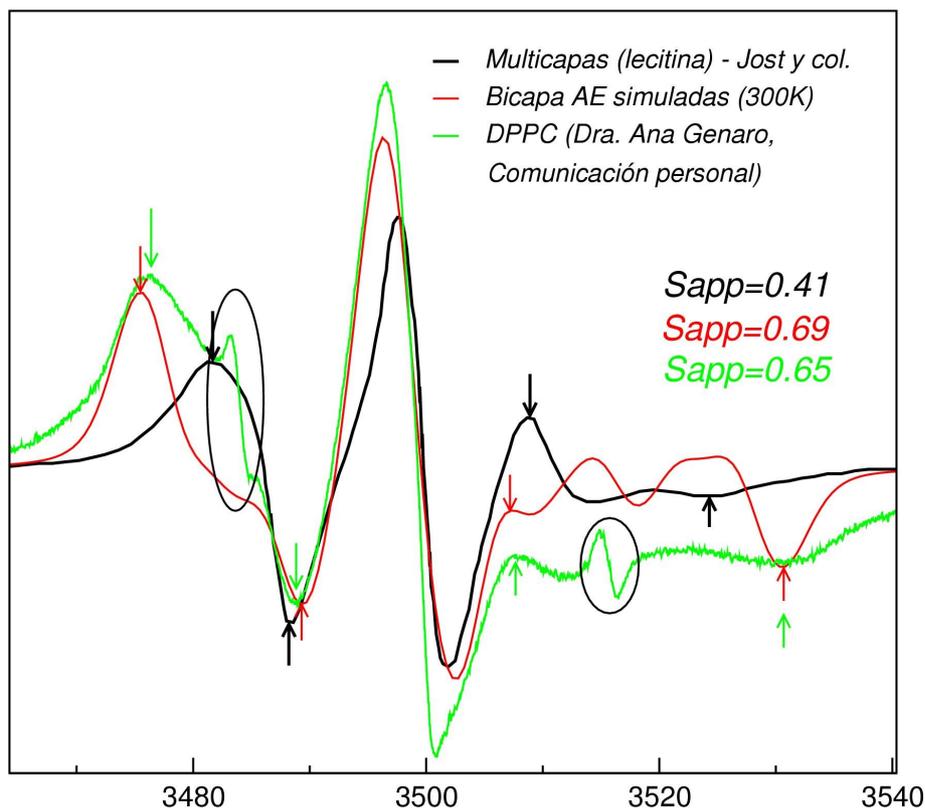


Gráfico 5.27: espectros de 12-doxil-AE en muestras no orientadas; uno en lecitina de huevo (línea gruesa negra) [Griffith y Jost, 1976], y el otro en una muestra de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (línea entera verde) (Dra. Ana Genaro, comunicación personal) ,además se agregó el espectro de 10-doxil-AE (simulación) (línea roja) calculado para una muestra NO orientada. Puede observarse que los 3 espectros presentan características intermedias entre un espectro de "polvo" y un "líquido". Se marcó con óvalos, los picos que se atribuyen a parte del marcador que es excluido del sistema DPPC gel, y que se comporta como marcador "libre" en solución.

En el Gráfico 5.28 se compara el espectro experimental de DPPC, con espectros teóricos calculados a partir de distribuciones cónicas uniformes de vectores magnetización. En el 5.28-A se muestra la comparación con una distribución cónica de semi-ángulo 45° (amplitud del cono: 90°), con distintos parámetros de promediación por movimiento (muy rápidos, muy lentos e intermedios). Se marcaron las líneas correspondientes a $2A_{\text{máx}}$ y $2A_{\text{mín}}$ del espectro experimental, para que sirvieran como guías

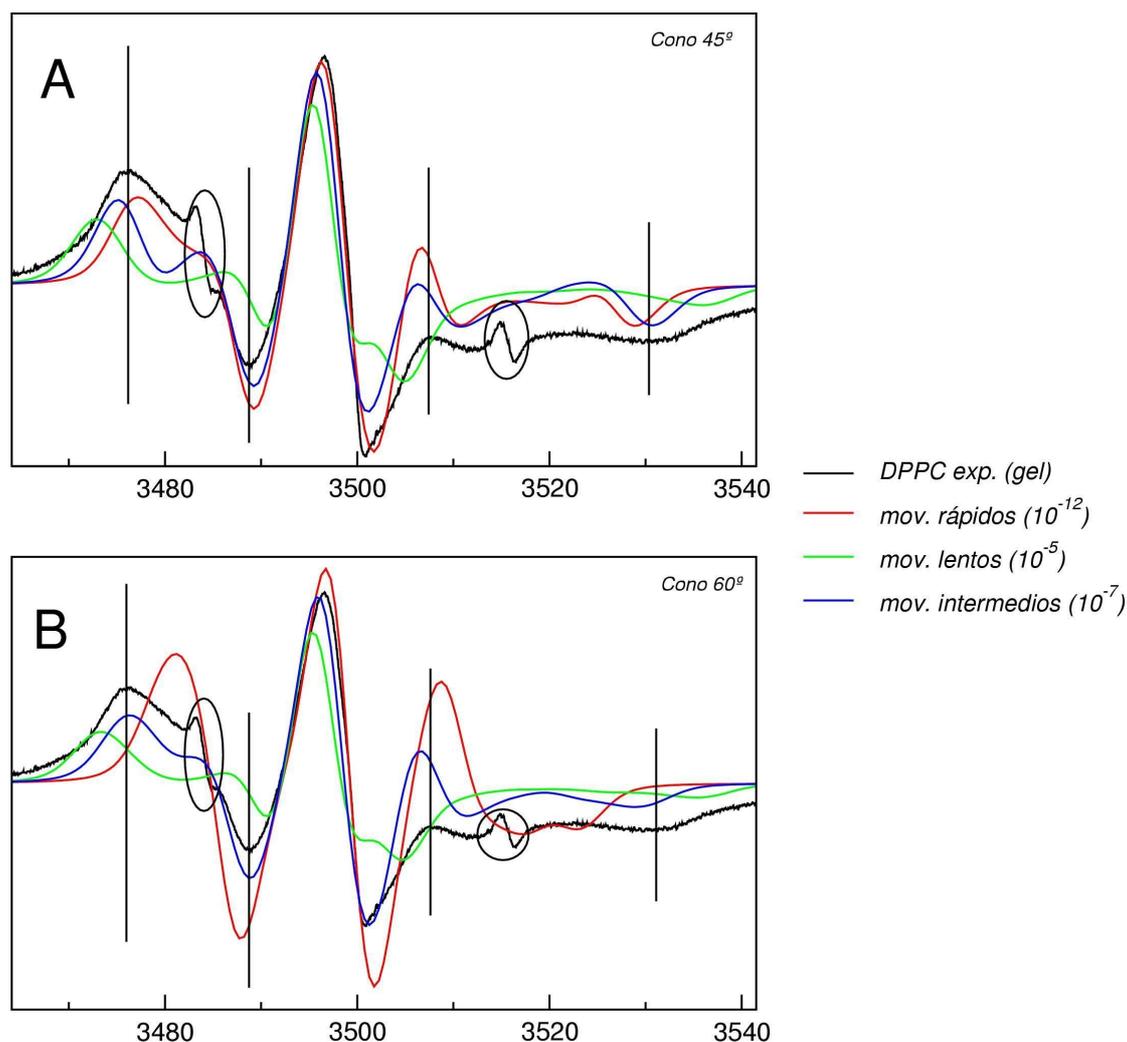


Gráfico 5.28: comparación del espectro experimental de DPPC, con espectros teóricos calculados a partir de distribuciones cónicas uniformes de vectores magnetización. En el gráfico 5.30-A se muestra la comparación con una distribución cónica de semi-ángulo 45° (amplitud del cono: 90°), con distintos parámetros de promediación por movimiento (muy rápidos, muy lentos e intermedios). Se marcaron las líneas correspondientes a 2Am_{ax} y 2Am_{in} del espectro experimental, para que sirvieran como guías de comparación, además de la forma de los picos. El gráfico 5.30-B realiza la misma comparación efectuada arriba, pero para una distribución cónica de semi-ángulo 60° (amplitud del cono: 120°).

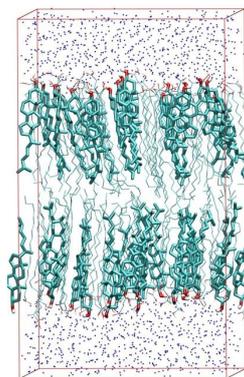
de comparación, además de la forma de los picos. Puede apreciarse que el espectro de movimientos lentos es el que menos reproduce el espectro experimental. Por lo que podemos decir que los espectros teóricos de **mov. rápidos e intermedios** son los que muestran valores de 2Am_{ax} y 2Am_{in} más próximos a los del espectro experimental, así como también su forma, y por lo tanto podemos decir que son los que mejor lo reproducen.

En el 5.28-B se realiza la misma comparación efectuada arriba, pero para una distribución cónica de semi-ángulo 60° (amplitud del cono: 120°). Aquí nuevamente encontramos que los espectros teóricos calculados con

factor de promediación para **movimientos lentos** es el que peor reproduce el espectro experimental. En esta distribución, también podemos notar que el espectro correspondiente a un factor de promediación por **movimientos rápidos**, presenta diferencias importantes en los valores de $2A_{máx}$ y/o $2A_{mín}$ de la muestra experimental, así como también en la forma del espectro. Por lo que podemos decir que espectro teórico de **movimientos intermedios**, es el que mejor explica el espectro experimental.

Resumiendo, observamos que los espectros calculados con nuestro modelo, para un cono de 45° con movimientos rápidos a intermedios, así como el cono de 60° con movimientos intermedios son los que mejor explican el espectro experimental de DPPC en estado “gel”.

CAPITULO 6



6. Bicapas de Ácido Esteárico con 30 % de Colesterol

6.1. Construcción de una bicapa de AE-colesterol

Las coordenadas atómicas y la topología empleada en la simulación para la molécula de colesterol fue la misma que la utilizada por

Höltje y Brandt [Höltje y col., 2001] en su trabajo de simulación de bicapas de mezcla de ácido esteárico y palmítico con colesterol.

Se reemplazaron 40 moléculas de AE al azar de la bicapa modelo preparada según el apartado 4.1, por moléculas de colesterol (20 de cada lado de la bicapa). Posteriormente se realizó una minimización de la energía total del sistema hasta que la fuerza máxima sobre cada átomo del sistema fuera inferior a $200 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. De esta manera se reacomodaron todos aquellos átomos que hubiesen quedado demasiado próximos durante el agregado del agua y su posterior manipulación. El Gráfico 6.1 muestra el arreglo inicial obtenido.

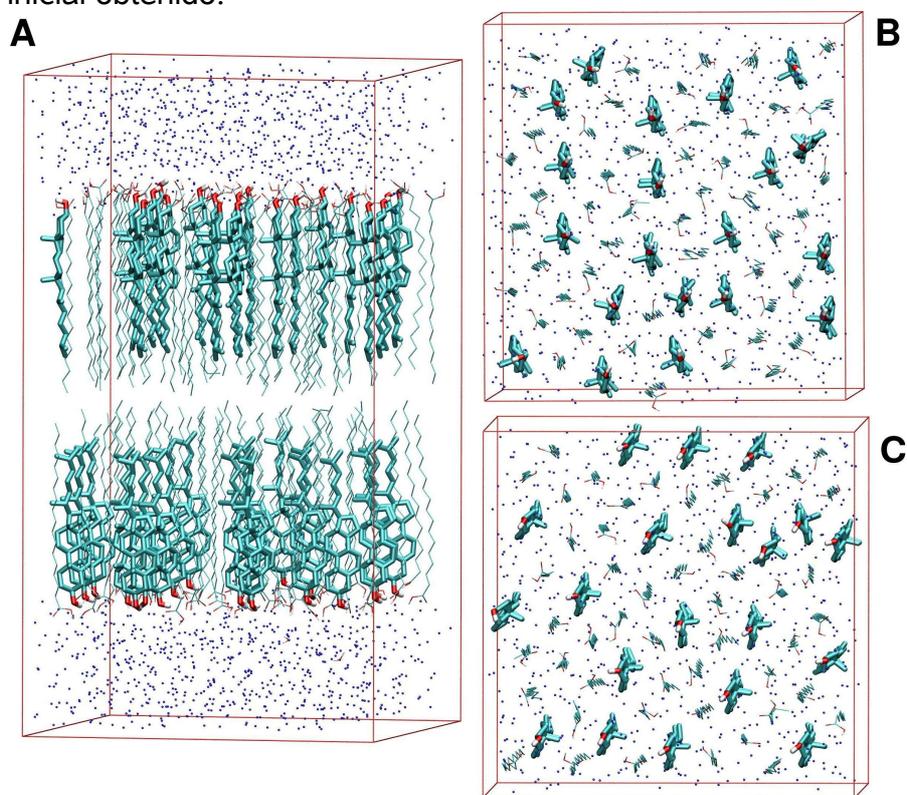


Gráfico 6.1 arreglo molecular inicial de una bicapa de ácido esteárico (98 moléculas) dibujado con palitos finos, colesterol (40 moléculas) dibujado con palitos gruesos y las moléculas de agua se representan como esferas azules, centradas en el O de la molécula. El gráfico 6.1 A muestra la caja vista lateralmente. Los gráficos 6. B y C muestran la monocapa 1 (vista superior de la caja) y 2 (vista inferior de la caja) respectivamente.

6.2. Protocolo de preparación de la bicapa inicial

Por las mismas razones que se detallaron en la preparación de las bicapas de AE (tiempos de simulación largos y posibilidad de sesgo de la

configuración inicial), aquí también es necesario realizar un protocolo de recocido simulado, similar al empleado en el apartado 4.4. Para el caso particular de este sistema se agregaron restricciones suave en las posiciones de los O de las moléculas de colesterol, en la dirección Z con las mismas constante de fuerza que las empleadas para los carbonos C2 de las cabezas de los AE. Estas restricciones se aplicaron en la etapa de recocido requerido.

A esta nueva configuración inicial se le realizaron simulaciones a varias temperaturas de baño térmico (285 K, 300 K, 315 K, 330 K) y una presión de 1 atm de 8 ns, con tiempo de integración de 2 fs. Para ello se empleó un acoplamiento a un baño térmico [Berendsen, 1991] con un tiempo de acoplamiento de 0.1 ps y un acoplamiento a un regulador de presión [Berendsen y col., 1984] tipo tensión-superficial constante (1206 bar.nm), con una presión normal a la bicapa de 1 atm., con un tiempo de acoplamiento de 4 ps y una constante de compresibilidad de $6 \cdot 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$. Notar que la tensión superficial utilizada en estas simulaciones es la estimada a partir de los datos de experimentos de presión lateral para AE (1206 bar.nm).

6.3. Observaciones acerca de los resultados de la DM

El Gráfico 6.2 muestra la evolución del área por molécula de AE a 300 K, calculada dividiendo el área total xy de la caja de simulación por el número total de moléculas en cada monocapa. La curva muestra una pendiente despreciable durante los últimos 2 ns que se emplearon como etapa de producción.

A 330 K no se logró alcanzar una situación de equilibrio durante los 8 ns de simulación.

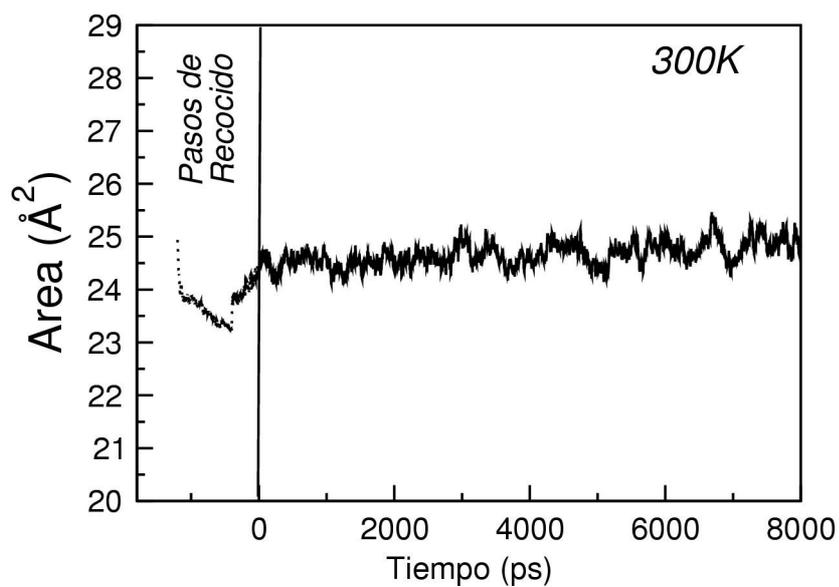


Gráfico 6.2: área por molécula vs tiempo de simulación. Notar que a pesar de las fluctuaciones observadas, el área se muestra significativamente estable a lo largo del tiempo de simulación.

6.4. Propiedades Estructurales

Con fines cualitativos se muestra el arreglo de lípidos obtenido al finalizar la preparación de la bicapa a 300 K (Gráfico 6.3). Puede apreciarse el importante desorden del sistema en relación al sistema inicial (Gráfico 6.1).

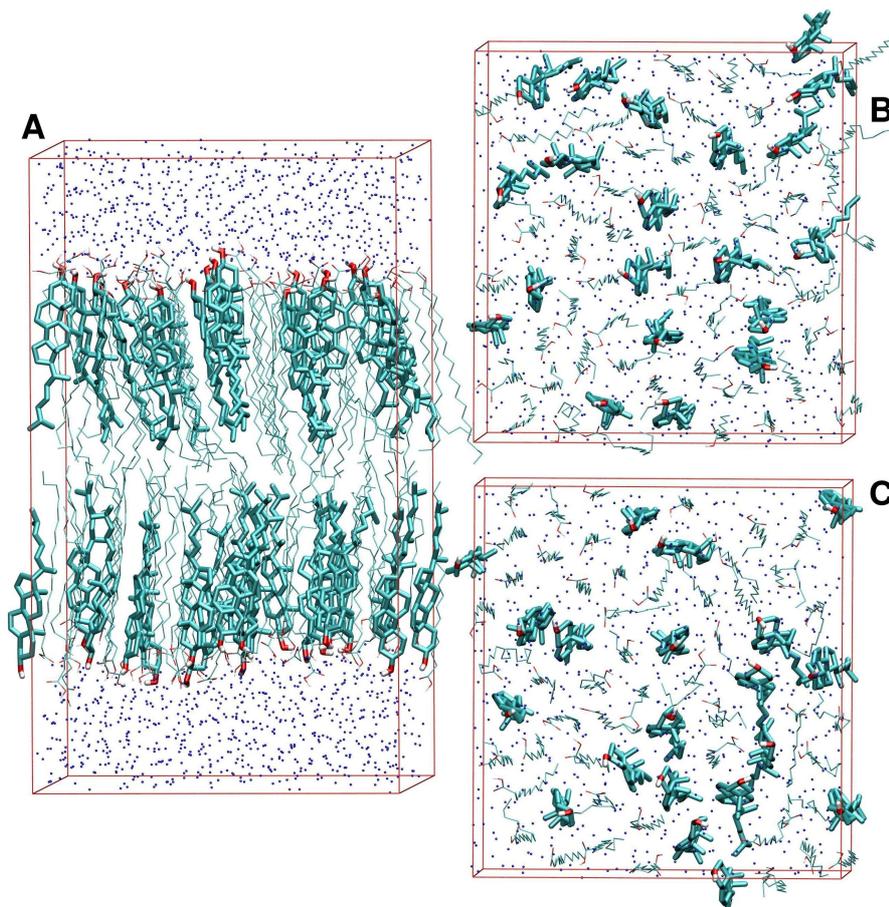


Gráfico 6.3: se muestran la distribución molecular final del recocido simulado (etapa de preparación) a 300 K. Para mayor simplicidad de la figura solo se muestran los átomos de O de las moléculas de agua, como pequeñas esferas de color azul. Las moléculas de AE y colesterol se muestran como palitos finos y gruesos respectivamente, ambos con la convención de color CPK. El gráfico 6.2.A muestra la caja vista lateralmente. Los gráficos 6.2 B y C muestran la monocapa 1 (vista superior de la caja) y 2 (vista inferior de la caja) respectivamente.

6.4.1. Fracción de Diedros en Conformación *trans* (AE)

El Gráfico 6.4 muestra la fracción de diedros en conformación *trans* promediado sobre todos los AE del sistema, para cada T. Notar que la fracción de diedros en *trans* es significativamente más baja que la obtenida en las simulaciones de la misma T sin colesterol (gráfico 4.3). Esto indica que las moléculas de colesterol alteran el empaquetamiento regular del sistema AE puro permitiendo que estos puedan presentar diedros en conformación *gauche* con mayor frecuencia. Como consecuencia de esto disminuye el largo promedio de las moléculas, comparado con el observado para el sistema sin colesterol a igual T.

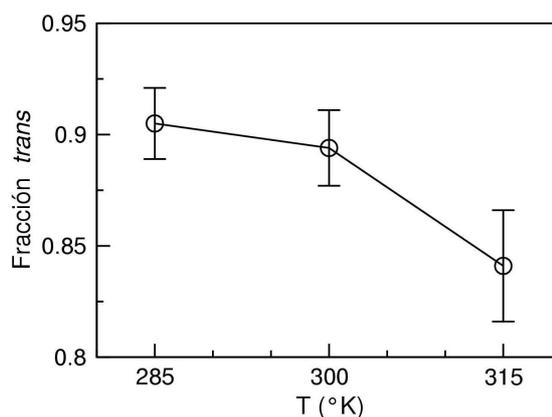


Gráfico 6.4: fracción trans promedio y desvío estándar, calculada sobre todos los AE del sistema, para cada T. Notar que los valores obtenidos son mucho menores que los obtenidos sin colesterol, indicando el importante desorden introducido por los mismos.

La disminución significativa del espesor promedio de este sistema está asociada al aumento de diedros en conformación gauche, que hace que la longitud promedio de las moléculas de AE disminuya. Esto puede explicarse si pensamos que las moléculas de colesterol al intercalarse entre las moléculas de AE, generan espacios que permiten que los AE puedan acomodar más defectos gauche por cadena, lo cual se traduce en una disminución del largo de la molécula. Esta disminución del espesor es observada también en las transiciones del estado “gel” al estado “Líquido Ordenado” en sistemas multilamelares de DPPC.

6.4.2. Superficie por Molécula de Colesterol

En primer lugar se calculó la superficie por molécula de colesterol suponiendo que el área ocupada por cada AE era la misma que para el sistema de AE puro (sistema A) a igual T.

$$S(\text{colesterol}) = \frac{S(\text{caja}) - N(\text{AE}) * S(\text{AE})}{N(\text{colesterol})}$$

Donde $S(\text{caja})$ es la superficie de la caja (xy), $N(\text{AE})$ es el número de AE por monocapa, $S(\text{AE})$ es el área de un AE estimada a partir del la DM del sistema AE puro y $N(\text{colesterol})$ es el número de moléculas de colesterol en cada monocapa.

La aproximación realizada al suponer que la superficie de AE en la mezcla se mantiene igual que en el sistema puro, dió una superficie para el

colesterol a 300 K de 34.6 \AA^2 , el cual es semejante al publicado por Holtje y col. [Holtje y col., 2001], 4 \AA^2 menor que el obtenido por Hyslop [Hyslop y col., 1990] y 2.5 \AA^2 mayor que los publicados por Tu y col. [Tu y col., 1998], y Smondyrev y col. [Smondyrev y Berkowitz, 1999]. Este resultado merece la misma interpretación realizada por Holtje y col.: En los ensamblajes de colesterol puro, las moléculas rígidas exhiben movimientos altamente restringidos que no permiten un contacto más amplio que los del cristal (alrededor de 39 \AA^2). Cuando las moléculas de colesterol se hallan rodeadas por moléculas flexibles de cadenas hidrocarbonadas, es posible obtener un arreglo más apretado reduciendo la superficie molecular por ejemplo a 32 \AA^2 .

Seguidamente se calcularon los perfiles de área por molécula empleando el método descrito en el inciso 5.4.1.

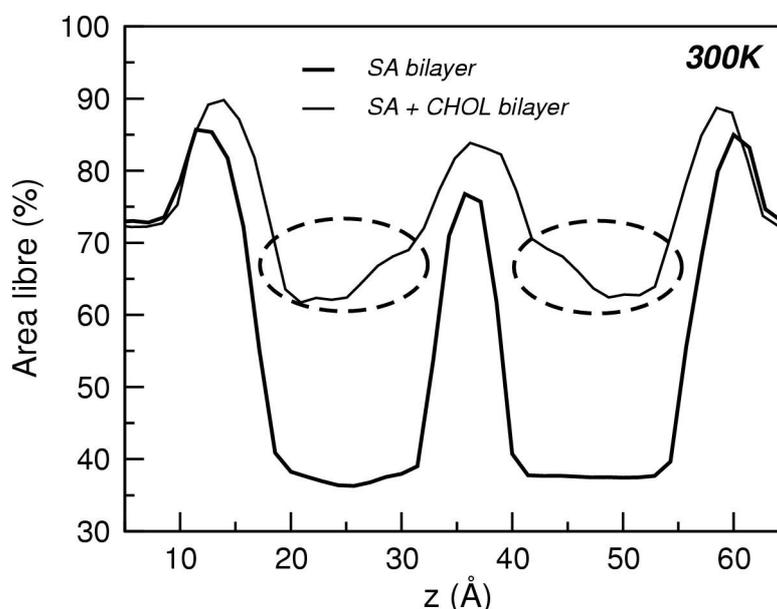


Gráfico 6.5: area libre vs profundidad de la bicapa. Notar el aumento observado a todas las profundidades estudiadas y en particular en la zona de los anillos de colesterol (marcado con óvalos).

El rea estimada para el colesterol en la zona de plateau ($23 \pm 3 \text{ \AA}^2$), no se haya directamente relacionado a un valor experimental. Sin embargo este cálculo nos permite estimar el área libre correspondiente al sistema B a 300 K, a lo largo del eje Z de la bicapa (Gráfico 6.5). En el gráfico se incluyó la curva de área libre correspondiente al sistema A para su comparación. Con ovalos se muestran las zonas ocupadas por los anillos de colesterol. Este espacio se definió teniendo en cuenta la posición promedio de

los átomos C5 y C21, que delimitan los extremos de los anillos de la molécula de colesterol (ver perfiles de densidad atómica, Gráfico 6.6). Notar el significativo aumento de area libre observado en presencia de colesterol en particular en la zona de sus anillos, respecto del sistema sin colesterol (A).

6.4.3. Tilt Z del AE

El tilt z es el ángulo formado por el vector entre el carbono C1 del grupo químico carboxilo y el átomo C18 del metilo terminal con el eje z del sistema, el cual está definido como normal a la bicapa.

Tabla 6.6: ángulo de inclinación (θ), desvío estándar del ángulo de inclinación (σ_θ) y desvío estándar del ángulo azimutal (σ_ϕ) de los AEs del sistema B y B*. Unidades en grados.

	Sin SA* (system B)		
	285K	300K	315K
θ	8°	8	8°
σ_θ	1°	1°	2°
σ_ϕ	111°	111°	90°

Puede observarse en la Tabla 6.6, que el tilt promedio de las moléculas de AE es de aproximadamente 8°, lo cual indica que las mismas tienden a disponerse en forma más perpendicular con respecto al plano de la bicapa. Se muestra además el desvío estándar del ángulo azimutal definido para el vector C1-C18 (ángulo definido por la proyección del vector promedio C1-C18 sobre el plano XY y el eje X del sistema de coordenadas). Puede decirse a partir de su elevado valor que las moléculas de AE **no presentan** una orientación colectiva de sus cadenas hidrocarbonadas, cuando se hallan presentes moléculas de colesterol.

El efecto del colesterol sobre la inclinación de las moléculas en bicapas de fosfolípidos ha sido discutido en el trabajo de Aittoniemi y col.[Aittoniemi y col., 2006]. Estos autores encontraron un ángulo de inclinación de 19.7° en las moléculas de colesterol en sistemas mixtos DPPC-Colesterol a 323 K, mientras que Tristram-Nagle [Tristram-Nagle y col., 1993] y col, mostraron que la inclinación molecular en sistemas de DPPC puro (fase gel)

era de 32°. En resumen estos autores muestran que las moléculas de colesterol tienen la capacidad de reducir la inclinación molecular al interponer sus anillos rígidos entre las moléculas de fosfolípidos. Nuestros resultados de la inclinación molecular en los sistemas con y sin colesterol a 300 K, fue de 8° y 24° respectivamente, mostrando el mismo comportamiento que el descrito por estos autores.

6.4.4. Perfiles de Densidad de átomos

El Gráfico 6.6 muestra el perfil de densidad (número de átomos promedio en cada corte de la caja de simulación, expresados por nm³) de los átomos de carbono C1, C10, C18 del AE; y C5 (carbono inicio anillo colesterol), C21 (carbono final anillo colesterol) y C27 final cola colesterol, tomados como referencia. El A, B, C muestran los perfiles correspondientes a las T de 285 K, 300 K y 315 K respectivamente. Con fines ilustrativos se muestra en la parte superior del gráfico un arreglo molecular donde se destacan los átomos seleccionados para el cálculo de los perfiles de densidad (mostrado con esferas), sobre 2 moléculas seleccionadas en una de las monocapas.

Puede notarse que los átomos de carbono del colesterol (C5) más próximos a la interface con el agua, tienden a ubicarse ligeramente más hacia el interior de la bicapa que los C1 de las moléculas de AE. Además observar que los carbonos C18 de las moléculas de AE de cada monocapa, quedan completamente solapados, a diferencia de las simulaciones realizadas sin colesterol, donde a pesar del extenso solapamiento, podía apreciarse 2 picos de densidad de los C18 de los AE. Puede apreciarse adicionalmente una notable disminución del espesor de la bicapa a 315 K. Este efecto podría explicarse como consecuencia del aumento de la T (E cinética del sistema), la cual afectaría las fuerzas de cohesión de las moléculas, tendiendo estas a separarse más entre sí, y permitiendo un mayor solapamiento de las partes finales de las colas hidrofóbicas.

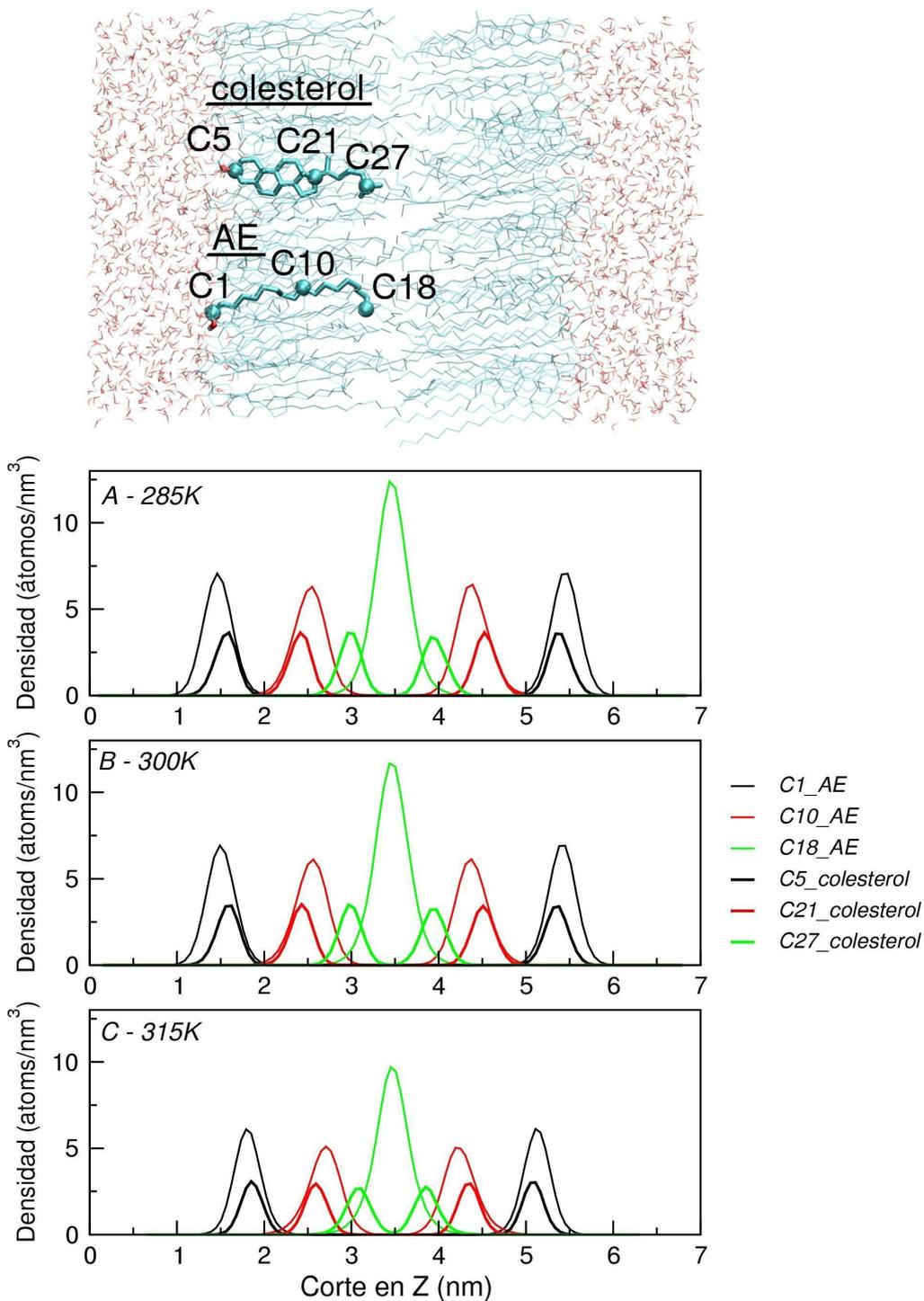


Gráfico 6.6: perfil de densidad (número de átomos promedio en cada corte de la caja de simulación) de los átomos de carbono C1, C10, C18 del AE; C1, C10, C18 del 10-doxil-AE y C5 (carbono inicio anillo colesterol), C21 (carbono final anillo colesterol) y C27 final cola colesterol, tomados como referencia. En la parte superior se muestra las imágenes moleculares de un AE, de uno de los marcadores y de una molécula de colesterol (bolas y palitos), usadas como referencia. Se gráfico como esferas de van der Waals, los átomos a los cuales se les calculó su perfil de densidad en cada corte de la caja.

6.5. Parámetros Dinámicos

Los Gráficos 6.7-A y 6.7-B muestran los perfiles de la componente ZZ del tensor P.O. (S_{ZZ}) y S_M , respectivamente, calculados para cada átomo de la cadena hidrocarbonada de los **AE** en las simulaciones realizadas a distintas temperaturas. Se agregó a los fines de la comparación los S_{ZZ} y S_M calculados para los AE de la simulación a 300 K (AE puro).

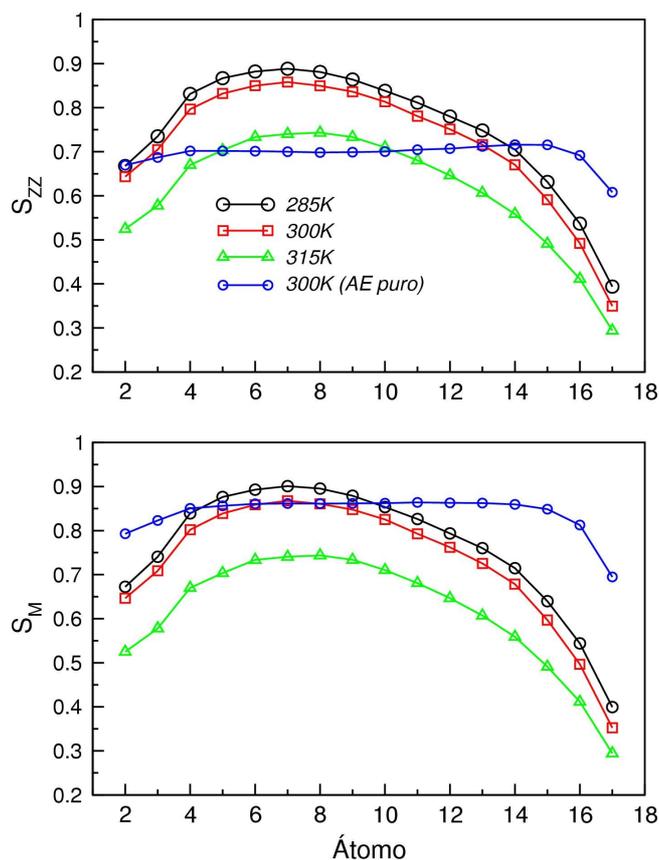


Gráfico 6.7: perfil de S_{zz} calculados para los átomos de carbono de las moléculas de AE.

Si comparamos en el Gráfico 6.7-A el perfil obtenido para el AE, en el sistema puro a 300 K (círculos azules) con el obtenido en el sistema AE/Colesterol a la misma T (cuadrados rojos) notaremos que son cualitativamente diferentes. En el sistema con colesterol no se observa el plateau entre C4 Y C15 observado en el sistema puro. Como se vio dicho plateau estaba asociado a la compacta estructura del sistema. El valor alcanzado por el S_{ZZ} en esa región estaba determinado por el ángulo de “tilt” (inclinación colectiva del eje longitudinal de los lípidos). Notar que parte del perfil de AE/Colesterol se halla por encima del perfil de AE puro. Sin embargo, como ya se discutió en diferentes apartados de los capítulos 3, 4 y 5, los

valores de S_{zz} (n) están determinados por la inclinación promedio del vector $C_{n-1}-C_{n+1}$, y por la dispersión de sus orientaciones. Por lo que estos valores por arriba de los del sistema AE puro no necesariamente indican un mayor orden impuesto a las moléculas de AE en el sistema con colesterol. Este punto se aclara y define a continuación.

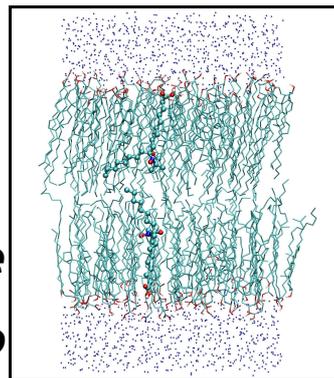
Puede observarse en el Gráfico 6.7-B que los átomos próximos al agua (C1, C2) y los próximos a la interface con la otra monocapa (C11 al C17) presentan los valores más bajos de S_M (los cuales están solo determinados por la dispersión de orientaciones, desarrollado en ítem 3.3), indicando un mayor desorden de estas partes de la molécula. Además los átomos de carbono ubicados en el centro de la monocapa (C4 al C10) presentan los valores de S_M más altos, indicando que estas zonas de la moléculas se hayan restringidas en su movilidad.

Notar que los perfiles S_{zz} y S_M calculados para los AE en los sistemas con colesterol (círculos, cuadrados y triángulos) no muestran diferencias significativas entre sí, para cada T estudiada. Esto indica que no existe un eje particular de inclinación de las moléculas de AE, hecho que es consistente con el análisis del “tilt” molecular realizada en el inciso 6.4.3. Este resultado contrasta con los valores S_{zz} y S_M para las moléculas de AE en el sistema puro, que como puede observarse muestran una forma de perfil idéntica, pero con una clara diferencia en los valores de sus plateau, aprox. 0.70 contra 0.85, respectivamente (ver Gráfico 5.8 y 5.9).

Es importante destacar en el que los valores de S_M alcanzados por los AE en el sistema con colesterol, son mas bajos que los obtenidos en el sistema sin colesterol, a 300K, llegando solo a igualarlos entre los C5 a C8. Esto indica que en promedio los AE en el sistema con colesterol presentan una mayor dispersión de orientaciones, que las correspondientes al sistema sin colesterol a la misma T.

Además puede apreciarse que los parámetros de orden disminuyen acorde aumenta la temperatura (para el sistema AE/Colesterol), pero manteniendo la misma forma, lo cual puede explicarse por la mayor movilidad de las moléculas, al aumentar la energía cinética.

CAPITULO 7



7. Bicapas de AE con 30 % de Colesterol Marcadas con ácido 10-doxil-AE

7.1. Contrucción de la bicapa con 30 % de colesterol, marcada con 10-doxil-AE (sistema B*)

Se empleó como distribución molecular inicial, las coordenadas de la bicapa pre-equilibrada de la mezcla AE/colesterol a 300 K, a la cual se le reemplazó, 2 moléculas de AE (una en cada capa), por 2 moléculas de 10-doxil-AE (preparadas según el apartado 5.1.1 y 5.1.2). Las moléculas reemplazadas se seleccionaron de tal manera que su ubicación en el plano xy fuera la más distante posible (para evitar posibles interacciones entre ellas). Finalmente se realizó una minimización de la energía total del sistema hasta que la fuerza máxima sobre un átomo cualquiera del sistema fuera inferior a $200 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ para eliminar aquellos contactos (distancias entre átomos) inapropiados, que se pudieran haber generado durante el agregado del agua y su posterior manipulación.

7.2. Protocolo de preparación de la bicapa inicial

En esta etapa se siguió el mismo protocolo empleado en el apartado 4.4. Para el caso particular de este sistema se agregaron restricciones suave en las posiciones de los O de las moléculas de colesterol, y C2 del 10-doxil-AE, en la dirección Z con las mismas constante de fuerza que las empleadas para los carbonos C2 de las cabezas de los AE. Estas restricciones se aplicaron durante las etapas del recocido.

A esta nueva configuración inicial se le realizaron simulaciones de DM a dos temperaturas de baño térmico (285 K, 300 K), con el siguiente protocolo. Las simulaciones se realizaron durante 12 ns con un tiempo de integración de 2 fs. Para ello se empleó un acoplamiento a un baño térmico [Berendsen, 1991] con un tiempo de acoplamiento de 0.1 ps y un acoplamiento a un regulador de presión [Berendsen y col., 1984] tipo tensión-superficial constante (1200 bar.nm), con una presión normal a la bicapa de 1 atm , tiempo de acoplamiento de 4 ps y una constante de compresibilidad de $6 \cdot 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$.

7.3. Observaciones acerca de los resultados de la DM

En el Gráfico 7.1 se muestran los valores de área por molécula obtenidos durante a la simulación a 300K (igual comportamiento se obtuvo a 285K). La evolución del área parece estabilizarse a partir de los 10 ns de simulación. Se monitoreó también la evolución de la fracción de diedros en conformación trans, y los perfiles de parámetros de orden, calculados en intervalos contiguos de 2ns. Estas propiedades muestran haber convergido para tiempos mayores a 10 ns que fue tomado entonces como etapa de producción.

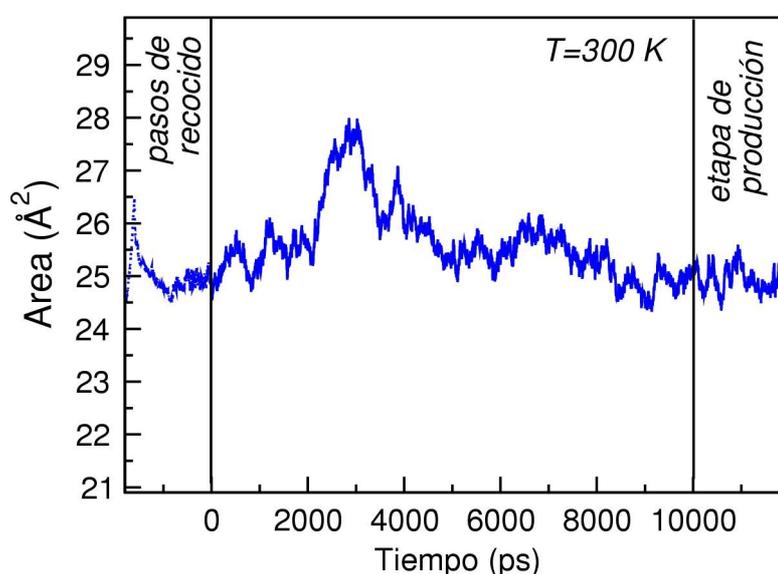


Gráfico 7.1: evolución área por molécula vs tiempo de simulación para el sistema a 300K (igual comportamiento se observó a 285K). Notar la constancia del área obtenida en el período seleccionado como de producción.

7.4. Propiedades Estructurales

La observación cualitativa de los arreglos moleculares completos a distintas T, no muestran diferencias apreciables entre sí, por lo que solo se muestra en el Gráfico 7.2 uno de los arreglos obtenidos (final 12 ns a 300K).

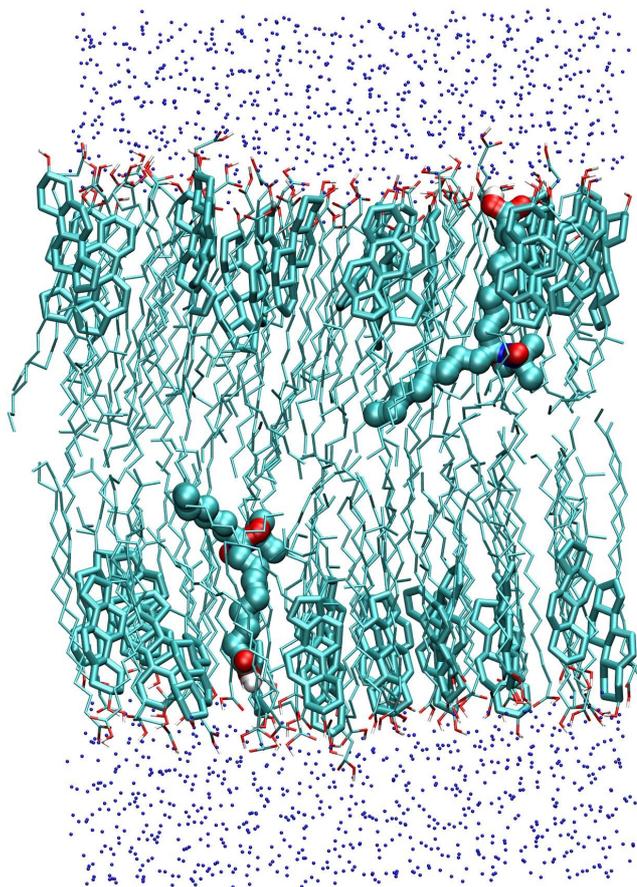


Gráfico 7.2: se muestra la distribución molecular final de la simulación a 300°K. Para mayor simplicidad de la figura solo se muestran los átomos de O de las moléculas de agua, como pequeñas esferas de color azul. Las moléculas de AE se muestran como palitos finos, los anillos del colesterol se muestran en palitos gruesos, mientras que el resto de la molécula de colesterol se muestra con palitos finos. Ambos con la convención de color CPK. Las moléculas de 10-doxil-AE, se muestran en modelos de bolas, con la misma convención de color.

En general puede decirse que el sistema se encuentra más desordenado que en las simulaciones realizadas sin colesterol, y que como consecuencia de esto las moléculas de AE no parecen mostrar ningún inclinación colectiva (tilt) apreciable de su eje principal respecto a la normal a la bicapa. Además puede apreciarse que las colas hidrocarbonadas del 10-doxil-AE (AE*) presentan un claro cambio de orientación por debajo del anillo doxil.

7.4.1. Fracción de Diedros en Conformación *trans* (AE)

La Tabla 1 muestra la fracción de diedros en conformación *trans* de las moléculas de AE, para distintas T. Se agregó además para su comparación los resultados obtenidos para el sistema B (AE/Colesterol, sin marcador). En general puede observarse que los valores de la fracción *trans* son significativamente menores que los obtenidos en los sistemas A y A* (~ 0.98). Esto indica que la inclusión de moléculas de colesterol introduce un importante desorden en el sistema como ya se podía apreciar en la imagen del sistema molecular mostrada en el Gráfico 7.2. Esta disminución observada en la fracción de diedros en conformación *trans* al pasar del sistema A* (sin colesterol) al sistema B* (con colesterol), es consistente con la disminución del largo promedio de la molécula de AE, la cual al aumentar el número de defectos *gauche*, se acorta.

Tabla 7.1: fracción de diedros en conformación *trans* de las moléculas de AE, para distintas T. Notar la disminución de la fracción de diedros en conformación *trans* a la T de 300K, en presencia del marcador (indicado en negrita).

	285K		300K	
	Sin marcador	Con marcador	Sin marcador	Con marcador
Promedio	0.91	0.90	0.89	0.87
Desvío Estándar	0.02	0.02	0.02	0.02

Notar la marcada disminución de la fracción de diedros en conformación *trans* a la T de 300K (0.89 a 0.87). Este significativo efecto de la temperatura sobre el comportamiento de los diedros no se manifestaba en las simulaciones de AE puro con 10-doxil-AE, donde la perturbación realizada por el marcador era mucho menor.

El espesor de este sistema mostró un comportamiento similar al del sistema AE/colesterol a cada temperatura, con importantes fluctuaciones del orden de 10 Å. Los sistemas simulados sin colesterol (A, A*) mostraron un espesor mayor que los simulados con colesterol (B, B*). Este hecho, es observado en sistemas experimentales al pasar de una fase tipo “gel” a una “líquido cristalina” como consecuencia del aumento de la fluidez.

El largo promedio de las moléculas de AE (estimado como la

distancia entre el C1 y el C18) se comportó de forma similar en las simulaciones realizadas con y sin el marcador, para los sistemas con B y B*, pero fueron significativamente menores que los obtenidos para los sistemas A y A*, indicando que estas moléculas presentan un plegamiento de la cadena alquílica que reduce el largo de la molécula, como se mostrará más adelante.

7.4.2. Superficie por Molécula

En este sistema molecular mixto resulta necesario emplear para el cálculo del área un procedimiento basado en la ocupación estadística promedio de cada especie molecular en una grilla de puntos definida en una capa de la caja de simulación (plano perpendicular a la caja simulación), como ya fué descrito en el apartado 5.2.4.

El sistema mixto AE-Colesterol (sistema B) presenta un perfil de área molecular a distintos valores de profundidad de la bicapa que depende sensiblemente de la profundidad a la cual se lo analice. Se pueden definir 2 zonas: una que coincide con la región de los anillos de colesterol (que llamamos R en la Tabla 2), y otra por debajo de los mismos (zona T). La resume los resultados obtenidos para todos los sistemas estudiados, marcados y sin marcar. Los valores citados han sido calculados como el promedio en la zona donde el área local alcanza un plateau. Puede deducirse de los valores mostrados, que la introducción de la molécula de AE marcada produce un significativo aumento del área promedio por molécula de AE y colesterol, en condiciones de tensión superficial constante. Este incremento del área promedio de los AEs es aún mayor que la producida en el sistema simil-gel, A/A*. La zona del perfil z que presenta las menores áreas promedio de los AE coincide con la zona donde las moléculas de colesterol ubican sus anillos rígidos y tienen mayor área (zona R). Por el contrario, en la zona que llamamos T las áreas promedio de las moléculas de AE aumentan y las de colesterol disminuyen. Es importante enfatizar que a pesar de que este sistema es muy desordenado (símil Liq. Ordenado), la introducción de las moléculas marcadas produce un cambio muy importante en esta propiedad a la concentración analizada. Las área promedio de las moléculas de AE en los sistemas A* y B* son muy similares, aunque las fases son de naturaleza muy diferentes.

Tabla 7.2: área molecular promedio de diferentes especies moleculares en los sistemas A, A*, B y B* en Å².

	AE		Colesterol		AE*
	zona R	zona T	zona R	zona T	
AE puro (sistema A)	13.33 ± 0.02	----	----	----	----
AE puro+AE* (sistema A*)	13.64 ± 0.02	----	----	----	28.28 ± 0.08
AE/Colesterol (sistema B)	12.75 ± 0.02	14.36 ± 0.03	24.58 ± 0.04	16.37 ± 0.05	----
AE/Colesterol/AE* (sistema B*)	13.79 ± 0.03	15.23 ± 0.04	25.00 ± 0.05	----	38 ± 2

Los valores se calcularon a partir de los plateaus observados en los perfiles de área molecular vs profundidad de la bicapa (dirección Z). Para los sistemas B y B* los valores mostrados, se tomaron de diferentes zonas (zona R a la profundidad del anillo de colesterol y la zona T más profunda). En particular en el sistema B*, el perfil de área de las moléculas de colesterol disminuye hacia el interior de la bicapa, por lo que el valor en la zona T no está bien definido. Para comparar se incluyeron los valores correspondientes a los sistemas A y A*. Como estos sistemas no contienen colesterol solo se muestra un único valor.

7.4.3. Tilt Z

La Tabla 7.3 muestra el ángulo de inclinación definido por el vector promedio C1-C18 de las moléculas de AE y la normal a la bicapa. Se muestra además el desvío estándar del ángulo azimutal definido para el vector C1-C18 (ángulo definido por la proyección del vector promedio C1-C18 sobre el plano XY y el eje X del sistema de coordenadas). El elevado valor de esta última cantidad indica que la inclinación de los AE no es colectiva, como podría haberse anticipado de la imagen molecular del sistema (Tabla 7.3). Por lo tanto este sistema no presenta, lo que denominamos “tilt”, es decir una inclinación coordinada en la misma dirección del vector que contiene al eje largo molecular. El ángulo de inclinación es significativamente menor para este sistema mixto, que para los sistemas AE puro y AE/AE* (Tabla 5.3). La presencia de colesterol restringe a las moléculas de AE a orientarse con su eje largo casi perpendicular a la superficie. El ángulo de inclinación y azimutal se calcularon como el promedio sobre todas las moléculas no marcadas de AE y sobre todo el tiempo productivo de simulación.

Tabla 7.3: ángulo de inclinación (θ), desvío estándar del ángulo de inclinación (σ_θ) y desvío estándar del ángulo azimutal (σ_ϕ) de los AEs del sistema B y B*. Unidades en grados.

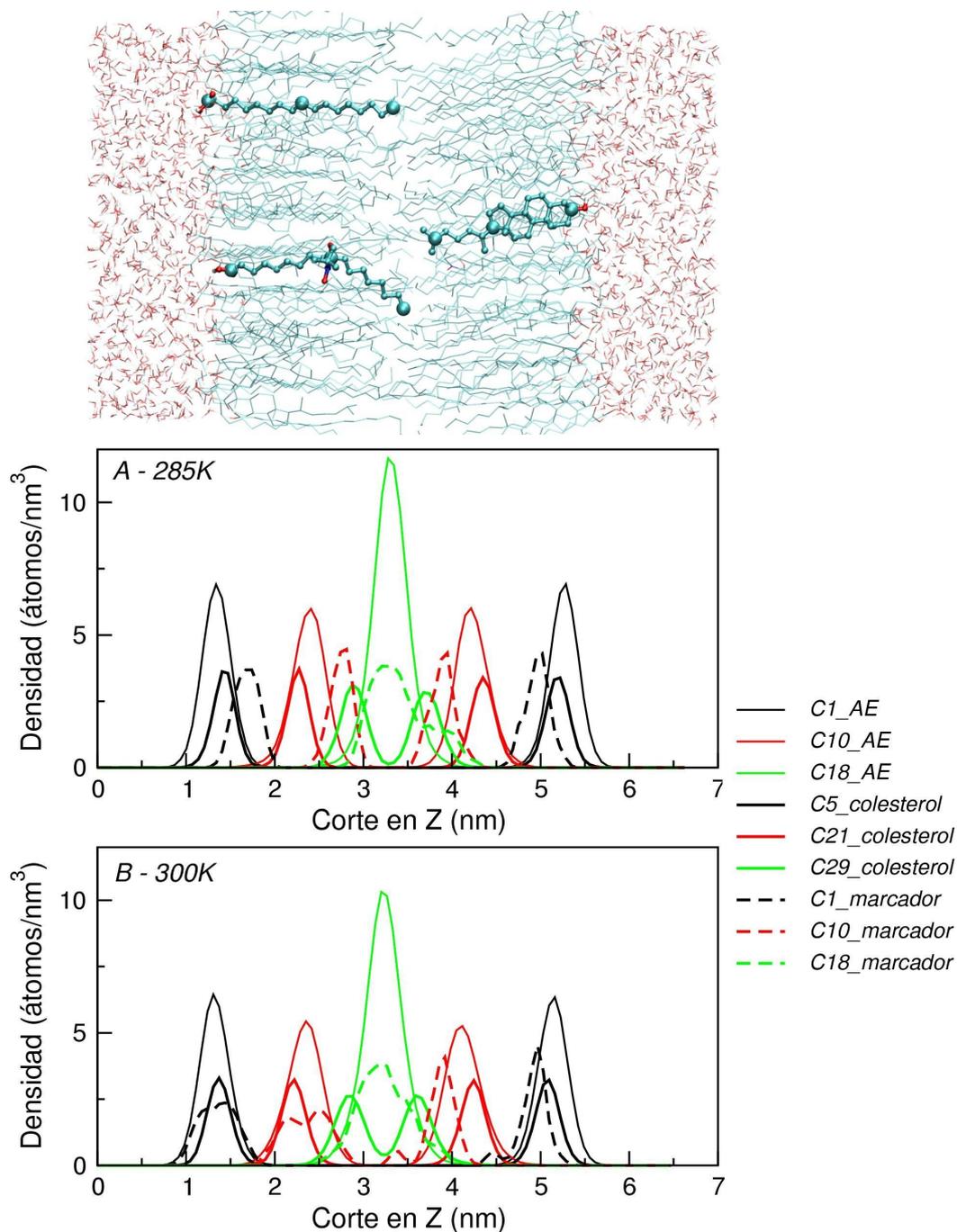
	Sin SA* (system B)			Con SA*(system B*)		
	285K	300K	315K	285K	300K	315K
θ	8°	8°	8°	5°	11°	9°
σ_θ	1°	1°	2°	1°	1°	2°
σ_ϕ	111°	111°	90°	117°	222°	173°

7.4.4. Perfiles de Densidad de Átomos

El Gráfico 7.3 muestra el perfil de densidad (número de átomos promedio en cada corte de la caja de simulación) de los átomos de carbono C1, C10, C18 del AE; C1, C10, C18 del 10-doxil-AE y C5 (carbono inicio anillo colesterol), C21 (carbono final anillo colesterol) y C27 final cola colesterol, tomados como referencia. En la parte superior se muestra con la finalidad de facilitar la lectura, la caja de simulación orientada en la dirección de los cortes efectuados. Si comparamos este gráfico con el obtenido de las simulaciones sin colesterol, notaremos que el C1 y el C10 del 10-doxil-AE se ubica más hacia el centro de la bicapa. Los anillos de las moléculas de colesterol producen importantes impedimentos estéricos sobre el anillo doxil, forzando a éste a desplazarse hacia el interior de la bicapa (el anillo doxil se halla unido a C10), arrastrando consigo el resto de la molécula (internalización del C1).

El perfil de densidad de C10 y C18, muestra que ambos átomos se ubican a profundidades similares, lo cual puede explicarse si observamos la forma molecular global del 10-doxil-AE, que se muestra en la parte superior del Gráfico 7.3. Esta estructura presenta una forma claramente plegada en la posición que se inserta el anillo, mostrando la parte C11-C18 una ubicación muy inclinada respecto a la normal a la bicapa. El perfil de densidad obtenido de la simulación a 300 K presenta la peculiaridad de mostrar en la capa 1 dos picos de densidad para los átomos C10 del 10-doxil-AE. Uno de ellos, más hacia el interior de la bicapa en relación al pico del carbono final del anillo de colesterol (C21) (consistente con lo discutido más arriba); y el otro pico, compartiendo aproximadamente la misma profundidad que el C21 del anillo de

colesterol. Para comprender este resultado se estudió el comportamiento del sistema entre 8 y 12 ns.



De la evolución temporal del sistema puede apreciarse que en los primeros 1 a 2 ns de ese intervalo, el grupo doxil se halla solo rodeado por AE, permitiendo que el marcador se mueva con libertad y que los C10 puedan compartir la misma profundidad que los C21 del colesterol (parte final del anillo), porque en realidad no se hayan próximos espacialmente.

Pero pasados los 2 primeros ns, el C10 del 10-doxil-AE se aproxima a moléculas de colesterol, las cuales restringen su espacio de movimiento, y lo obligan a ubicarse por debajo del anillo de colesterol (C21).

Es importante tener en cuenta que solo se cuenta con una molécula marcadora en cada capa del sistema simulado, por lo que el tiempo requerido para que estas moléculas difundan lateralmente y exploren todos los entornos localmente accesibles está más allá de nuestro alcance computacional, particularmente en el sistema abordado en este capítulo. Por lo tanto, nuestra aproximación fue evaluar localmente las propiedades promedio de la molécula marcadora, en dos entornos relevantes: a) próximo a moléculas de colesterol y b) próximo a moléculas de AE. Esto es equivalente a seguir el movimiento de la molécula marcadora en 2 entornos moleculares diferentes. Estos promedios se calcularon después que el área por molécula y otras propiedades globales del sistema hubieran convergido, por lo que aceptamos que estos promedios corresponden a una situación de equilibrio. Esta aproximación introduce limitaciones en la exactitud de los propiedades promedio obtenidas, pero nos permitió obtener una imagen significativa del comportamiento del marcador de espín en estos sistemas, la cual no ha sido previamente reportada.

7.5. Parámetros Dinámicos

7.5.1. Parámetros de Orden de los AE

Dentro de este apartado se analizan aquellos parámetros que se hallan relacionados a propiedades dinámicas del sistema como son los parámetros de orden (P.O.) de los átomos de las cadenas hidrocarbonadas de los AE sin marcar (S_{zz}). El Gráfico 7.4 A y B muestra los S_{zz} y S_M de los

átomos de carbono de las cadenas alquílicas para las moléculas de AE y se agregó para comparar los perfiles correspondientes a los AE obtenidos en las simulaciones de los sistemas AE/colesterol (sin 10-doxil-AE). Puede apreciarse que los perfiles S_{ZZ} y S_M a 285 K de los sistema simulados con y sin 10-doxil-AE son muy semejantes. Mientras que los obtenidos a 300 K muestran una marcada diferencia; los perfiles obtenidos de la simulación con 10-doxil-AE, muestra valores significativamente más bajos, que los de la simulación sin este marcador, mostrando que este induce una disminución del orden a esa T. Esta disminución del orden presenta una buena correlación con la disminución de la fracción *trans* observada a esta T, la cual su vez se corresponde con el acortamiento del largo promedio de las moléculas de AE, como se adelantó en el inciso 7.2.2.

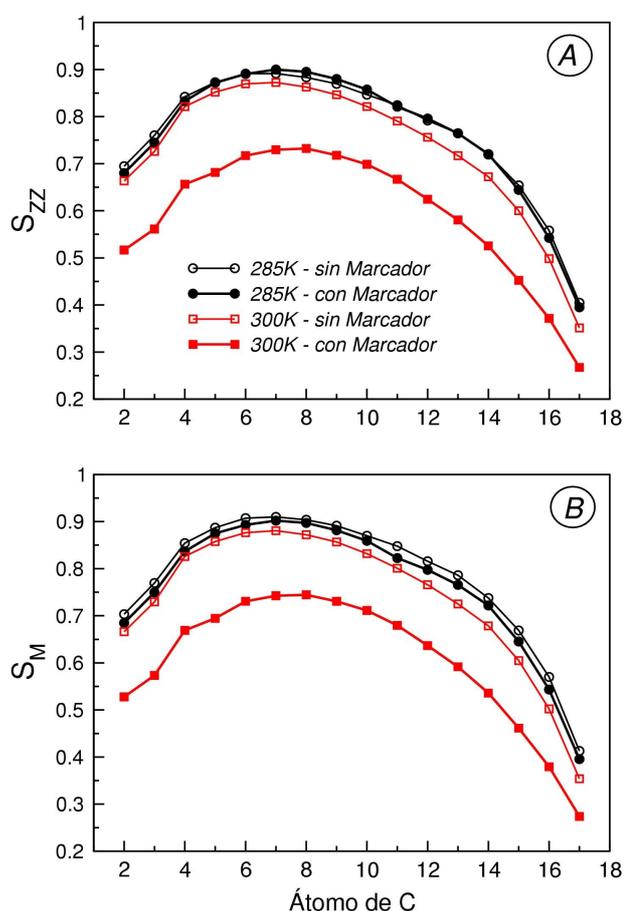


Gráfico 7.4: parámetros de orden (S_{ZZ}) de los átomos de carbono de las cadenas alquílicas para las moléculas de AE. Se agregó para comparar los perfiles de S_{ZZ} de los AE obtenidos en las simulaciones de los sistemas AE/colesterol (sin 10-doxil-AE).

Podemos notar que los valores de S_{ZZ} de los AEs disminuyen hacia la interface con el agua y hacia el límite entre las dos monocapas,

indicando que las cadenas alquílicas se hallan más desordenadas en esas zonas. Mientras que los átomos de carbono ubicados en el centro de la monocapa presentan un menor desorden (parámetros de orden más altos), alcanzando un máximo entre los carbono 7-8. También se puede apreciar que los perfiles de S_{zz} se desplazan a valores más bajos con el aumento de la T, indicando un aumento de desorden provocado por esta variable.

En el Gráfico 7.5 se muestran los perfiles de autovalores máximos del tensor \mathbf{S} promedio (S_M) para los AE en los sistemas B, B*, calculados a 300K. También se incluyeron los perfiles S_{zz} del sistema B para comparar con los anteriores. Notar que los perfiles S_{zz} y S_M mostrados para el sistema B (AE+Colesterol) son prácticamente coincidentes, indicando que la componente orientacional en el parámetro de orden es poco significativa y que por lo tanto en un sistema donde no existe “tilt” (inclinación colectiva de las moléculas) el S_{zz} refleja el estado de desorden.

Se puede notar el cambio en los perfiles de S_M al pasar de los sistemas A(triángulo), A*(equis) al B(círculos llenos); mostrando este último valores más bajos hacia la interface con el agua (C 1-2) y también hacia el interior de la bicapa (C 11-17). También es destacable el descenso significativo en el perfil S_M de los AE en el sistema B*, indicando que el agregado de una molécula marcada fue suficiente para provocar un cambio significativo en el orden del sistema, a la concentración 1.4 %, estudiada en este trabajo.

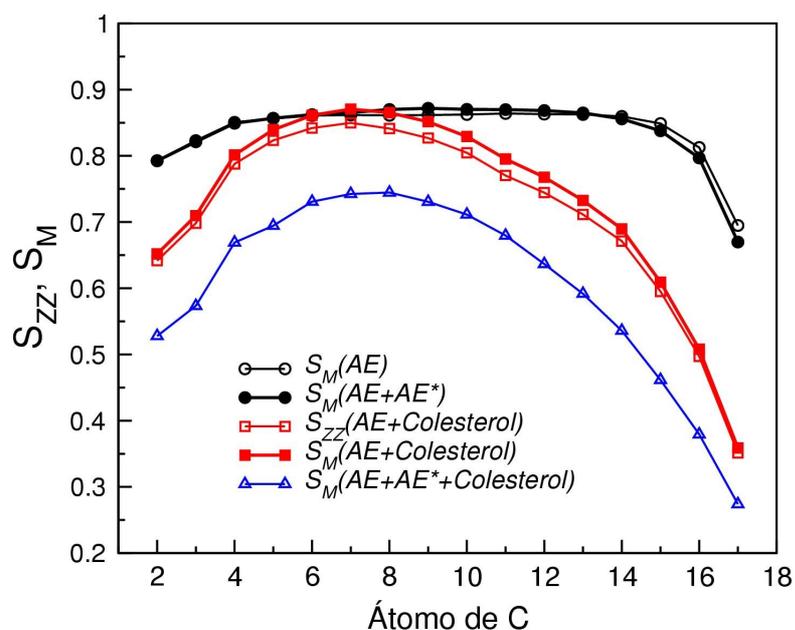


Gráfico 7.5: perfiles S_{zz} y S_M calculados para los AE de los sistemas A, A*, B y B* como función de la posición del átomo de carbono en la cadena alquílica, calculados de DM a 300K.

Este efecto también se observó con los valores de la fracción **trans**, la cual sufrió un descenso significativo con el agregado del marcador al sistema B (de 89 % a 87 %). Esta última observación indica que a T=300K la inserción del marcador perturba significativamente la energía de cohesión del sistema.

7.5.2. Análisis de Clusters y P.O. del Marcador

En estas simulaciones, al igual que las realizadas con el marcador (AE*) en AE puro, el perfil de los P.O. ($S_{zz}(i)$) de los átomos de carbono del 10-doxil-AE mostraron importantes fluctuaciones cuando eran calculados en distintos intervalos de tiempo. Por lo que decidimos realizar el mismo análisis empleado en el apartado 5.3.2, donde empleamos el algoritmo de Daura y col [Daura y col., 1999], para clasificar las estructuras encontradas durante la simulación. Este procedimiento identifica como pertenecientes a un mismo cluster o grupo, aquellas estructuras que presentan un desvío cuadrático (RMSD) menor a un valor de corte (cutoff) establecido, previo ajuste de las estructuras analizadas. En la Tabla 7.4 se muestran los porcentajes de estructuras pertenecientes a los principales clusters respecto del total de estructuras analizadas, para cada T.

Tabla 7.4: porcentajes de estructuras pertenecientes a los principales clusters respecto del total de estructuras analizadas, para cada T.

	285 K	300 K
Cluster 1	81.4	72.3
Cluster 2	14.3	5.7

Los clusters mayoritarios fueron aquellos que contaron con el mayor número de estructuras respecto del total analizado y se denominaron en forma decreciente como, cluster 1, cluster 2, etc. Dado que la suma de los clusters 1 y 2 representan 95 (285K) y 78 % (300K) de las estructuras analizadas respectivamente, se decidió solo analizar el comportamiento de estos grupos. Puede observarse que los 2 clusters mayoritarios (1 y 2) muestran una leve tendencia a disminuir con la T; indicando su disminución el aumento de otros grupos de menor preponderancia.

Si analizamos estos resultados teniendo presentes las estructuras que representan estos clusters (Gráfico 7.6), notaremos que el número de segmentos de cadenas alquílicas con defectos gauche (mostrado con líneas) en la zona del anillo doxil, es el mismo en ambos clusters (1 gauche).

Esto indica que en la zona del anillo doxil, la cadena hidrocarbonada de ambos clusters presentan aproximadamente el mismo plegamiento. La diferencia fundamental entre uno y otro parece deberse al cambio de orientación de la cadena alquílica por debajo del anillo, que solo se da en el cluster 2.

Es importante recordar aquí que el cluster mayoritario de las simulaciones realizadas **sin colesterol** (cluster 1), presentaba 2 defectos gauche consecutivos en la zona del anillo, contra solo 1 del cluster 1 de las simulaciones **con colesterol**. Ese segundo defecto gauche en la molécula del marcador (sistema A*), compensaba el cambio de orientación producido por el primero, haciendo que la molécula quedara aproximadamente lineal. Por el contrario el cluster 1 de las simulaciones con colesterol, presenta un marcado cambio de dirección de su cadena alquílica (molécula doblada), debido a que solo presenta un único defecto gauche en la zona del anillo doxil. Este resultado podría indicar que las simulaciones realizadas con colesterol, le

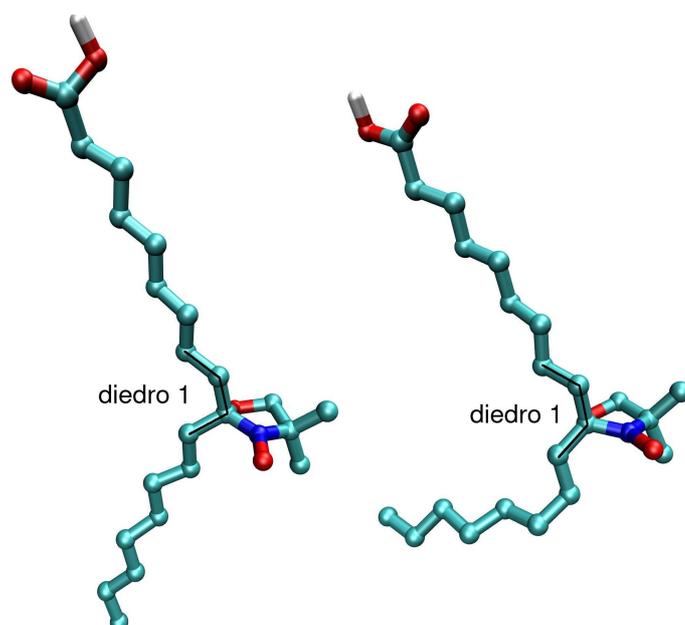


Gráfico 7.6: estructuras moleculares que representan a cada uno de los clusters encontrados. Se resaltó en líneas de color negro los diedros que se hallaban implicados en los cambios conformacionales más importantes de la molécula.

permiten al 10-doxil-AE alcanzar la estabilidad, realizando un importante cambio de dirección de la cadena alquílica (por debajo del anillo del colesterol), debido al menos en parte al aumento del espacio disponible generado por el colesterol al romper la regularidad del sistema AE puro, como se discutirá más adelante.

Recordemos antes de analizar el comportamiento temporal de los ángulos diedros relacionados a los defectos gauche, que el cutoff empleado para la identificación de los clusters, se seleccionó suficientemente grande como para reconocer cambios moleculares globales. Por lo que pueden clasificarse como pertenecientes al mismo cluster moléculas que no necesariamente presenten los mismos ángulos diedros. Podría incluirse dentro del mismo cluster, moléculas con una secuencia de ángulos diedros distinta, que produjeran la misma conformación global.

En este contexto, si analizamos la distribuciones de ángulos que presentan los diedros que contienen al anillo doxil de ambas simulaciones, para el cluster mayoritario (Gráfico 7.7), notaremos que presentan cierta preferencia por la conformación *gauche*. El diedro 1(8-9-17-18), muestra igual frecuencia de aparición en las 2 variantes posibles de la conformación *gauche*

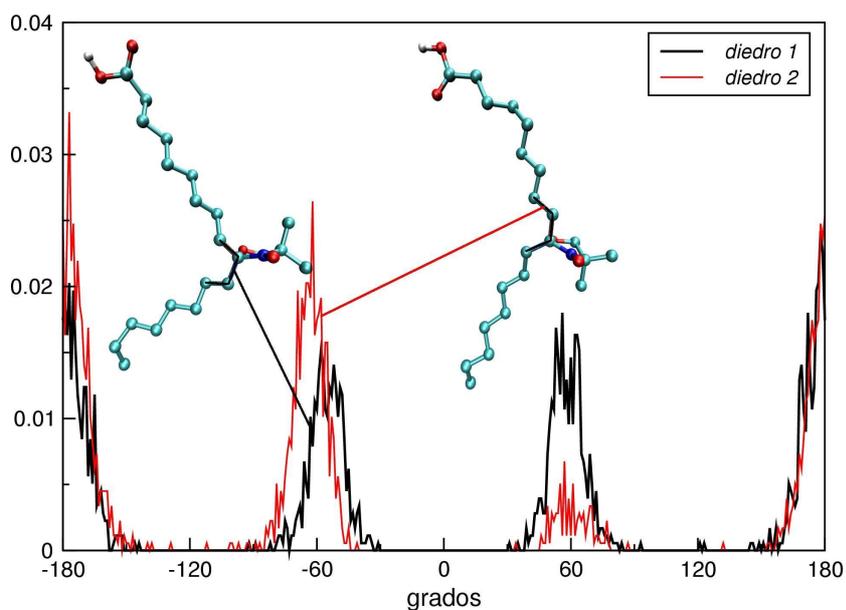


Gráfico 7.7: distribución de frecuencias de ángulos encontradas a distintas temperaturas para los 2 diedros que presentaron defectos gauche en los clusters.

(+60° y -60°), mientras que el diebro 2 (7-8-9-17) muestra preferencia solo por una de ellas (-60°). Ambos diedros, se van alternando secuencialmente, de tal manera que la forma global de la molécula se mantiene constante.

Para la interpretación de los PO en el contexto del análisis antes realizado, se calcularon los S_{zz} para cada átomo de carbono de la cadena alquílica del 10-doxil-AE, promediado sobre toda la simulación (para cada T), y promediados sobre los intervalos de tiempo que le correspondía a un cluster “puro”. Entendiendo por cluster “puro” aquella zona temporal donde predominara el cluster en estudio.

El Gráfico 7.8 muestra los $S_{zz}(i)$ calculados como el promedio sobre la trayectorias a cada temperatura y el correspondiente al período de tiempo donde dominaron los clusters mayoritarios en forma casi exclusiva.

El Gráfico 7.8-A (285 K) muestra los S_{zz} promedio, calculados para la temperatura de 285 K y el correspondiente al período de tiempo donde dominó el cluster 1 en forma casi exclusiva. Podemos observar la buena correlación que muestran las curvas. Típicamente los S_{zz} de los átomos de carbono 2 al 9 muestran valores muy altos del orden de 0.8, para luego caer en forma acentuada desde el carbono 10 al 17 a valores entre 0 a 0.2. Estos bajos

valores de S_{zz} , son consecuencia del importante cambio de orientación que sufre el anillo doxil en esta simulación y serán analizados en el próximo ítem.

En el Gráfico 7.8-B (300 K) se muestra los S_{zz} promediados sobre la etapa productiva de la trayectoria (círculos llenos) y los S_{zz} promedio del cluster 1, por ser éste el más importante cuantitativamente. Notar la buena correlación mostrada por las curvas. La forma general del perfil de S obtenido fue similar al obtenido a 285 K, pero a diferencia de éste el C10 posee un S_{zz} muy elevado (aprox. 0.7).

Estos resultado podrían indicar que los átomos de carbono C2 al

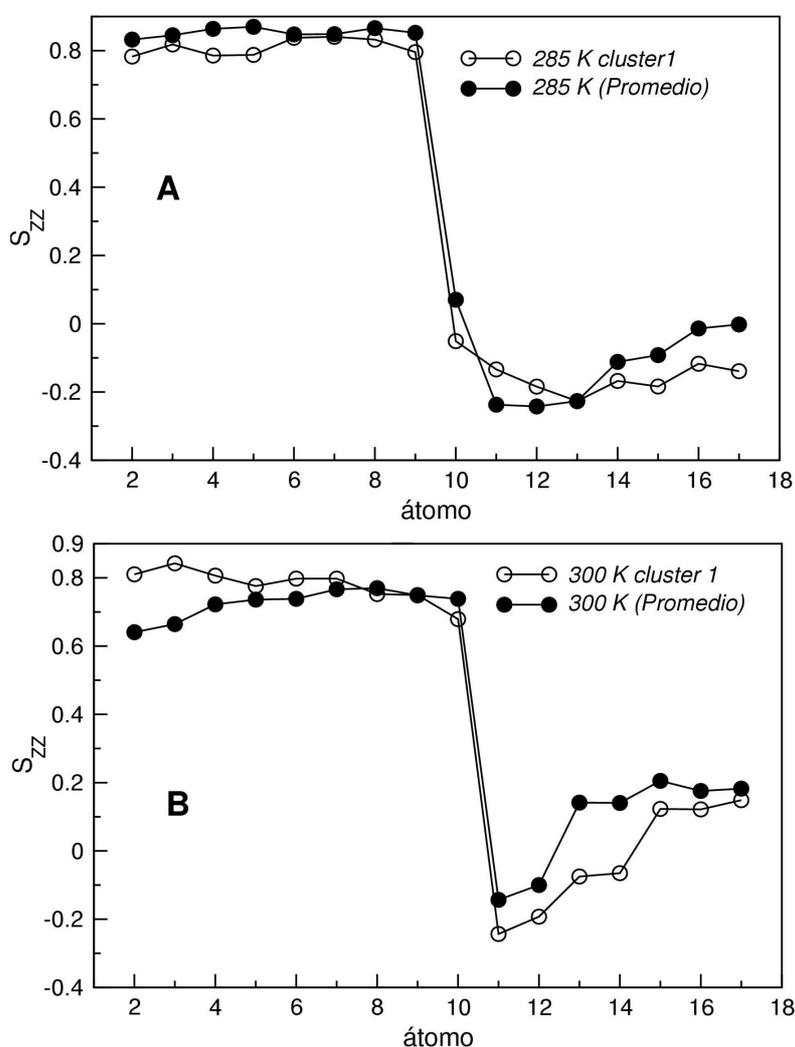


Gráfico 7.8: parámetros de orden S calculados como el promedio sobre la trayectorias a cada temperatura (círculos negros llenos) y el correspondiente al período de tiempo donde dominaron los clusters mayoritarios en forma casi exclusiva (círculos abiertos). Los gráficos A y B muestran los resultados obtenidos para las simulaciones a 285K y 300K, respectivamente.

C9 estarían restringidos en cuanto a su movilidad en virtud de los elevados S_{zz} mostrados, debido a los problemas estéricos introducidos por los anillos de colesterol. Mientras que los átomos que se hallan por debajo del anillo mostrarían una mayor movilidad evidenciado por los bajos S_{zz} que presentan. El anillo doxil, se ubica por debajo del anillo de colesterol, haciendo que la molécula de 10-doxil-AE presente, dos partes bien diferenciadas. a) la parte por encima del anillo doxil (C2 al C9) muy ordenada debido a su proximidad con el anillo de colesterol, el cual introduce importantes impedimentos estéricos. b) la parte por debajo del anillo doxil (C11 al C17), más desordenada, debido a que allí encuentra el espacio suficientemente, para moverse con mayor libertad. Estos resultados fueron consistentes con los resultados de área por molécula, donde se pudo comprobar que el área promedio de los AE disminuye en la zona de los anillos de colesterol y aumenta por debajo de estos.

El Gráfico 7.9 muestra los perfiles S_{zz} y S_M calculados para el marcador en el sistema B* a 300K. También se agregó para comparar con los anteriores el perfil S_M correspondiente al marcador en el sistema A*. En primera instancia se debe destacar que tanto el perfil de S_{zz} (círculos) y S_M (triángulos) del marcador (AE*) en el sistema con colesterol son claramente diferentes, indicando que el marcado descenso observado en los valores de S_{zz} entre los átomos de C 11 a 17 es consecuencia del cambio de orientación que sufre la cola hidrocarbonada por debajo del átomo 10, y que es donde se halla unido el anillo doxil. Por otra parte también puede apreciarse que el perfil S_M (triángulos) del marcador mostró valores similares, entre los carbonos C4 y C10 a los observados para los AE sin marca (cuadrados) en el mismo sistema (B*). Los valores de S_M del marcador (triángulos) desde el C10 al C17 tomaron valores más bajos, que los correspondientes al AE en el mismo sistema (cuadrados), indicando que en esta zona el marcador, presentaba una mayor movilidad. Esto indicaría que el comportamiento dinámico del marcador en un sistema desordenado (similar Liq. Ordenado) se parece al del entorno donde se halla. Este resultado es contrastante con el obtenido para el sistema similar-gel (A, A*), donde el marcador mostraba un perfil de S_M claramente diferente al de los AE no marcados del entorno, con un descenso significativo de sus valores en los carbonos C8 y C9. Finalmente, puede apreciarse que el perfil S_M del

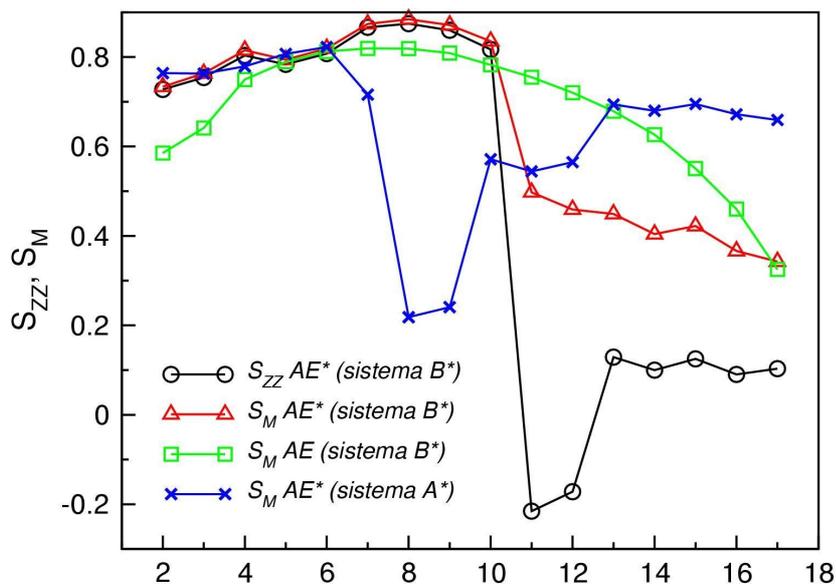


Gráfico 7.9: perfiles S_{ZZ} y S_M para la molécula del marcador en el sistema B^* . También se incluyó el perfil S_M del marcador en el sistema A^* . Notar que el perfil S_M del marcador en el sistema sin colesterol (equis) es completamente diferente a la observada en el sistema con colesterol (círculos abiertos).

marcador en el sistema A^* (equis) es diferente del observado en el sistema con colesterol (B^*).

En la Tabla 7.5 se muestran los valores de S_{ZZ} y S_M para el sistema B^* , a las T estudiadas. Todos los valores se calcularon como el promedio entre las 2 monocapas.

Puede apreciarse la notable similitud de valores mostrada por los S_{ZZ} y S_M de las moléculas de AE sin marcar para la misma T de simulación. Esto último resulta razonable si tenemos en cuenta que las moléculas de AE no presentan tilt en este sistema y por lo tanto un cambio del sistema de coordenadas (diagonalización del tensor \mathbf{S}) no producirá un cambio significativo en los valores de los parámetros de orden.

Por otra parte, se observa que tanto los S_{ZZ} , como los S_M de los AE sin marcar, disminuyen con el aumento de T . Lo cual se puede justificar por el aumento de E cinética del sistema, que resulta en un aumento del desorden.

Tabla 7.5: valores de $S_{zz}(10)$ and $S_M(10)$ de los AE marcados y no marcados en el sistema B^* a las temperaturas simuladas. Se incluyeron sus respectivos tiempos de correlación rotacional. Todos los valores se calcularon como el promedio entre las 2 monocapas.

	Temperatura	
	285 K	300 K
$S_{z,z}(10)$ AE	0.85	0.70
$S_M(10)$ AE	0.86	0.71
τ^A de AE en el sistema B^*	51 ps	47 ps
$S_{z,z}(10)$ AE*	0.07	0.81
$S_M(10)$ AE*	0.24	0.83

Para el caso del marcador los resultados son más complejos de analizar. A 285 K podemos notar que el marcador presenta un S_{zz} (0.07) notablemente bajo, y compatible con el cambio de orientación observado en el anillo doxil a esta T. El valor de S_M (0.24), obtenido al cambiar el sistema de referencia a esta T, indica que a pesar de eliminar la componente de orientación de la molécula, existe una gran dispersión de orientaciones a esta T. A 300K los valores observados de S_{zz} y S_M son similares y elevados (0.81, 0.83 respectivamente), indicando que la distribución de orientaciones de los vectores C9-C11a esta T, es más restringida. A 285K el C10 se ubica bien por debajo de los anillos de colesterol, como puede observarse del perfil de densidad a esta T (Gráfico 7.3). Bajo tales condiciones la perpendicular al anillo doxil toma una inclinación promedio de 55 °. A 300 K la molécula marcada se desplaza hacia la fase acuosa como puede apreciarse de la comparación de los perfiles de densidad de C10 y C1 a ambas T (). Este desplazamiento empuja el anillo doxil hacia las zona de los anillos de colesterol donde existe menos espacio disponible, y por lo tanto con mayores restricciones estéricas. En esta situación la inclinación promedio de la normal al anillo doxil es de aproximadamente 21°. Estos hechos explican el incremento de $S_{zz}(10)$ y $S_M(10)$ del marcador a una T más elevada. A pesar de que se necesitan simulaciones mas largas para muestrear con exactitud estas diferentes situaciones, estos resultados muestran que estos efectos están presentes y deben tenerse en cuenta cuando se interpretan resultados de RPE.

Describiremos a continuación la movilidad molecular evaluada a

través de las funciones de autocorrelación de wobbling y axial definidas en el capítulo 5. A partir de estas se calcularon los tiempos de correlación axial (τ^A) y de wobbling (τ^W) para el sistema AE/colesterol/AE*.

Podemos apreciar de la que los valores de τ^A disminuyen con el aumento de T, indicando que los movimientos rotacionales del marcador pierden correlación más rápido con el aumento de T. Este aumento del “desorden” relevado por el τ^A se corresponde con la disminución de los parámetros de orden y de la fracción de ángulos diedros en conformación *trans*, así como también con el aumento de área observado en el sistema, cuando la misma es calculada a la profundidad del anillo doxil. El aumento del área permitiría que el anillo doxil se moviera con mayor libertad y por lo tanto, sus movimientos rotacionales perdieran correlación más rápidamente.

En las bicapas de AE/AE*, las restricciones estéricas impuestas por la regularidad del sistema, conduce a la molécula marcada a introducir 2 defectos gauche próximos al anillo doxil, para así poder ajustarse en la estructura compacta de la bicapa. En el caso del sistema AE/Colesterol/AE*, las moléculas de colesterol toman el rol de espaciadoras para poder acomodar el anillo doxil.

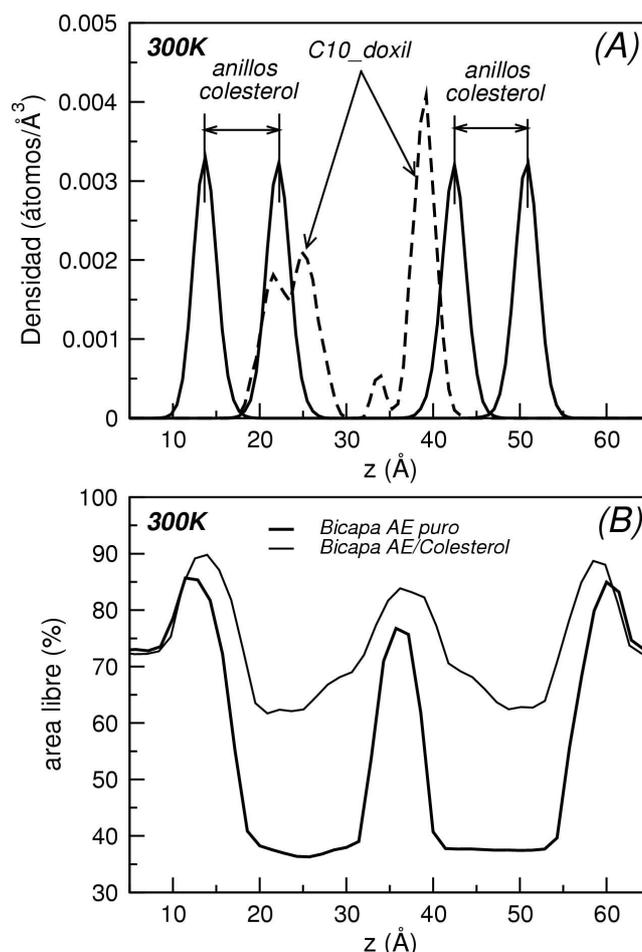


Gráfico 7.10: área libre calculada para el sistema B (AE/Colesterol) (línea gruesa) y para el sistema A (AE puro) (línea fina), ambas a 300K.

En el Gráfico 7.10-A se reproducen del 7.10-B las posiciones promedio ocupadas por los átomos C5 y C21 de las moléculas de colesterol (los cuales definen las posiciones de los anillos) y el perfil z de los átomos C10 del AE*, que indican la posición del anillo anillo doxil. -B muestra el área no ocupada por moléculas (área libre) calculada mediante el procedimiento de grilla, citado más arriba. De la observación conjunta de ambos gráficos puede observarse que por debajo del anillo de colesterol, la fracción de espacio libre de ocupación molecular, comienza a aumentar. De este hecho puede concluirse que la molécula marcada ubica su anillo doxil y el resto de su cola hidrocarbonada, preferencialmente por debajo de los anillos de colesterol, donde se encuentra más espacio disponible. En ese lugar, el AE* puede cambiar de dirección sul eje largo molecular (observar) sin recurrir a la introducción de defectos gauche. Este plegamiento de la cadena del AE* se refleja en el abrupto cambio de los $S_{zz}(i)$ observado en la molécula marcada (Gráfico 7.9), círculos llenos), los cuales no se aprecian en los S_M (Gráfico 7.9,

círculos vacíos). Sin embargo, el descenso observado en este último perfil SM es consistente con la imagen de una mayor movilidad de la parte final de la cadena alquílica.

En el Gráfico 7.11 podemos observar las funciones de correlación axial (F_C^A) y tambaleo o wobbling (F_C^W) calculadas para los AE y AE*. En este punto, puede anticiparse que el comportamiento de aquellos AE

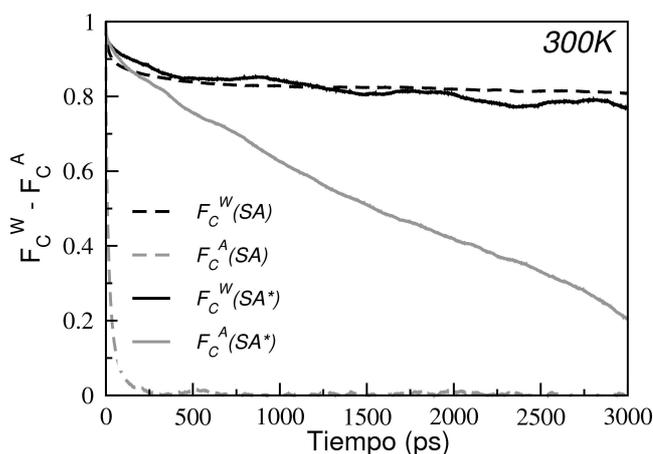


Gráfico 7.11: funciones de autocorrelación axial y de wobbling para AE y AE* en el sistema AE/Colesterol/AE* a 300K.

que se hallen próximos a moléculas de colesterol será diferente al de aquellos que no lo están. No obstante, decidimos analizar el valor promedio sobre todas las moléculas de AE del sistema. El aumento de defectos gauche de este sistema (B*), afecta la linealidad estructural de las moléculas de AE, las cuales en consecuencia rotan en forma más restringida.

Los tiempos de correlación estimados para las moléculas de AE* son respectivamente $\tau_D^W \sim 24 ns$ y $\tau_D^A \sim 2 ns$, los cuales son menores a los correspondientes valores en fase simil-gel (sistema A*).

7.6. Espectros de RPE calculados a partir de la DM

Una vez caracterizado el comportamiento a escala molecular del marcador de espín inserto en la bicapa lipídica, era importante relacionar estas propiedades con las características del espectro de RPE.

Para relacionar los resultados de la simulación de DM con las características espectrales, se usó el modelo expuesto en el capítulo 4. Los tiempos de simulación alcanzados imponen a los resultados del modelo 2

limitaciones: 1) La distribución de orientaciones de la normal al anillo (que identifica la orientación del orbital magnético) puede no haber sido completamente muestreada; y 2) la estimación de los tiempos de correlación adolece de importantes errores debido a que es estimada a partir del decaimiento inicial de las funciones. De ambas limitaciones la segunda es posiblemente la más crítica. Sin embargo a pesar de estas limitaciones resulta relevante estudiar como diferentes aspectos del comportamiento del marcador determinan las características espectrales.

Se calcularon los espectros de RPE a partir de la distribución estática de los ángulos θ y ϕ que forma el vector normal al anillo doxil, respecto al eje z (normal a la bicapa), según el formalismo descrito en el capítulo 4. El Gráfico 7.12 muestra en líneas de nivel, la densidad de probabilidad del vector normal al anillo doxil, en función de los ángulo θ , ϕ para cada T. Para mayor simplicidad solo se muestra la distribución de probabilidad del vector normal al anillo en una de las monocapas.

Notar que el vector seleccionado a 285K está orientada en sentido contrario al eje Z de la bicapa (monocapa inferior), de allí que tome valores mayores a 90° , mientras que a 300K se seleccionó el marcador ubicado en la monocapa superior, por lo que el vector normal al anillo toma valores entre 0 y 90° . Puede observarse que la orientación del vector normal a 285 K (-A) muestra valores de ϕ más restringidos que a 300 K (-B) (menor dispersión de ϕ), y con un mayor ángulo de inclinación θ .

Estas distribuciones de densidad de probabilidad del vector normal al anillo, no son marcadamente diferentes de las obtenidas para las simulaciones del marcador sin colesterol, por lo que las principales diferencias en los espectros (con y sin colesterol) estarán relacionadas con los tiempos de correlación de los movimientos efectuados por el anillo doxil.

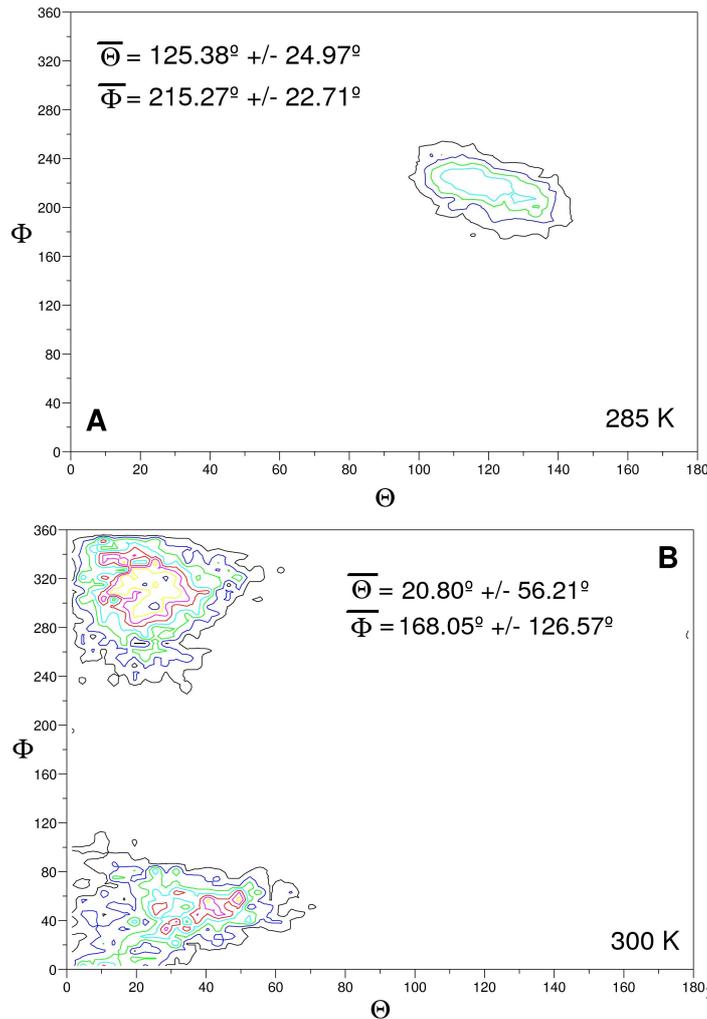


Gráfico 7.12: muestra en líneas de nivel, la densidad de probabilidad del vector normal al anillo doxil, en función de los ángulos, para cada T. Para mayor simplicidad solo se muestra la distribución de probabilidad del vector normal al anillo en una de las monocapas. Notar que el vector seleccionado a 285K está orientado en sentido contrario al eje Z de la bicapa (capa inferior), mientras que el de 300K pertenece a la capa superior.

Los parámetros empleado en el cálculo para las componentes del tensor g y A, así como el método de estimación de las funciones de correlación ($F_C(\tau)$), fueron los descritos en el capítulo 5 (inciso 5.3.3).

En el Gráfico 7.13 se muestra los resultados de los ajustes para la simulación a 300K.

En la tabla 7.6 se muestran los parámetros obtenidos en el ajuste, para cada temperatura. Recordemos que la parte de las exponenciales que dominan a tiempos largos (marcados en negritas en la tabla superior), son las que más pesan en el efecto de promediación de los tensores g y A, como

fue explicado en el ítem 5.3.3. Además y como se resaltó en el capítulo 5, la estimación de los coeficientes de estas exponenciales son las que presentan mayor error debido a que el ajuste se realizó sobre un tiempo de simulación significativamente menor al decaimiento propio de estas funciones.

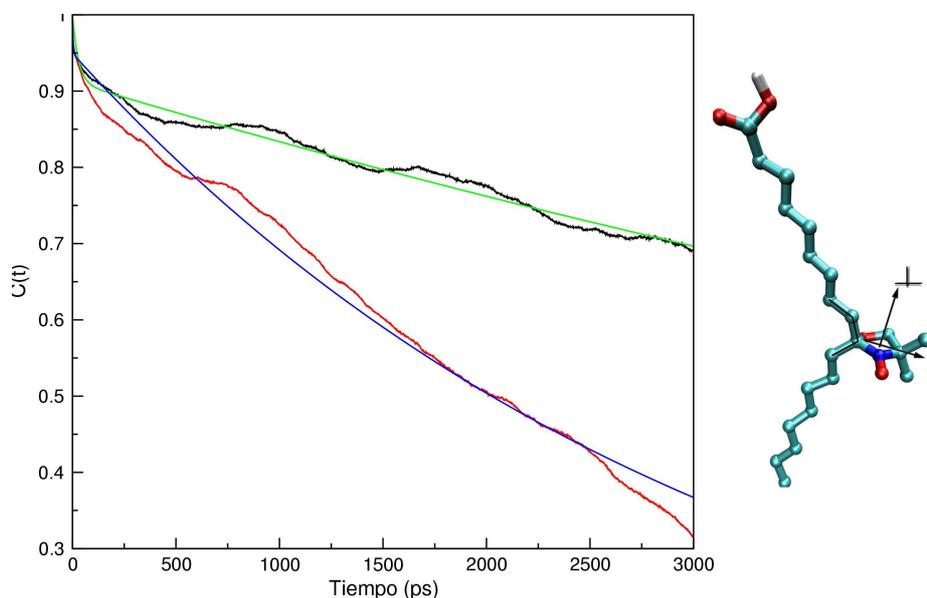


Gráfico 7.13: funciones de autocorrelación de los vectores perpendicular (negro) y paralelo (rojo) al anillo (mostrados sobre la molécula de AE* a la derecha del gráfico) calculadas de la DM. En color verde y azul se muestran las funciones bi-exponenciales ajustadas a las 2 anteriores y utilizadas para describir matemáticamente el movimiento de tambaleo (vector perpendicular) y de rotación axial (paralelo) respectivamente. Para mayor simplicidad se muestra en este gráfico los resultados de los ajustes para la simulación a 300K.

En general puede notarse que las funciones de correlación axial decaen más rápidamente que sus respectivas funciones de correlación de tambaleo. Esto indica que el marcador (al igual que las moléculas de AE del sistema) tiene menos impedimentos estéricos para realizar movimientos de rotación axial, que de tambaleo.

Como era de esperar el decaimiento de la función de autocorrelación de tambaleo a 300 K es más rápidamente que la de 285 K, debido a la activación térmica de nuevos movimientos del sistema. Sin embargo, encontramos un comportamiento particular del marcador ubicado en la segunda monocapa, el cual se mostraba más ordenado (S_M semejante al S_M a 285K, y con una función de autocorrelación que decaía más lentamente que el marcador a 285K).

Tabla 7.6: ajuste de una función bi-exponencial a las funciones de correlación de los vectores normales y paralelos al anillo obtenidos de la DM.

$F_c(\tau) = (1 - a_0) \cdot 10^{(-\tau/\tau_{C1})} + a_0 \cdot 10^{(-\tau/\tau_{C2})}$								
	a_0		$\tau_{C1}(ps)$		$\tau_{C2}(ps)$		χ^2	
	<i>T</i>	<i>RA</i>	<i>T</i>	<i>RA</i>	<i>T</i>	<i>RA</i>	<i>T</i>	<i>RA</i>
285K	0.939	0.897	17	164	17847	17355	0.17	0.2
300K	0.912	0.950	28	3	11135	3156	0.26	1.3
<i>T: Tambaleo RA: Rotación Axial</i>								

Se muestran los parámetros obtenidos del ajuste de una función biexponencial a las funciones de correlación de los vectores normales (Tambaleo) y paralelo (Rotación Axial) al anillo, para cada temperatura. En negritas se muestran los parámetros de la exponencial que tiene más peso en el cálculo de $F_c(\tau)$ (tiempos largos).

En este punto es interesante ilustrar ciertos efectos que introduce la presencia de colesterol en el sistema sobre el marcador de espín. Las simulaciones realizadas no son capaces de muestrear con precisión todo el espacio configuracional del marcador en distintas posiciones de la bicapa. Sin embargo se han presentado dos situaciones relevantes para comprender su comportamiento: el marcador en contacto con moléculas de colesterol; y la otra no directamente en contacto con ellas (ver discusión de los perfiles de densidad atómica en el ítem 7.2.5).

Para el caso del marcador cuyo átomo C10 presenta un pico de densidad atómica a aproximadamente 39 Å (Gráfico 7.3), se calculó que el número promedio de contactos con moléculas de colesterol era 66 veces superior que para el otro marcador. Esto hace que los parámetros que se calculen para el mismo ($S_M(AE^*)$ o tiempos de correlación) sean característicos de una dinámica más lenta. Este comportamiento no refleja la dinámica del resto de los lípidos que forman parte del sistema.

Está claro que el resultado presentado por los marcadores será el promedio de los distintos entornos en que se encuentre. Pero la contribución de estas configuraciones debe ser tenido en cuenta en la interpretación, en especial si existieron tendencias de agregación preferencial.

En el Gráfico 7.14 se muestran los espectros de RPE, obtenidos a partir de las orientaciones del vector normal al anillo doxil y de las funciones

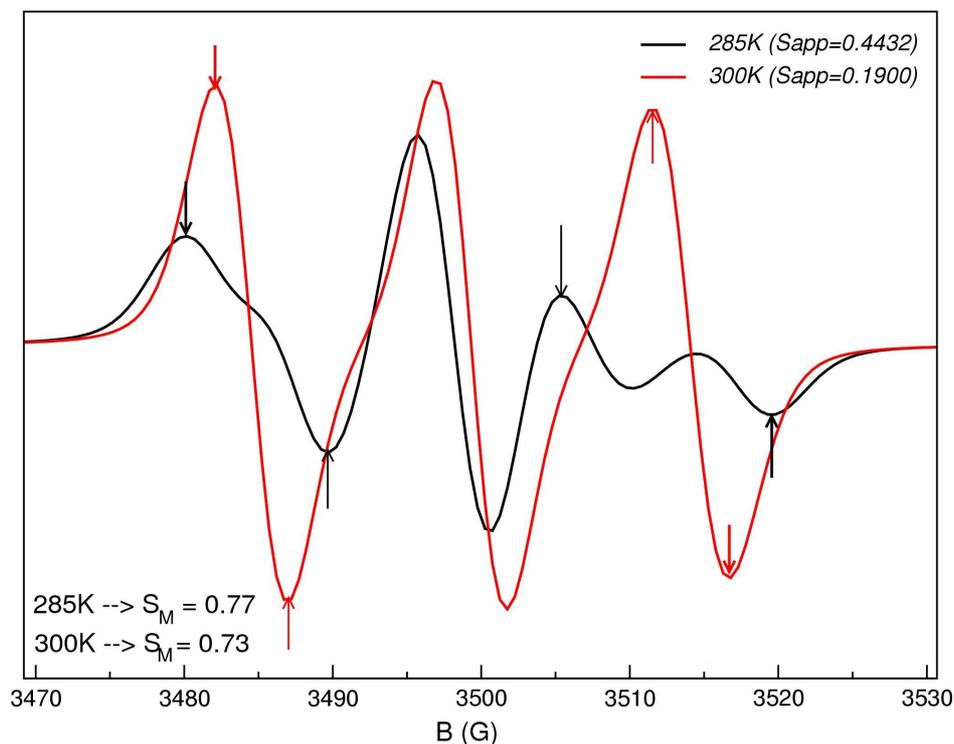


Gráfico 7.14: espectros de RPE, para una muestra orientada a 285K y 300K. Las flechas gruesas y finas muestran los picos utilizados en la obtención de $2A_{\text{máx}}$ y $2A_{\text{mín}}$ respectivamente. En la leyenda se indican los valores de S_{app} que resultan de cada espectro.

de autocorrelación de tambaleo y rotación axial, antes descritas, para una muestra NO orientada y a cada temperatura. En el gráfico se señala con flechas los picos utilizados en la estimación del parámetro de orden aparente (S_{app}) de cada espectro.

Puede decirse en forma general que tanto el espectro a 285K como el de 300 K corresponden una forma intermedia entre un espectro tipo “marcador en solución”, y un espectro tipo “polvo”. Los S_{app} obtenidos de los espectros, son consistentes con los resultados de los S_{M} calculados directamente de la simulación, para cada T. Puede apreciarse que existe cierta correspondencia entre los valores de S_{M} y S_{app} , siendo los primeros más elevados. Esta diferencia podría explicarse si pensamos que el S_{app} , contiene un factor de promediación por movimientos que se haya ausente en el S_{M} , obtenido directamente de la simulación.

Como observamos que el marcador presentaba una dinámica (S_{ZZ} y S_{M}) diferente si se hallaba próximo o alejado de moléculas de colesterol.

Decidimos analizar el comportamiento de 2 molécula de AE que presentaran una situación similar, incluyendo los espectros que les corresponderían, si en el C10 hubiesen presentado un marcador de espín (anillo doxil). Se puede anticipar que los espectros calculados para estos AE no tienen porque asemejarse al de los obtenidos para el marcador de espín, dado que como ya vimos presentan una dinámica muy diferente.

Para ello se seleccionaron 2 moléculas de AE (no marcadas) en el sistema AE/Colesterol a 300 K. Una que se hallara próxima a moléculas de colesterol (> número de “contactos”) y otra que se hallará lejos de las moléculas de colesterol (< número de “contactos”). En este caso los “contactos” se calcularon como el número de átomos de colesterol que se hallan a menos de 4 Å de cualquiera de los átomos C9, C10 y C11. Este triplete de átomos representa la zona de la molécula de AE donde se uniría el anillo doxil a la molécula de AE, de estar presente.

AE(44): número de contactos promedio (en 2 ns) = 1.130

AE(76): número de contactos promedio (en 2 ns) = 0.071

A cada una de ellas se les calculó las funciones de correlación de tambaleo o wobbling (F_c^w), a partir de la evolución temporal del vector definido por los átomos C9-C11 y la función de correlación rotación axial (F_c^A) a partir del vector perpendicular al anterior. Ambas se calcularon en el mismo período de tiempo en el cuál se estimaron los “contactos”. La dinámica de estos vectores representa el tipo de movimiento efectuado por una molécula de AE del sistema al mismo nivel de profundidad que lo haría el marcador de ubicarse en el mismo entorno.

El gráfico 7.15 muestra las funciones de autocorrelación de wobbling (línea entera negra) y de rotación axial (línea entera verde), para los AE 44 y 76. En color rojo se superpuso las funciones de wobbling ajustadas y en azul las de rotación axial.

Puede observarse en el Gráfico 7.15, que la función de correlación de tambaleo del AE 44 presenta un decaimiento inicial más rápido que la del AE 76, lo cual es consistente con un entorno de moléculas de

colesterol que dejan un mayor espacio libre, si lo comparamos con un entorno de AE (ver). Notar además que las funciones de F_C^A decaen ambas rápidamente, indicando la molécula puede rotar en cualquiera de los entornos presentados sin restricciones.

Si comparamos estas $F_C^W(\tau)$ con la mostrada para el vector normal al anillo doxil en el Gráfico 7.15 (para la misma T), notaremos que no

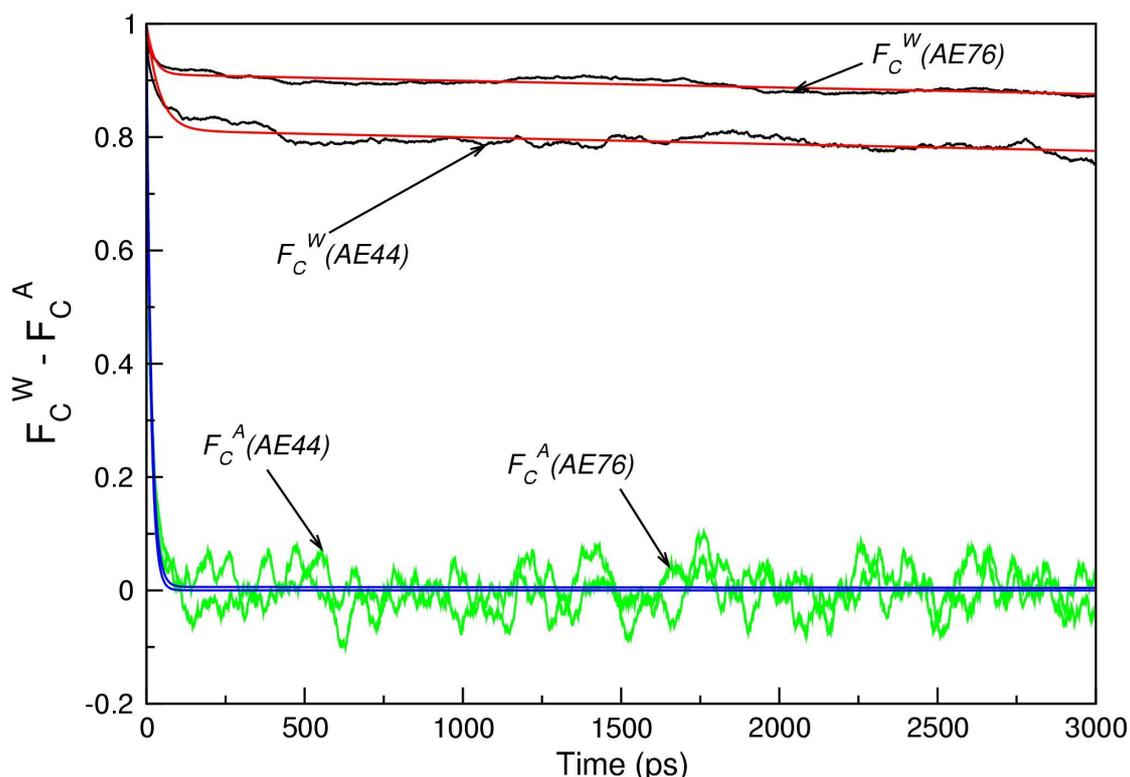


Gráfico 7.15: funciones de autocorrelación de tambaleo y rotación axial calculadas para los AE 44 y 76. En color rojo se superpuso la función bi-exponencial empleada en el ajuste de la F_C^{44} y en color azul la F_C^{76} . Puede notarse que la F_C^W del AE 44 presenta un decaimiento inicial más rápido que la del AE 76.

muestran diferencias significativas, indicando que este tipo de movimiento parece estar bien reflejado por el marcador. En cuanto a la $F_C^A(\tau)$ puede observarse que tanto en el AE 44, como en el AE 76 existe un decaimiento rápido, con muchas oscilaciones, lo cual sugiere que estos movimientos pierden correlación rápidamente. Si comparamos estas $F_C^A(\tau)$ con las correspondientes a la misma T para el marcador (Gráfico 7.), notaremos que el decaimiento es mucho más lento para este último, lo cual resulta razonable en virtud de los impedimentos estéricos a la rotación que presenta el anillo doxil.

Finalmente, a partir de las $F_C(\tau)$ obtenidas para los AE 44 y 76,

y de la distribución orientacional de los vectores C9-C11 (definido por los átomos C9-C11), se calcularon sus respectivos espectros para muestras NO orientadas. El Gráfico 7.16, muestra los espectros de RPE para las simulaciones del sistema AE/Colesterol a 300 K, obtenidos a partir de los vectores C9-C11 de los AE 44 y AE 76). Se agregó para su comparación el espectro de RPE del sistema AE/Colesterol/AE*, obtenido a partir del comportamiento del vector normal al anillo doxil.

Puede observarse en forma global, que los espectros de los AE (no marcados) son de tipo “polvo”, mientras que el del marcador es de tipo intermedio entre “polvo” y marcador en solución.

El Sapp calculado del espectro del AE 44 (línea entera negra), es significativamente mayor que el del AE 76 (línea entrecortada, roja), lo cual se corresponde apropiadamente con el elevado orden impuesto por los contactos de este residuo con los átomos de los anillos de colesterol. Los Sapp calculados de los espectros y los S_M calculados directamente de la simulación,

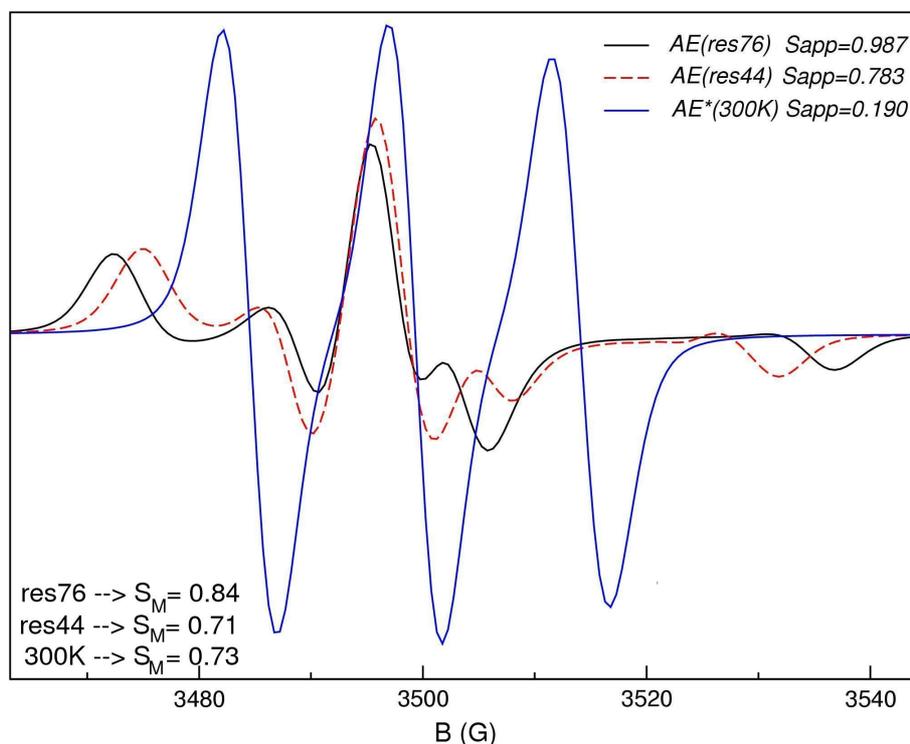


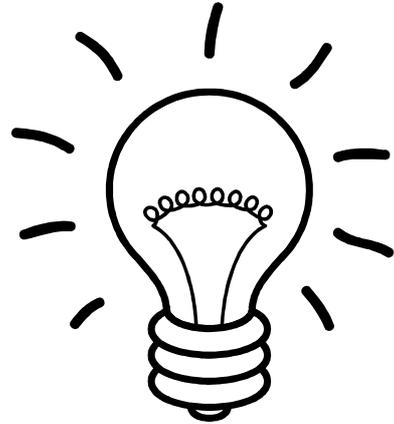
Gráfico 7.16: espectros de RPE para las simulaciones del sistema AE/Colesterol, obtenidos a partir de los vectores C9-C11 de los AE 44 y AE 76. Se agregó para su comparación el espectro de RPE del sistema AE/Colesterol/AE*, obtenido a partir del comportamiento del vector normal al anillo doxil. Notar la marcada diferencia entre ellos: los espectros de los AE 44 y 76 son tipo polvo, mientras que el de AE* es intermedio entre “polvo” y “líquido”.

presentan la misma tendencia a ir disminuyendo con el aumento de T. Este

último resultado sugiere que la información contenida en el Sapp es consistente con la obtenida a partir de la DM. Al aumentar la T del sistema, aumenta el desorden y esto conlleva a una disminución de los valores tanto de Sapp, como de S_M .

Nuevamente aquí se repite, al igual que para el sistema AE/AE*, que el marcador no reproduce la dinámica de los AE de la bicapa. Sin embargo, si comparamos los Sapp calculados de estos espectros con los correspondientes a los del sistema AE/AE*, notaremos una tendencia correcta, es decir, el marcador en el sistema AE/colesterol, muestra Sapp más bajos, correspondientes a un sistema más desordenado, mientras que en el sistema AE mostraba valores más altos compatibles con un mayor ordenamiento.

CAPITULO 8



8. Conclusiones

Es conveniente recordar antes de abordar las conclusiones de este trabajo, cuál era el objetivo fundamental planteado para esta tesis. Queríamos saber de qué manera un marcador de RPE era capaz de transmitirnos la dinámica del interior de una bicapa biológica o sintética. La respuesta a esta pregunta implica un desarrollo que puede expandirse a un conjunto de respuestas a preguntas concretas, que son las que se fueron suscitando a lo largo de este trabajo. En los siguientes párrafos, se plantearán los interrogantes que nos sirvieron de guía en esta investigación, y sus respectivas respuestas, las cuales representan las conclusiones que pretendemos resumir en este capítulo.

En primer lugar consideramos el comportamiento de los sistemas que NO contienen el marcador de espín (AE puro y AE/Colesterol), para luego interpretar el comportamiento del marcador inmerso en esos sistemas.

El sistema AE puro, simulado en estado gel (por debajo de su punto de fusión), mostró un ordenamiento de tipo hexagonal en el plano de la bicapa, que se propagaba a corto alcance (próximos vecinos). Esto se deduce

de la aparición de picos en posiciones definidas, del Factor de Estructura bidimensional (estimados a partir de la trayectoria de la simulación) (gráfico 4.8). Además y relacionado con el ordenamiento, las moléculas de AE presentaron una inclinación coordinada de la orientación de sus ejes moleculares principales (tilt) de aproximadamente 25° , como lo demuestra el bajo desvío estándar del ángulo azimutal, para todas las T estudiadas.

En general el sistema AE puro mostró una elevada fracción trans de los ángulos diedros de la colas hidrocarbonadas ($\sim 98\%$), la cual es la configuración de menor energía. Esto hace que las mismas se mantengan extendidas y por lo tanto muy empaquetadas entre sí (gráfico 4.3). Los parámetros de orden S_{zz} de los átomos de carbono de los AE (calculados a partir de la trayectoria de DM), mostraron ser muy homogéneos entre si, aproximadamente 0.7, con una ligera tendencia a disminuir sus valores en los átomos de C situados en las proximidades de la interfase con el agua y en el espacio interlamelar. Cuando se calcularon los valores de S independientes de la orientación de la muestra (S_M), estos tomaron un valor aproximadamente igual a 0.85. Por lo que el menor valor de S_{zz} (~ 0.70) respecto a este último es atribuible esencialmente al "tilt" de las moléculas. El valor de S_M de 0.85 es compatible con un sistema donde las moléculas de AE presentan muy pocas fluctuaciones orientacionales. Este fenómeno se observó a todas las T estudiadas.

A diferencia de los resultados anteriores el sistema AE/Colesterol mostró una fracción trans mucho más baja que la de AE puro (85% - 90%), siendo mucho más sensible al efecto de la T (gráfico 6.3). Este aumento de los diedros de la colas hidrocarbonadas en conformación gauche produce un aumento del desorden, que puede apreciarse en el gráfico molecular 6.2.

El perfil de parámetros de orden S_{zz} de los átomos de C de los AE (gráfico 6.9) mostró, al igual que para el sistema AE puro, valores más bajos hacia la interface con el agua y el espacio interlamelar. Pero en este caso, los valores de S_{zz} de los átomos de C de los AE disminuyeron más marcadamente hacia el espacio interlamelar, indicando un mayor desorden en esa zona. Este resultado indicaría que los anillos de colesterol imponen restricciones estéricas sobre los átomos de C de los AE vecinos (átomos

cercanos al agua), mientras que los átomos de C más alejados a los anillos pueden moverse más libremente, disminuyendo los valores de S_{zz} .

8.1. Resultados sobre el sistema AE/AE*

¿Es el comportamiento del marcador semejante al de los AE que componen el sistema, desde un punto de vista dinámico?

NO.

Los perfiles S_{zz} de los AE son marcadamente diferentes a los correspondientes al del AE* (gráfico 5.11).

Además los S_M (tensor S diagonalizado) calculados para los C10 de los AE eran claramente diferentes (0.85) de los obtenidos para el C10 del marcador (0.76 a 285K, 0.47 a 300K y 0.28 a 315K), lo cual es una clara indicación de sus distintas movilidades (tabla 5.4). Además y como puede observarse, los S_M mostraron una clara tendencia a disminuir con el aumento de T , indicando que el marcador era significativamente sensible al efecto de este parámetro.

¿Perturba el anillo doxil del AE*, el comportamiento dinámico de los AE?

SI. Pero solo a sus próximos vecinos.

Los AE mostraron un comportamiento dinámico muy homogéneo entre ellos. Los perfiles de S_{zz} obtenidos como el promedio sobre todos los AE de una capa con los correspondientes a un AE (no marcado) aislado, eran prácticamente iguales. Incluso sus fluctuaciones (calculando los S_{zz} en diferentes intervalos de tiempo a lo largo de la simulación) eran muy pequeños en relación a las observadas para el AE*.

Además, se observó una muy pequeña disminución de la fracción trans de los AE al pasar del sistema A a A* (sin a con marcador). Pudo comprobarse que esta disminución de la fracción trans fue consecuencia del desorden introducido en la primera capa de vecinos al marcador, pero no al resto de los AE (gráfico 5.5).

Los siguientes 2 hechos nos llevaron a la próxima pregunta:

- Los perfiles de S_{zz} de los AE individuales de una bicapa son muy estables en el tiempo. Por ejemplo, cuando se calcularon los S_{zz} de un AE (no marcado) en diferentes intervalos de tiempo de la simulación, se observó que eran prácticamente iguales a los S_{zz} promediados sobre toda la bicapa y a lo largo de toda la simulación (datos no mostrados).
- El perfil S_{zz} del AE* es diferente al de los AE y fluctúa considerablemente a lo largo del tiempo. Es decir el perfil de PO del AE* no es el mismo si lo calculamos en distintos intervalos de tiempo de la simulación.

¿Puede identificarse alguna/as estructuras moleculares del AE* que sean responsables de los S_{zz} observados?

SI.

Mediante análisis de “clusters”, pudimos identificar 3 grupos de conformaciones moleculares del AE* que presentaban semejanzas en sus propiedades estructurales. Cada uno de estos grupos presentaban perfiles de PO particulares y diferentes entre uno y otro. Cuando realizamos la suma pesada de los PO de cada uno de estos “clusters”, pudimos reconstruir el perfil de PO promediado a lo largo de la simulación (gráficos 5.15, 5.16 y 5.17).

Las preguntas que nos formulamos y que hemos respondido no aclaran un punto, que es vital para comprender, el uso de marcadores de espín en el relevamiento de la dinámica de una bicapa lipídica. Tal vez, los marcadores de espín no necesitan tener el mismo comportamiento dinámico que las moléculas del ambiente donde se hallan inmersos, sino simplemente dar información sobre el cambio de la dinámica del medio. Por ejemplo,

¿Afecta la T a los AE y al AE* de la misma manera?

SI.

Los perfiles de S_{zz} de los AE, se hallan muy próximos a las distintas T estudiadas, con una ligera tendencia a ir disminuyendo sus valores con la T (gráfico 4.10). Lo cual puede interpretarse como un muy ligero

aumento del desorden, entendido este como una disminución de los S_{zz} , los cuales reflejan las fluctuaciones de las distintas partes de una molécula. Los perfiles de S_{zz} del AE* a distintas T muestran la misma tendencia (disminuyen con el aumento de la T), siendo más sensibles al cambio de T (gráfico 5.10). Este hecho lo haría particularmente útil al momento de emplear la espectroscopía de RPE para estudiar una bicapa lipídica.

Los tiempos de correlación rotacional de los AE no marcados disminuyen con el aumento de T en esta fase rotamérica (Gráfico 5.18). Una conclusión relevante de este trabajo, es que los valores de $S_{zz}(10)$ del AE*, y eventualmente los espectros de RPE medirían esta disminución en los tiempos de correlación rotacional.

8.2. Resultados sobre el sistema AE/AE*/Colesterol

Si ahora cambiamos el sistema de estudio por uno con propiedades diferentes (AE/colesterol simil líquido-ordenado) ¿Es el comportamiento dinámico del marcador semejante al de los AE que componen el sistema?

No. Los perfiles de S_{zz} de los átomos de C de las moléculas de AE (S_{zz} calculados de la DM) son completamente diferentes del AE* (gráficos 7.5, 7.8). Entonces,

¿Debemos esperar que el marcador doxil presente una dinámica semejante a los AE del entorno o no?

Nuestros resultados indican que no. Ya observamos que la molécula de AE*, no es estructuralmente igual a una molécula de AE y por lo tanto uno no esperaría que sus movimientos moleculares sean “idénticos”. Pero por otra parte, si queremos estudiar el sistema AE/Colesterol, ya no interesa el comportamiento de una de las especies de la mezcla, sino el comportamiento del conjunto, lo cual nos lleva a una pregunta de mayor interés:

¿Cambian sus comportamiento dinámicos los AE del sistema ante el agregado de colesterol?

Podemos decir que los AE mostraron un descenso de sus S_M , al pasar del sistema A a B, lo cual indica que estas moléculas aumentaron su movilidad con el agregado de colesterol, en particular en dirección a la fase acuosa y al espacio interlamelar. De igual manera a lo observado en el sistema A, el aumento de la T produjo un descenso de los S_M , compatible con el aumento de la E cinética del sistema.

¿Reflejará el comportamiento dinámico del marcador de espín el cambio de un sistema a otro?.

Esta pregunta no la pudimos responder de una forma conclusiva, dado que el tiempo de producción de las simulaciones, mostró no ser suficiente para muestrear todo el espacio configuracional del *marcador*. A 285K, el marcador mostró un valor de $S_M(10)$ menor que a 300K, indicando una mayor movilidad a esa T mas baja. Como se mostró, esto se debe a que a 300K, el marcador se ubica con el anillo doxil muy próximo a los anillos de colesterol, donde posee muy poca area libre (Grafico 7.3 y 7.10) para moverse, y de allí resulta su baja movilidad (alto S_M).

El sistema B* es un sistema de una complejidad configuracional muy grande. Dependiendo del arreglo particular de las moléculas de colesterol, alrededor del marcador, el comportamiento del mismo será distinto en respuesta a su entorno. Lamentablemente los tiempos requeridos para lograr que el marcador explore todos los entornos posibles está fuera de nuestras posibilidades de cálculo. Sin embargo las situaciones analizadas constituyen una muestra relevante a los fines de comprender el comportamiento del marcador. Es importante enfatizar aquí que todos los cálculos efectuados se realizaron en la etapa de producción, donde la estabilidad del sistema se probó por la constancia de varios parámetros (Área, Szz, Fracción *trans*).

De las preguntas respondidas, surge una pregunta más general: ¿Qué es lo que sensa el marcador de espín inserto en una bicapa lipídica (al menos en el sistema modelo empleado en esta tesis)?

De acuerdo a nuestros resultados, el comportamiento dinámico del marcador evaluado por su tiempos de correlación rotacional, se haya relacionado directamente con los tiempos de correlación rotacional de las

moléculas del entorno donde se haya inserto. Si los tiempos de correlación axial de las moléculas del sistema disminuyen o aumentan, lo mismo ocurre con los tiempos de correlación axial del marcador.

8.3. Modelo empleado en el cálculo de los espectros de RPE

Otro objetivo importante de esta tesis era vincular en forma más precisa y detallada el comportamiento dinámico del marcador de espín (a escala molecular) con las características del espectro de RPE. Para esto se modeló el espectro de RPE que le correspondería al marcador, conociendo (de la DM) el tipo de movimientos que está efectuando dentro de la bicapa. El método desarrollado para simular los espectros de RPE es una generalización del método propuesto por Steinhoff and Hubbell [Steinhoff y Hubbell, 1996]. El método calcula el espectro de RPE a partir de una distribución estática de vectores magnetización (que se extrae de la simulación), afectando a los tensores g y A por un factor de promediado temporal (que también se obtiene de la simulación). Este modelo permite describir independientemente el movimiento de rotación axial y el de tambaleo, y tratar el promediado de cada uno de ellos en forma particular. El modelo permite calcular espectros correspondientes tanto a muestras orientadas respecto al campo magnético externo (muestra tipo Langmuir-Blodgett) o no (muestras con todas las orientaciones posibles de la normal a la bicapa). El modelo de Steinhoff y Hubbell, solo contemplaba el cálculo para un marcador en una muestra distribuída isotrópicamente.

Con este modelo se estudiaron distintas distribuciones de vectores magnetización, con distintas orientaciones de muestras y 3 tipos de movimientos diferentes:

- Movimientos muy lentos (estáticos).
- Movimientos muy rápidos.
- Movimientos Intermedios.

El modelo predijo como, tanto la distribución de orientaciones del vector magnetización, como la dinámica del proceso afectan la forma de los

espectros. Los resultados hallados reproducen correctamente los resultados que eran conocidos previamente para algunas situaciones particulares, como se discutió en detalle en el capítulo 3.

Con esta herramienta se calcularon los espectros que le corresponden a nuestras simulaciones. Es decir, realizar, el paso inverso al experimental. Para calcular los espectros partimos entonces, de la distribución orientacional del vector magnetización (estimado éste, como el vector normal al anillo doxil) y de sus tiempos característicos de rotación axial y de tambaleo, estos últimos estimados a partir de las funciones de autocorrelación del vector paralelo y perpendicular al anillo doxil respectivamente.

8.4. Espectros de RPE del sistema AE/AE*(teóricos).

Las distribuciones angulares de los vectores magnetización obtenidos de las DM a distintas T (gráfico 5.21), podrían describirse en forma grosera, como distribuciones cónicas de semiamplitud 20° a 30°. Es decir, los vectores magnetización presentaron distribuciones muy restringidas en el espacio. Dado que ambas distribuciones de vectores magnetización son muy similares, podríamos anticipar que para los espectros calculados en muestras NO orientadas, cualquier diferencia entre ellos se deberá a las funciones de promediado por movimiento de tambaleo y rotación axial.

Puede decirse en forma general que los tres espectros (285 K, 300 K y 315 K) son de tipo “polvo”. Si comparamos los Sapp, obtenidos de los espectros a partir de los valores de $2A_{\text{máx}}$ y $2A_{\text{mín}}$, con los S_M (S diagonalizados), calculados directamente de la simulación para el átomo C10 del AE* (Gráfico 5.22 y Tabla 5.4), podemos apreciar que existe una muy buena correlación entre ellos, a las distintas T estudiadas. Estos resultados estarían indicando que los espectros calculados, retienen las características fundamentales del comportamiento del marcador de espín dentro de una bicapa lipídica. Además los Sapp muestran una tendencia a ir disminuyendo con la T, lo cual se correlaciona con el aumento de E cinética del sistema, que permitiría que el anillo doxil presentará mayores fluctuaciones (mayor desorden).

Por otra parte el espectro hipotético de un AE (sin marca), calculado a partir de la orientación del vector que une los átomos de C9 y C11 (región de inserción del anillo doxil) mostró ser de tipo de “polvo” (Gráfico 5.23), con un valor de Sapp calculado de las posiciones de los picos 2Amáx y 2Amín de aproximadamente 1.0. Este resultado es congruente con el valor de S_M , calculado directamente de la simulación, para este AE. Esto indica que el anillo doxil realiza movimientos moleculares que no son semejantes a los de un AE del sistema a la misma profundidad de la bicapa.

8.5. Espectros de RPE del AE/AE*/Colesterol (teóricos).

En forma general, puede decirse que el espectro a 300 K, y el de 285K (Gráfico 7.14) corresponden a una situación intermedia entre un espectro tipo “solución” y un espectro tipo “polvo”, respectivamente. Los Sapp obtenidos de los espectros, son consistentes con los resultados de los S_M calculados directamente de la simulación, para cada T. Pudimos apreciar que existe una cierta correspondencia entre los valores de S_M y Sapp, siendo los primeros más elevados. Esta diferencia podría explicarse si pensamos que el Sapp, contiene un factor de promediación por movimientos que se haya ausente en el S_M , obtenido directamente de la simulación.

Para comparar el comportamiento del AE* en relación a las moléculas de AE, aquí también se calculó el espectro hipotético correspondiente a 2 moléculas de AE del sistema, a partir de la orientaciones del vector que une el C9 y el C11 (región de unión del anillo doxil). En este sistema, a diferencia del AE/AE*, las moléculas de AE presentaron diferencias importantes en su comportamiento dinámico, según su ubicación respecto a los anillos rígidos de las moléculas de colesterol. Por ello se seleccionaron 2 moléculas de AE que presentaran marcada diferencia en su proximidad a los anillos de colesterol. Los espectros de estas moléculas mostraron ser tipo “polvo”, marcadamente diferentes al del marcador, que mostró un comportamiento intermedio entre “polvo” y “solución” (Gráfico 7.16). Los Sapp estimados de los espectros de los AE presentaron buena correlación con los S_M estimados para estas mismas moléculas directamente de la simulación.

En base a estos resultados podemos decir que el AE* no

reproduce el comportamiento de los AE de la bicapa. Sin embargo, si comparamos los Sapp calculados de estos espectros con los correspondientes a los del sistema AE/AE*, notaremos una tendencia correcta, es decir, el marcador en el sistema AE/colesterol, muestra Sapp más bajos, correspondientes a un sistema más desordenado, mientras que en el sistema AE mostraba valores más altos compatibles con un mayor ordenamiento.

8.6. Comparación con Resultados experimentales

8.6.1. Monocapas de AE tipo Langmuir-Blodgett

Si comparamos los resultados de este sistema con los resultados experimentales de Risse y col.[Risse y col. 1998a][Risse y col., 1998b] en monocapas de AE tipo Langmuir-Blodgett marcadas con 12-doxil-AE, encontramos diferencias marcadas. Nuestros resultados de las DM, indican que el marcador doxil adopta un conjunto de orientaciones bien definidas (Gráfico 5.19, Tabla 5.3), mientras que estos autores, evidencian a través de sus espectros de RPE una distribución isotrópica de los vectores magnetización (Gráfico 5.26). Además sus resultados de Absorción de Rx (NEXAFS: Near Edge X-ray Absorption Fine Structure) sobre muestras marcadas en la interface AIO₃, muestra ***un descenso del orden significativo***, lo cual indica que el marcador perturba significativamente la monocapa de AE y es consistente con la isotropía mostrada por sus espectros de RPE a distintas orientaciones. Estas discrepancias solo pueden atribuirse a que el sistema empleado en este experimento es mucho más desordenado que el simulado en nuestro caso.

Nuestros resultados de parámetros de orden S_{zz} y S_M (Tabla 5.4), calculados sobre AE próximos y alejados indican que el marcador no parece perturbar el orden del sistema más allá de sus próximos vecinos. Esta importante diferencia encontrada con el trabajo de Risse, podría explicarse si el número de moléculas de AE dentro de la monocapa experimental fuera superior a un 1 %, con lo cual la cantidad de moléculas distorsionadas dentro del sistema aumentaría significativamente. Como es discutido por estos autores el comportamiento de la intensidad de la señal de EPR con la concentración de marcadores en solución no es lineal, por lo que les resulta

difícil establecer cuantos han sido absorbidos en la monocapa y su ubicación, por este motivo la inesperada isotropía de sus espectros podría deberse a una amplia distribución de orientaciones que eventualmente podría incluir la existencia de marcadores en la superficie de la monocapa.

8.6.2. Multicapas de Lecitina de Huevo y DPPC (fase gel)

Muestras Orientadas: los espectros experimentales de RPE obtenidos para multicapas de lecitina de huevo marcadas con 12-doxil-AE, sobre muestras orientadas indican una clara preferencia orientacional del marcador doxil (gráfico 5.26). Este resultado, se halla en acuerdo con las restringidas orientaciones halladas de nuestras simulaciones en el sistema AE/AE*. Nuestro valores de los parámetros $2A_{\text{máx}}$ y $2A_{\text{mín}}$, indican una distribución de los vectores magnetización más restringida que en la muestra experimental, lo cual resulta razonable en virtud del compacto arreglo que alcanza el sistema de AE, el cual a su vez no permite la misma posibilidad de movimiento que en la muestra experimental.

Por otra parte, es importante resaltar que es necesario contar con los espectros de más de 2 orientaciones de la muestra experimental para poder concluir si en la misma existe una inclinación colectiva de las moléculas de los lípidos (cono de distribución de vectores magnetización inclinado respecto al campo magnético B).

Muestras NO orientadas:

Los espectros sobre muestras no orientadas experimentales (lecitina de huevo y DPPC) y teórico (AE/AE* 300K), mostrados en el gráfico 5.27, presentaron características intermedias entre un espectro de “polvo” y un “líquido”. Los Sapp obtenidos muestran un “orden” creciente (aumento de Sapp) desde Lecitina de huevo < DPPC < AE/AE*. La diferencia encontrada entre la muestra DPPC y la lecitina de huevo puede explicarse, si tenemos en cuenta que la lecitina es una mezcla de fosfolípidos, rica en DPPC pero que además contiene lípidos insaturados, que pueden aumentar su fluidez y desorden.

Los valores de S calculados para la muestra de AE son

compatibles con mayor ordenamiento en la zona del C10 que la muestra de lecitina de huevo, lo cual resulta razonable debido a que el mayor empaquetamiento de los AE dentro de la bicapa restringe la movilidad del marcador.

Por otra parte el valor de S aparente calculado para las bicapas de AE es similar al obtenido para la muestra de DPPC en estado “gel”. Este paradójico resultado, tal vez pueda explicarse por la mayor movilidad relativa que presenta el AE* dentro del bicapas de AE, debido a los severos impedimentos estérico que le impone ese sistema tan ordenado (discutido en párrafos anteriores) y que hace que el AE* encuentre su situación de equilibrio con un aumento de su entropía.

8.7. Lineamientos Futuros

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, surgen nuevas preguntas que seguramente serán motivo de futuras investigaciones:

- ¿Cómo evidencia un cambio de fase un marcador de espín en el seno de una bicapa lipídica?
- ¿ A que profundidad dentro de una membrana se ubica un marcador con el anillo doxil en posición 5 o 16?
- ¿Cuáles son las interacciones que determinan su comportamiento en una bicapa de fosfolípidos?

Bibliografía

Abragham, A. and Bleaney, B. 1970. "Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions". Clarendon Press. Oxford.

Aittoniemi, J. ; Róg, T.; Niemela, P.; Pasienkiewicz-Gierula, M.; Karttunen, M. and Vattulainen, I. 2006. "Tilt: Major Factor in Sterols' Ordering Capability in Membranes". *J.Phys.Chem.B(Letters)*. 110:25562-25564.

Alder, B.J. and Wainwright, T.E. 1957. "Phase Transition for a Hard Sphere System". *J. Chem. Phys.*. 27:1208-1209.

Allara D.L.; Nuzzo R.G. 1985. "Spontaneously organized molecular assemblies. 2. Quantitative infrared spectroscopic determination of equilibrium structures of solution-adsorbed n-alkanoic acids on an oxidized aluminum surface". *Langmuir*. 1:52-66.

Allara D.L.; Nuzzo R.G. 1985. "Spontaneously organized molecular assemblies. 1. Formation, dynamics, and physical properties of n-alkanoic acids adsorbed from solution on an oxidized aluminum surface". *Langmuir*. 1:45-52.

Allen, F.H. 2002. "The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising". *Acta Crystallogr B*. 58:380-8.

Meirelles, N.C.; Tabak, M. 2000. "Lipid chain dynamics in Stratum Corneum studied by Spin Label Electron Paramagnetic Resonance". *Chemistry and Physics of Lipids*. 104:101-111.

Anderson, .R.G.; Jacobson, K.. 2002. "A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains". *Science*. 296(5574):1821-5.

Berendsen H.J.C.;. 1991. Transport properties computed by linear response through weak coupling to a. Meyer,M.; Pontikis V..

Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; DiNola, A.; Haak, J.R.. 1984. "Molecular dynamics with coupling to an external bath". *J. Chem. Phys.*. 81:3684-3690.

Berendsen, H.J.C.; van der Spoel, D. and van Drunen, R. 1995. "GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation". *Comp. Phys. Comm.* 91:43-56.

Bordeaux, D. and Lajzerowicz-Bonneteau, J. 1974. "Structure cristalline du spiro[cyclohexane-1,2'-(diméthyl-4',4' oxazolidine)]". *Acta Cryst. B.* 30:2130-2132.

Bordeaux, D.; Gagnaire, G.; Lajzérowicz, J. 1983. "Structure des formes racémique et optiquement active du radical N-oxyle-exo: diméthyl-4',4' trino-8,9,10 spiro[bornane-2:2'-[oxazolidine-1,3]] oxyle-3', C₁₁H₁₈NO₂". *Acta Cryst. C.* 39:466-470.

Breneman, C.M.; Wiberg, K.M.. 1990. "Determining atom-centered Monopoles from Molecular Electrostatic Potential. *J. Comp. Chem.* 11:361-373.

Bruno, I.J.; Cole, J.C.; Edgington, P.R.; Kessler, M.; Macrae, C.F.; McCabe, P.; Pearson, J. and Taylor, R. 2002. "New software for searching the Cambridge Structural Database and visualising crystal structures". *Acta Crystallogr.* B-58:389-397.

Cadenhead, D.A.; Müller-Landau, F. 1976. "Model Membrane studies of Spin-Label probes. Part I. Mixed monolayers of 12-nitroxide Stearic Acid and Myristic Acid". *Biochim. Biophys. Acta.* 443(1):10-8.

Carrer, D.C.; Schreier, S.; Patrito, M.; Maggio, B. 2006. "Effects of a short chain ceramide on bilayer domain formation, thickness and chain mobility". *Biophys. J.* 90:2394-2403.

Cassera, M.B.; Silber, A.M.; Gennaro, A.M. 2002. "Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study". *Biophysical Chemistry.* 99:117-127.

Chapman, D.. 1975. "Phase transition and fluidity characteristics of lipids and cell membranes". *Biophys. J.* 8:185-235.

Darden, T.; York, D. and Pedersen, L. 1993. "Particle mesh Ewald: An N-log(N)

method for Ewald sums in Large systems". J. Chem. Phys.. 98:10089-10092.

Daura, X; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D.; van Gunsteren, W.F.; Mark, A.E. 1999. "Peptide folding: when simulation meets experiment". Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 38:236-240.

de Leeuw, N.H.; Parker, S.C. 1998. "Molecular-dynamics simulation of MgO surfaces in liquid water using a shell-model potential for water". Phys. Rev. B. 58:13901-13908.

Edidin, M.(2003). 1976. "Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers". Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.. 4(5):414-8.

Essman, U.; Perera, L.; Berkowitz, M.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L.G.. . "A smooth particle mesh Ewald potential". J. Chem. Phys.. 103:8577-8592.

Ewald, P.P. 1921. "Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotiale". Ann. Phys.. 64:253-287.

Falck, E.; Patra, M.; Karttunen, M.; Hyvönen, M.T.; Vattulainen, I. 2004. "Lessons of Slicing Membranes: Interplay of Packing, Free Area, and Lateral Diffusion in Phospholipid/Cholesterol Bilayers". Biophys. J.. 87:1076-1091.

Gawrisch, K.; Eldho, N.V.; Polozov, I.V. 2002. "Novel NMR tools to study structure and dynamics of biomembranes.". Chem. Phys. Lipids.. 116(1-2):135-51

Gleason, W.B. 1973. "1,4-Bis-(4',4'-dimethyloxazolidine-N-oxyl)-cyclohexane". Acta Cryst. B. 29:2959-2960.

Goto M.; Asada E. 1978. "The crystal structure of the B-form of stearic acid". Bull. Chem. Soc. Japan. 51:2456-2459.

Griffith H.; Jost P. 1976. Lipid Spin Labels in Biological Membranes. Lawrence J. Berliner.

Hakansson, P.; Westlund, P.O.; Lindahl, E.; Edholm O. 2001. "A direct Simulation of EPR slow-motion spectra of Spin Labelled phospholipids in liquid crystalline bilayers based on a molecular dynamics Simulation of the Lipid

Dynamics". *Phys.Chem.Chem.Phys.* 3:5311-5319.

Hautman, J.; Klein, M.L. 1990. "Molecular dynamics simulations of the Effects of Temperatures on a dense Monolayer of long-chain molecules". *J.Chem.Phys.* 93:7483-7492.

Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H.J.C.; Fraaije, G.J.E.M. 1997. "LINCS: a linear constraint solver for molecular simulation". *J. Comp. Chem.* 18:1463-1472.

Hockney, R.W.; Eastwood, J.W. 1981. "Computer Simulation using Particles" Mac Graw-Hill.

Höltje, M.; Förster, T.; Brandst, B.; Engels, T.; von Rybinski, W.; Höltje, H.. 2001. "Molecular Dynamics Simulations of Stratum Corneum Lipid models: Fatty acids and Cholesterol". *Biochimica et Biophysical Acta.* 1511:156-167.

Hoover, W.G. 1985. "Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions". *Phys. Rev. A.* 31:1695-1697.

Humphrey, W.; Dalke, A. and Shulten, K. 1996. "VMD - Visual Molecular Dynamics". *J. Molec. Graphics.* 14:33-38.

Hyslop P.A.; Morel B.; Sauerheber R.D. 1990. "Organization and interaction of cholesterol and phosphatidylcholine in model bilayer membranes". *Biochemistry.* 29:1025-1038.

Ipsen, J.H.; Karstrom, G.; Mouritsen, O.G.; Wennerstrom, H.; Zukermann, M.J. 1987. "Phase equilibrium in the phosphatidylcholine-cholesterol system". *Biochim.Biophys.Acta.* 905:162-172.

Jain, M.; White, H.B. 1977. "Long range order in biomembranes". *Adv.Lipid:Res.* 15:1-60.

Jost, P.; Libertini, L.J. and Hebert, V.C. 1971. "Lipid Spin Labels in Lecithin Multilayers. As study of Motion Along Fatty Acid Chains". *J. Mol. Biol.* 59:77-98.

Kaganer, V.; Mohwald, H.; Dutta, P. 1999. "Structure and Phase Transitions in

Langmuir monolayers". *Reviews of Modern Physics*. 71:779-816.

Landbroke y col., 1968: Landbroke, B.D.; Williams, R.M.; Chapman, D.. 1968. "Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X ray diffraction". *Biochim.Biophys.Acta*. 150:333-340.

Lentz, B.R.; Barrow, D.A.; Hoechli, M. 1980. "Cholesterol-phospholipid interactions in multilamellar vesicles". *Biochemistry*. 19:1943-1954.

Lindahl, E.; Hess, B. and van der Spoel, D. 2001. "GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis". *J. Mol. Mod.* 7:306-317.

McConnell, H.M. Spin Labelling, Theory and Application. 1976 "Molecular Motion in Biological Membranes". Berliner, L.J.. Academic Press, New York. 565

Merger, F.; Wood, M. G.; Richardson, S. D.; Zhou, Q. Z.; Elrington, A.R. 1988. "Chain-substituted lipids in monolayer films. A study of molecular packing". *J. Am. Chem. Soc.* 110:6797-6803.

Nagle, J.F.; Wiener, J.C. 1988. "Structure of fully hydrated bilayer dispersions". *Biochim. Biophys. Acta (BBA)*. 7:1-10.

Nagle, J.F.; Zhang, R.; Tristram-Nagle, S.; Sun, W.; Petrache, .H.I; Suter, R.M. 1996. "X-ray structure determination of fully hydrated L alpha phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers". *Biophys. J.* 70(3):1419-31.

Nosé, S. 1984. "A molecular dynamics methods for simulations in the canonical ensemble". *Mol. Phys.* 52:255-268.

Ocko, B.M.; Kelley, M.S. 2002. "Structure and Phase Behavior of Mixed Monolayers of Saturated and Insaturated Fatty acids". *Langmuir*. 18:9810-9815.

Pake G.E.1962. *Paramagnetic Resonance*. Benjamin, New York, 1962.

Patra, M.; Karttunen, M.; Hyvonen, M.T.; Falck, E.; Vattulainen, I. 2004. "Lipid bilayers driven to a wrong lane in molecular dynamicssimulations by subtle changes in long-range electrostatic interactions.". *J. Phys. Chem. B.* 108:4485-

4494.

Peng, J.B.; Barnes, G.T.; Gentle, I.R. 2001. "The Structure of Langmuir-Blodgett films of Fatty acids and their salts". *Advances In Colloid and Interfaces Science*. 91:163-219.

Pilbrow, J.R. 1990. "Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance". Clarendon Press. Oxford.

Refson, K. 2001. "Moldy's user manual"

Risse, T.; Hill, T.; Schmidt, G.; Hamman, H.; Freund, H.J. 1998. "Investigation of the Molecular Motion of Self-Assembled Fatty Acid Films". *J.Phys.Chem. B*. 102:2668-2676.

Risse, T.; Hill, T.; Schmidt, G.; Hamman, H.; Freund, H.J. 1998. "Investigation of the rotational motion of self-assembled fatty acid films: An electron paramagnetic resonance line shape analysis". *J.Chem.Phys.* 108:8615-8625.

Rivas, M.G.; Gennaro, A.M. 2003. "Detergent resistant domains in erythrocyte membranes survive after cell cholesterol depletion: an EPR spin label study". *Chemistry and Physics of Lipids*. 122:165-169.

Rodi, P.M.; Cabeza, M.S.; Gennaro, A.M. 2006. "Detergent solubilization of bovine erythrocytes. Comparison between the insoluble material and the intact membrane". *Biophys. Chem.* 122:114-122.

Ryckaert, J.P.; Bellemans, A. 1975. "Molecular dynamics of liquid alkanes". *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 66:95-106.

Ryckaert, J.P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. 1977. "Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints; Molecular Dynamics of n-alkanes". *J.Comp.Chem.* 23:327-341.

Schmidt, M.W.; Baldrige, K.K.; Boats, J.A.; Elbert, S.T.; Gordon, M.S.; Jensen, j.H.; Koseki, S., Matsunaga, N.; Nguyen, K.A.; Su, S.; Windus, T.L.; Dupuis, M.; Montgomery, J.A. 1993. "GAMESS". *J. Comp. Chem.* 14:1347-1363.

Simons, K. and Vaz, W.L. 2004. "Model systems, lipid rafts, and cell membranes". *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 33:269-95.

Singer, S.J.; Nicholson, G.L. 1972. "The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes". *Science.* 175:720-731.

Smondryev A.M.; Berkowitz M.L. 1999. "Structure of dipalmitoyl-phosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: molecular dynamics simulations". *Biophys. J.* 77:2075-2089.

Steinhoff, H. and Hubbell, W. 1996. "Calculation of Electron Paramagnetic Resonance Spectra from Brownian Dynamics Trajectories: Application to Nitroxide Side Chains in Proteins.". *Biophys J.* 71:2201-2212..

Taylor, M.G.; Smith, I.C. 1983. "The Conformation of Nitroxide-Labelled fatty acid probes of Membranes Structure as Studied by ²H-NMR". *Biochim. Biophys. Acta.* 733(2):256-63.

Tieleman, D.P.; Marrink, S.J.; Berendsen, H.J.C. 1997. "Reviews on Biomembranes". *Biochim. Biophys. Acta.* 1331:235-270.

Tristram-Nagle, S.; Zhang, R.; Suter, R.M.; Worthington, C.R.; Sun, W.J. and Nagle, J.F. 1993. "Measurement of chain tilt angle in fully hydrated bilayers of gel phase lecithins.". *Biophys. J.* 64:1097-109.

Tu K.; Klein M.L.; Tobias D.J. 1998. "Constant-pressure molecular dynamics investigation of cholesterol effects in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer". *Biophys J.* 75:2147-2156.

Ulman A.. 1991. Academic Press.

van Aalten, M.F.; Bywater, R.; Findlay, J.B.C.; Hendlich, M.; Hooft, R.W.W.; Vriend, G. 1996. "PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular. *Journal of Computer Aided Molecular Design.* 10:255-262.

van Maaren, P. J.; van der Spoel, D. 2001. " Molecular Dynamics Simulations of Water with Novel Shell-Model Potentials". *J. Phys. Chem. B.* 105(13):2618-2626.

Wiener, M.C.; White, S.H. 1992. "Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups". *Biophys. J.* 61(2):428-33.

Wisniewska, A; Nishimoto, Y.; Hyde, J.S.; Kusumi, A.; Subczynski, W.K. 1996. "Depth dependence of the perturbing effect of placing a bulky group (oxazolidine ring spin labels) in the membrane on the membrane phase transition". *Biochim.Biophys.Acta. Biomembranes.* 1278(1):68-72.