



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
INSTITUTO DE FISICA Y MATEMATICAS

SIMULACIÓN Y EXPERIMENTOS DE SISTEMAS LIPÍDICOS EN PRESENCIA DE AGENTES EXTERNOS

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en el Área de Física

Presenta

Gonzalo Rafael Vargas Castañeda

Director de Tesis:

Dr. José Antonio González Cervera

Co-director de Tesis:

Dr. Gabriel Espinosa Pérez

MORELIA, MICH. MARZO 2023

Dedicatoria

A mi esposa, mi hija, mis padres y mis tres hermanos.

Resumen

La membrana celular es sumamente compleja al estar compuesta fundamentalmente por múltiples tipos de lípidos y proteínas; las proteínas embebidas en la membrana son las encargadas de desarrollar numerosas funciones celulares, mientras que diversas enfermedades han sido atribuidas a el funcionamiento inadecuado de las proteínas. Desde hace varias décadas se han estudiado las funciones de las proteínas en nuestro cuerpo, mientras el diseño de los fármacos para tratar algunos padecimientos se han enfocado a la activación o inhibición de las funciones proteicas; el impacto de los fármacos en la membrana queda en segundo plano. En relación a esto, una de las principales discusiones que se desarrollan en la actualidad, tanto en entornos sociales como científicos, ha sido el uso de la marihuana como tratamiento farmacéutico. Diferentes trabajos han estudiado los objetivos moleculares al situar numéricamente compuestos de la marihuana y ver con que proteínas mantiene una mayor actividad o predisposición a adherirse. En este proyecto se estudiarán los efectos estructurales y energéticos que causan la introducción de drogas, con propiedades anestésicas generales (morfina y sevoflurano) y locales (lidocaína), en una membrana monocapa de Langmuir; lo anterior se desarrolló de manera numérica mediante algoritmos de dinámica molecular y de manera experimental utilizando la palangana de Langmuir. Así mismo, se utilizan los resultados numéricos estructurales y energéticos para comparar los cambios inducidos por los componentes más abundantes de la marihuana (CBD Y THC) en una monocapa y asociar las observaciones con posibles propiedades anestésicas de estos componentes.

Palabras clave: Dinámica molecular, palangana de Langmuir, morfina, lidocaína, CBD, THC, sevoflurano.

ABSTRACT

The cell membrane is extremely complex as it is composed mainly of by multiple types of lipids and proteins; proteins embedded in the membrane are responsible for developing numerous cellular functions, while various Diseases have been attributed to the improper functioning of proteins. For several decades, the functions of proteins in our body, while the design of drugs to treat some conditions is they have focused on the activation or inhibition of protein functions; the impact of drugs in the membrane takes a backseat. In relation to this, one of the main discussions that take place today, both in social environments as scientists, it has been the use of marijuana as a pharmaceutical treatment. Different works have studied the molecular targets by numerically locating marijuana compounds and see with which proteins it maintains a greater activity or predisposition to adhere. In this project we will study the structural effects and energetic that cause the introduction of drugs, with anesthetic properties general (morphine and sevoflurane) and local (lidocaine), in a monolayer membrane of Langmuir; the above was developed numerically by algorithms of molecular dynamics and experimentally using the Langmuir basin. Likewise, the structural and energetic numerical results are used to compare the changes induced by the most abundant components of marijuana (CBD AND THC) in a monolayer and associate the observations with possible properties anesthetics of these components.

Agradecimientos

Siendo este mi último trabajo en formato de tesis, me gustaría comenzar agradeciendo a mis padres, ya que ellos fueron, son y seguirán siendo mi fuente inagotable de amor, comprensión y cariño. Les agradezco infinitamente todo su apoyo y consejo que me han brindado a lo largo de toda mi vida; uno de mis mayores deseos en esta vida es que el tiempo me alcance para devolverles un poco de todo lo que me han dado, los amo muchísimo. Este trabajo es por y para ustedes.

A mi esposa Wendy, no tengo forma de agradecerte las formas en las que me has ayudado a crecer como persona; todos los retos que la vida nos ha puesto y que hemos superado, son solo una muestra de lo mucho que nos amamos. Gracias por todo tu cariño y por las aventuras que hemos vivido, eres sin duda alguna la mejor compañera y amiga que la vida pudo haber puesto a mi lado para reír, llorar y disfrutar este camino, siempre juntos, te amo <3.

La niña que hace mis días siempre diferentes, que llena mi vida de alegría y siempre tiene un comentario que hacer y tiene una sonrisa pícara en su carita, esa niña es mi hija Ailyn; no sabes lo mucho que te amo. Eres mi razón de ser, mi motivo de seguir superándome y crecer.

Mis tres hermanos, dos de sangre (Andy y Paty) y una adoptada (Cass) son mis mejores amigos por siempre. Todas y cada una de las veces que nos juntamos, aunque sean pocas al año, son divertidísimas y llenan mi corazón de orgullo y felicidad que yo sea parte de su familia y ustedes de mi vida. Gracias por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas.

Me gustaría también agradecer a mis abuelitos, que siempre me han brindado mucho amor y han tenido en su boca palabra de aliento o cariño, sabiendo, sin tener que decir nada, mis emociones. Gracias por todas sus enseñanzas y por todo su amor.

Quisiera agradecer a mis asesores Gabriel y José Antonio que me han ayudado a pesar de los inconvenientes o diferentes formas de pensar. Gracias por sus consejos y enseñanzas, espero no haberles dado tantos dolores de cabeza y tienen siempre mi gratitud por todo el tiempo que me prestaron.

Por último pero para nada menos importante, quisiera agradecer a la institución que me otorgó su apoyo financieramente a lo largo de la maestría y doctorado, el CONACyT. Como también al Instituto de Física y Matemáticas, y en general a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo que fueron mi casa por estos once años de estudio.

Índice general

Resumen	III
Agradecimientos	V
1. Introducción	1
1.1. Organización de la tesis	6
1.2. Objetivos	8
2. Conceptos Fundamentales	11
2.1. Lípidos	11
2.2. Membranas	13
2.3. Interfases	15
2.3.1. Tensión superficial	16
2.3.2. Presión superficial	19
2.3.3. Módulo de compresibilidad	19
2.4. Monocapas de Langmuir	22
2.5. Energía libre	24
3. Materiales y Métodos	27
3.1. Métodos y procedimientos numéricos	27
3.1.1. Algoritmos para la Dinámica Molecular	27
3.1.2. Métodos para el Análisis de Resultados de DM	31
3.1.3. Cálculo de Energía Libre	34
3.1.4. Procedimientos y parámetros	38
3.2. Materiales y métodos experimentales	44
3.2.1. Materiales	44
3.2.2. Métodos	44
3.2.3. Obtención de las Isotermas	49
3.2.4. Introducción de las drogas a los sistemas	51
4. Dinámica Molecular de las Membrana con Agentes Externos	55
4.1. Comprobación de los métodos numéricos	55
4.1.1. Configuraciones iniciales	55
4.1.2. Minimización de energía y equilibrio	56
4.1.3. Dinámica Molecular	60

4.2. Membrana DPPC/DPPG con agentes externos	61
4.2.1. Validación de los sistemas iniciales	62
4.2.2. Interacción membrana-drogas	65
4.2.3. Cambios físicos y estructurales	66
4.2.4. Resultados para la energía libre	73
5. Membrana DPPC y Sevoflurano	79
5.1. Resultados experimentales	79
5.1.1. Influencia de alcohol etílico en la monocapa	80
5.1.2. Análisis de isotermas y módulos de compresibilidad	82
5.2. Resultados numéricos	88
5.2.1. Tensión superficial	89
5.2.2. Propiedades estructurales	90
5.2.3. US	94
6. Conclusiones	97
Bibliografía	99
Índice de figuras	109
A. Anexo	115
A.1. Anexo A: Discretización de las ecuaciones DM	115
A.2. Anexo B: Resultados numéricos de la mebrana de DPPC	118

Capítulo 1

Introducción

El estudio de las membranas y las funciones que estas desarrollan en el cuerpo humano son de gran interés para la comunidad científica. Los estudios sobre membranas comenzaron desde hace aproximadamente dos siglos, cuando los primeros reportes de las existencias de estas barreras empezaron a surgir. En tiempos modernos, la importancia de entender el funcionamiento de estos sistemas tiene impacto en áreas de salud y alimentos, así como en diversas áreas más.

La curiosidad humana ha sido parte fundamental del crecimiento de los avances tecnológicos y científicos. Parte de ella, nace de las observaciones que se realizan ante fenómenos que ocurren en la naturaleza. Uno de ellos sucedió hace varios siglos, donde los marineros se percataron que cuando se vertía aceite sobre las olas, estas disminuían significativamente su intensidad; de estas observaciones se tiene un primer registro por el militar romano Cayo Plinio segundo (29-73 d.C.), también conocido como Plinio el Viejo [1].

En tiempos más recientes, Benjamin Franklin [2] fue el primero en calcular que una cucharada de aceite de aproximadamente 2 mL se esparce por una superficie de 0.2 hectáreas, calculando que el tamaño de la membrana formada por el aceite sobre el agua debería de tener un espesor menor a 2 nm. Mientras que John William Strutt [3] determinó que el espesor de la membrana de los experimentos de Franklin debe corresponder al tamaño de una molécula, así fue como el estudio de las monocapas comenzó.

Aparentemente, la primera mención relativa a que las células están compuestas por una membrana se atribuye al botánico alemán Wilhelm Friedrich Philipp Pfeffer [4], quien es conocido como el pionero de la fisiología vegetal moderna. El trabajo de Pfeffer consistió en estudiar el metabolismo vegetal, particularmente el fenómeno de la ósmosis en las plantas. En su trabajo desarrolló una membrana semiporosa cuyos resultados concluyeron que alrededor de las células de las plantas debe haber una superficie invisible y muy delgada con propiedades osmóticas, a esta superficie la llamó membrana biológica. Dentro de los resultados derivados del trabajo de Pfeffer, que son muy relevantes para este trabajo, se encuentra la propiedad de algunas sustancias para atravesar las membranas, por lo que su aparente impermeabilidad depende de la naturaleza química de la sustancia que entre en contacto con la misma; fue Charles Ernest Overton [5] quien descubrió que las sustancias no polares atraviesan con mayor facilidad las membranas.

Un hecho importante es que el primer diseño de una palangana, que es uno de los instrumentos que se utilizan para medir la presión superficial, fue realizado por Agnes Pockels [6] en la cocina de su casa para estudiar las contaminaciones en superficies en relación al espacio disponible para diferentes tipos de aceites. Los jabones y aceites son tensoactivos compuestos por moléculas con un hidrocarburo hidrófobo de cadena larga unido a un grupo de cabeza hidrófilico, como un alcohol, un ácido carboxílico o una amina. Pockels midió la presión superficial, la diferencia entre las tensiones superficiales del agua y de la capa orgánica; informó que pequeñas cantidades de petróleo en la superficie del agua no tienen un efecto apreciable. Sin embargo, descubrió que la presión superficial aumentaba repentinamente cuando la concentración de petróleo por unidad de área aumentaba, más allá de un cierto límite. Por lo tanto, Pockels fue la primera en demostrar una transición de fase inducida por compresión en lo que hoy se denomina isoterma de compresión. En trabajos posteriores [7, 8], Pockels reportó la importancia de la limpieza en los sistemas para la medición de la presión superficial, así como las concentraciones mínimas de diferentes aceites para obtener una monocapa.

Fue a mediados de la segunda década del siglo XX cuando Irving Langmuir tomo

el trabajo pionero de Pockels y lo mejoró a lo que al día de hoy se le conoce como la palangana de Langmuir, para determinar las propiedades fundamentales de las películas orgánicas en líquidos. En 1916, Langmuir publicó en el *Journal of the American Chemical Society* un artículo sobre películas orgánicas en agua [9]; en el cual realizó diversos grandes aportaciones a la ciencia, entre ellas esta la determinación del rango espacial de las fuerzas de van der Waals entre las moléculas de la película, también describió la naturaleza de las moléculas anfifílicas (aquellas que tienen cabezas, polares y no polares; y cadenas de carbonos, colas), así como la base física de su comportamiento. A partir de experimentos realizados con una amplia gama de monocapas basadas en ácidos grasos, determinó las áreas transversales de las moléculas y su orientación con respecto a la superficie, por lo tanto, pudo deducir la configuración molecular mucho antes del desarrollo de las técnicas espectroscópicas modernas. Siguiendo el trabajo de Pockels, Langmuir también demostró que a medida que las monocapas continúan siendo comprimidas, experimentan transiciones de fase de un gas 2D a un líquido y finalmente a un sólido [9, 10].

En el siglo XX se desencadenaron una serie de eventos y descubrimientos físicos, químicos y biológicos que dieron origen a una nueva era del conocimiento humano; tal como el modelo de la célula conocido como mosaico fluido [11] en el cual incorporan a los lípidos de la membrana biológica celular las proteínas como un conjunto heterogéneo de moléculas globulares, cada una dispuesta en una estructura anfipática, es decir, con los grupos iónicos y altamente polares que sobresalen de la membrana hacia la fase acuosa y los grupos no polares (véase la Fig. 1.1), en gran parte inmersos en el interior hidrofóbico de la membrana. Estas moléculas globulares están parcialmente incrustadas en una matriz de fosfolípidos. La mayor parte de los fosfolípidos se organizan como una bicapa fluida discontinua, aunque una pequeña fracción de los lípidos pueden interactuar específicamente con las proteínas de la membrana.

Considerando las células animales, la membrana que protege las células es conocida como membrana plasmática [12] cuya principal función es regular el ingreso y salida de material a la célula. Por su parte, las proteínas son moléculas grandes y muy complejas que desempeñan diferentes funciones como: anticuerpos, enzimas, mensa-

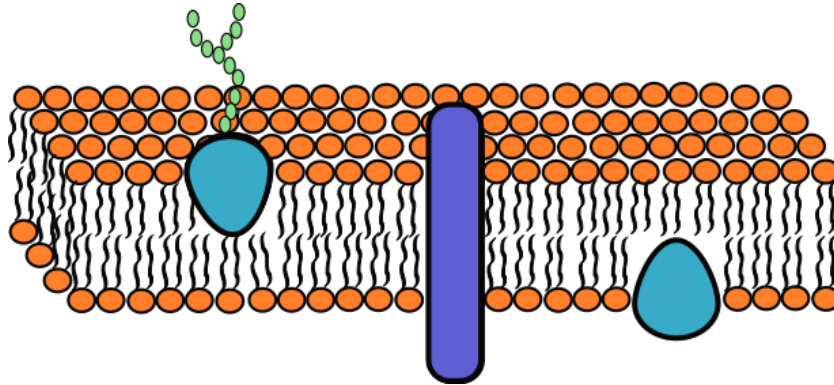


Figura 1.1: Esquema del modelo de membrana celular como un mosaico fluido donde los lípidos componen una matriz y las proteínas están inmersas en la matriz. Imagen adaptada de [11].

geras, estructurales, transporte y almacenamiento. Existen estudios que relacionan los efectos de ciertas enfermedades en nuestro organismo al mal funcionamiento de las proteínas embebidas en la membrana [13], por lo que la mayoría de las drogas que se hacen están diseñadas para atacar o adherirse a ciertas proteínas y así activar o inhibir su actividad [14].

El estudio de sistemas compuestos por membranas y proteínas suele ser muy complejo, debido a la basta composición de las membranas por lípidos, colesterol, ácidos grasos, así como el tamaño y variedad de las proteínas; por lo que una primera aproximación para entender estos sistemas biológicos se reduce al estudio de las membranas compuestas únicamente por lípidos. Los resultados de los estudios para estos sistemas pueden generalizarse en cierta medida debido a que, a pesar de la gran complejidad y variedad entre las membranas biológicas, se sabe que existen algunas características comunes para las membranas de organismos similares [15, 16]. Las proteínas, a su vez, dependen de la membrana que es su medio circundante y le brinda estabilidad estructural y funcional; no obstante, el estudio de los efectos de las drogas que causan a la membrana queda, a veces, descuidado. Este es el origen de la idea fundamental para este trabajo, en el cual se plantea el estudio de drogas con propiedades anestésicas y ver las similitudes en los efectos que causan en las membranas; para después comparar los resultados con algunos de los componentes más abundantes de la marihuana, dado que los estudios en torno a su uso terapéutico sigue siendo un tema de discusión.

Los primeros estudios sobre la marihuana comenzaron a principios del siglo XIX, los cuales revelaron por primera vez los efectos clínicos de los cannabinoides en el tratamiento de enfermedades como el cólera y las enfermedades reumáticas, entre otras [17, 18]. Desde el trabajo pionero de Thomas Wood que aisló el canabinol por primera vez [19], hasta su primera síntesis completa por parte de Lord Alan Todd [20], llegamos a la discusión moderna sobre sus usos médicos. En esta discusión, podemos tomar dos enfoques principales, uno que intenta demostrar que su uso no apropiado puede tener repercusiones significativas en la salud y el entorno social, [21, 22] y su contraparte, que estudia los componentes químicos de la marihuana de forma aislada para identificar sus propiedades beneficiosas en el cuidado de la salud [23]. En este trabajo, se adquiere una postura científica al investigar de manera aislada los componentes químicos más abundantes de la marihuana *in silico*.

La marihuana tiene diferentes compuestos químicos, los dominantes son Δ^9 - tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD), pero solo el THC es psicoactivo [24]. El cannabis es conocido por sus efectos psicotrópicos; sin embargo, hay informes de beneficios para las personas que sufren de dolor neuropático crónico no maligno [25], dolor por cáncer [23], autismo [26] o enfermedad de Parkinson [27].

El mecanismo terapéutico que resultan de los componentes de la marihuana es todavía vagamente conocido; por lo tanto, una serie de estudios sistemáticos relacionados con la identificación de objetivos potenciales, vías de señalización y su asociación con enfermedades son de interés para los investigadores. En particular, existe una línea de investigación enfocada en utilizar la dinámica molecular (DM) para identificar objetivos moleculares de los componentes del cannabis [28, 29, 30]; por ejemplo, Elmes (2014) [28] descubrió, mediante análisis computacional, que algunas proteínas de unión a ácidos grasos en el cuerpo humano se unen al THC y al CBD, lo que demuestra que el THC y el CBD inhiben el catabolismo celular y el metabolismo del anandamida endocanabinoide. Las simulaciones de dinámica molecular proporcionan datos que pueden ser difíciles de obtener a partir de experimentos, lo que permite a los investigadores formular hipótesis o probar modelos de interacción entre grupos funcionales y membranas. Por ejemplo, Kopec [31] revisa la información de diferentes

fuentes en las que se analiza la interacción de los lípidos con propiedades anestésicas, antiinflamatorias y antivirales, entre otras. En esta revisión se presenta una visión general de los cambios en las propiedades físicas de las bicapas lipídicas analizadas. Además, trabajos recientes informaron que la acción de la anestesia está relacionada con las proteínas incrustadas en las membranas celulares [32, 33].

Por lo tanto, estos informes indican que la interacción entre las membranas lipídicas y las diferentes moléculas está mediada por interacciones complejas y está lejos de lograr una descripción simple de la misma. A pesar de los recientes estudios experimentales y computacionales sobre las propiedades del cannabis, no se ha estudiado a fondo cómo afecta a las monocapas y bicapas lipídicas.

El surfactante pulmonar es la primera barrera de defensa de nuestro cuerpo contra agentes extraños a través de la respiración, considerando que los surfactantes pulmonares de mamíferos se pueden imitar en una proporción de 4:1 de lípidos fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilglicerol (PG) [34, 35, 36], se estudiarán sistemas computacionales de una monocapa lipídica mixta de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) con dos moléculas con propiedades anestésicas, local (lidocaína) y general (morfina), y los dos compuestos más abundantes en el cannabis, el cannabidiol (CBD) y tetrahidrocannabinol (THC). Para complementar los resultados de este trabajo, se realizaron una serie de experimentos numéricos y experimentales para el sevoflurano (SF) que es una droga utilizada como anestesia general [37]; utilizando como membrana una monocapa constituida únicamente con DPPC; las estructuras atómicas para las moléculas que se estudiaron en este trabajo se ilustran en la Fig. 1.2, donde los átomos relevantes para el análisis que se desarrolla en secciones posteriores se resaltan en color rojo y azul.

1.1. Organización de la tesis

En el capítulo 2 se describe brevemente los conceptos fundamentales relacionados al trabajo que se desarrolló como lo son: lípidos, membranas, tensión superficial y energía libre. En el capítulo 3 se desarrolla una descripción de los algoritmos y proce-

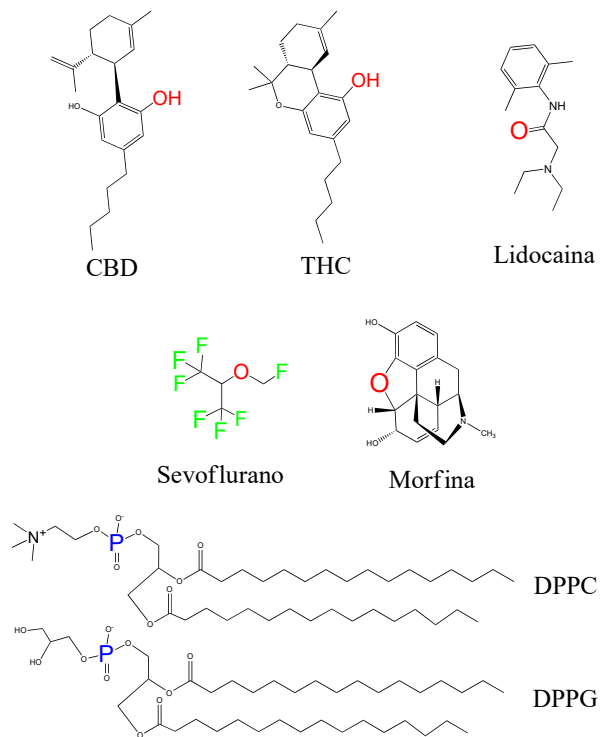


Figura 1.2: Estructura atómica de las moléculas utilizadas en este trabajo. Los átomos en color rojo (drogas) y azul (lípidos) serán utilizados en secciones posteriores para realizar el cálculo de la función de distribución radial entre las drogas y los lípidos.

dimientos utilizados para implementar la dinámica molecular, así como los materiales y métodos empleados para llevar a cabo los experimentos. Dentro del capítulo 4 se presentan los resultados numéricos del estudio de las variaciones estructurales y energéticas que se dan entre una membrana de DPPC/DPPG con drogas con propiedades anestésicas como morfina y lidocaína, así como los principales componentes de la marihuana que son CBD y THC. A lo largo del capítulo 5 se muestran los resultados experimentales y numéricos de la interacción de una membrana de DPPC en presencia de la droga sevoflurano. Por último, en el capítulo 6 se escriben las conclusiones y trabajo a futuro de la investigación desarrollada en esta tesis.

1.2. Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo general estudiar los cambios físicos, estructurales y energéticos que experimentan los sistemas lípidos-droga a través de la dinámica molecular en equilibrio, el análisis del potencial de fuerza media y resultados experimentales. Los experimentos consisten en utilizar la palangana de Langmuir para obtener isothermas de sistemas compuestos por una monocapa de DPPC y la monocapa de DPPC con sevoflurano.

Objetivos específicos

- Aprender los conceptos fundamentales relacionados con el estudio de sistemas lipídicos así como los procedimientos para realizar los experimentos y simulaciones necesarias para este trabajo
- Implementar las diferentes ensambles que se pueden desarrollar en la dinámica molecular para elegir el ensamble adecuado para este trabajo, en los cuales se mantiene fijo el número de partículas (N) y temperatura (T) variando: volumen (NVT), presión (NPT) o tensión superficial ($N\gamma T$)
- Estudiar los efectos estructurales y energéticos que causan la introducción de las diferentes drogas a las membranas *in silico*

- Comparar resultados numéricos y experimentales de la tensión superficial mediante el estudio del sevoflurano
- Plantear una hipótesis sobre cómo se pueden asociar las propiedades anestésicas del cannabis con sus características moleculares al comparar los resultados obtenidos para la lidocaína y la morfina.

Capítulo 2

Conceptos Fundamentales

2.1. Lípidos

Los lípidos son uno de los principales componentes de las membranas celulares, es por ello que es importante entender los sistemas lipídicos. Existen diferentes tipos de lípidos y su estructura es muy variada, sin embargo su principal característica es que son biomoléculas solubles en solventes no polares y que son moléculas anfífilas; es decir, moléculas que contienen regiones tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Existe una gran variedad de lípidos presentes en nuestro organismo, algunos de los lípidos más comunes son los triglicéridos, esteroides (siendo el colesterol el más conocido), los ácidos grasos y fosfolípidos (como lo es el DPPC que se introducirá más adelante); sus estructuras moleculares se encuentran en la Fig. 2.1.

Cada lípido que se encuentra en nuestros organismos desempeñan una función diferente. Los triglicéridos son los lípidos más abundantes en el cuerpo humano, estos a su vez los obtenemos de los alimentos como carne, aceites, entre otros; sin embargo, no son necesarios en todo momento ya que el cuerpo almacena las calorías ingeridas sobrantes en células grasas y son liberadas a medida que el cuerpo necesita energía.

El colesterol desempeña funciones vitales para nuestro cuerpo; como lo son: producir hormonas, vitamina D y sustancias que ayudan a la digestión. El cuerpo humano produce todo el colesterol que necesita; no obstante, el colesterol se encuentra presente en diferentes alimentos por lo que su ingesta en demasía aumentará los niveles de

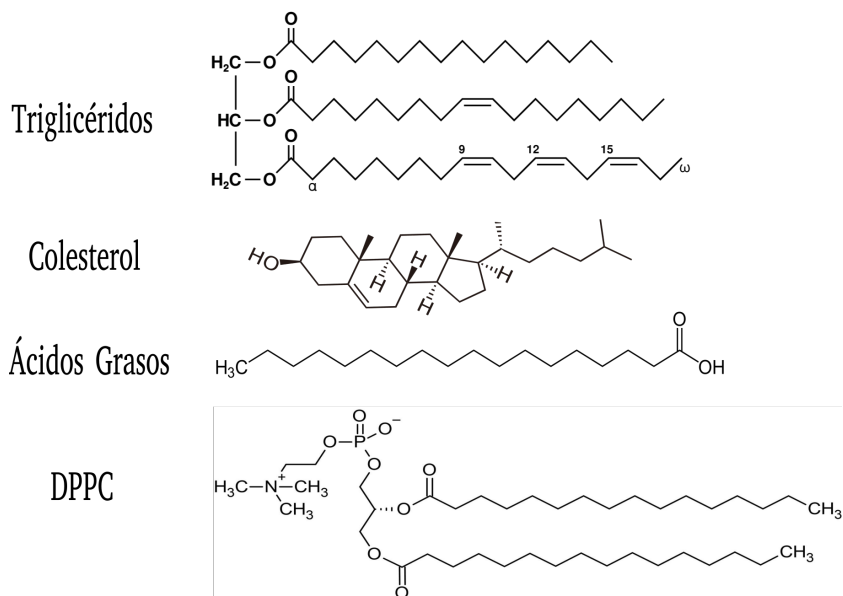


Figura 2.1: Estructuras moleculares de los lípidos más abundantes en la naturaleza.

colesterol en la sangre que a su vez se transforma en un incremento de placa que se adhiere a las paredes de los vasos sanguíneos. El exceso de triglicéridos y colesterol en nuestro cuerpo puede conllevar una vasta serie de enfermedades cardiovasculares.

Los ácidos grasos se obtienen en el proceso de la digestión al descomponer las grasas que se ingieren, posteriormente se pueden formar diferentes moléculas a partir de ellos; como lo son los triglicéridos cuando se unen en ternas por medio de un glicerol [38].

En la composición de las membranas los lípidos más abundantes son conocidos como fosfolípidos debido a que contienen un grupo fosfato. La mayoría de estos lípidos se encuentran contruidos sobre un glicerol, por lo que también son conocidos como fosfoglicéridos. Estos lípidos son diglicéridos debido a que solo dos de los grupos hidróxilos del glicerol se encuentran esterificados por ácidos grasos.

Existe una gran variedad de fosfoglicéridos, pero esencialmente comparten dos características fundamentales. La parte hidrofílica de este tipo de lípidos es llamada cabeza polar o simplemente cabeza del lípido, cuya variedad se debe a las moléculas enlazadas al grupo fosfato. Las más comunes son la colina (fosfatidilcolina, PC), etanolamina (fosfatidiletanolamina, PE), serina (fosfatidilserina, PS), o inositol (fos-

fatidilinositol, PI). Cada uno de ellos forma un dipolo permanente debido a su carga positiva en contraste con la carga negativa del grupo fosfato, de aquí el nombre de cabeza polar.

Por último se tiene a la parte hidrofóbica de los lípidos llamada como colas de hidrocarburos o hidrocarbonadas que son los ácidos grasos. Los ácidos grasos pueden ser saturados (no presentan enlaces dobles de carbono en su estructura), monoinsaturados (presentan un enlace doble de carbono) o poliinsaturado (más de un enlace doble de carbono). La variedad de ácidos grasos se puede representar mediante la relación $X : Y$, donde X representa la cantidad de carbonos en la cadena del ácido y Y la cantidad de enlaces dobles; de esta manera y como ejemplo se ilustran en la Fig. 2.2 los ácidos 4:0 que representa una cadena de 4 carbonos con 0 enlaces dobles (ácido butírico) y 16:1 que es una cadena de 16 carbonos con un enlace doble (ácido palmitoleico).

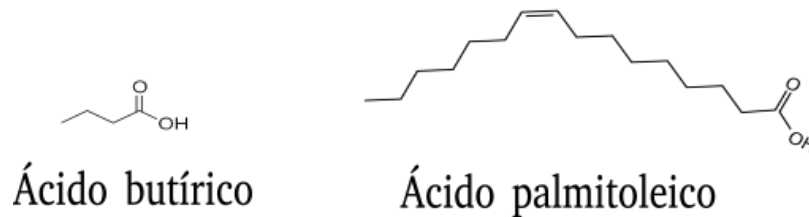


Figura 2.2: Ejemplo de la nomenclatura X:Y para los ácidos grasos 4:0 conocido como ácido butírico y 16:1 conocido como ácido palmitoleico.

2.2. Membranas

Debido a la naturaleza anfifílica de los lípidos, cuando se encuentran dispersos en un medio polar, forman agregados de diferente geometría incluso a densidades bajas. Donde la parte polar de los lípidos queda en contacto con el medio acuoso y las colas hidrocarbonadas quedan apuntando hacia fuera del medio. Este comportamiento se debe al efecto hidrofóbico [39], donde la estructura formada por los lípidos protege a

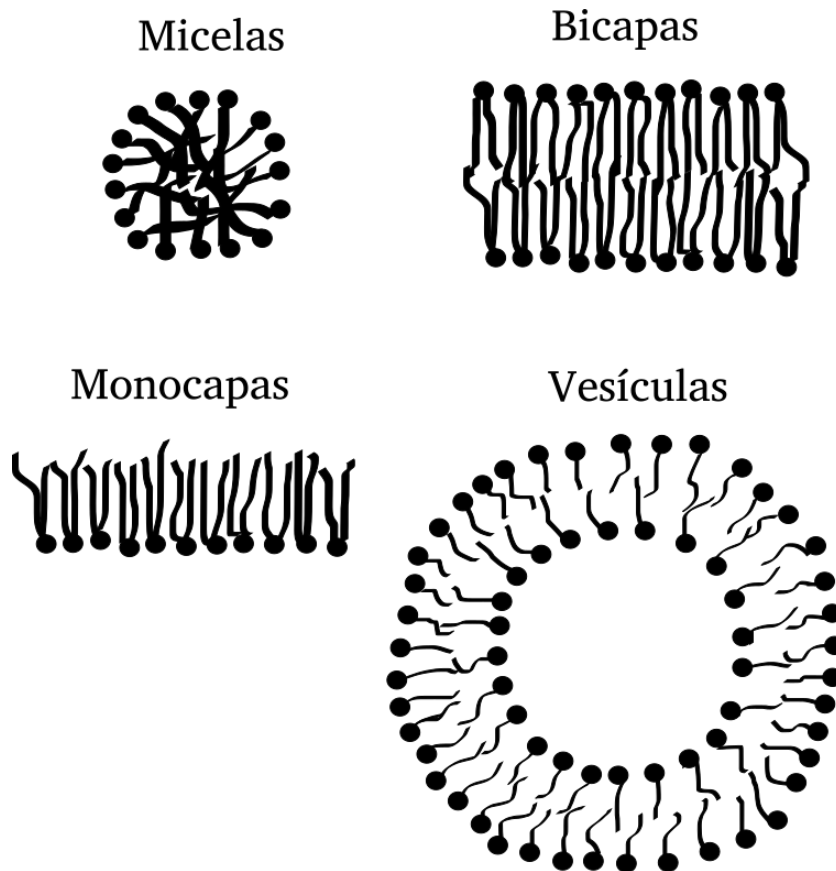


Figura 2.3: Ilustración de las diferentes estructuras que pueden obtenerse del agrupamiento de los lípidos dispersos en un medio. Imagen realizada con base en [39].

las colas del medio. Este efecto se puede explicar brevemente analizando que la geometría tomada por los agregados de lípidos trata de llevar al sistema a una formación energéticamente favorable.

Los sistemas compuestos por los lípidos se catalogan como sistemas coloidales debido a que presentan dos o más fases, como se explica más adelante. Existen una vasta colección de sistemas coloidales, aunque comparten algunas propiedades en común; usualmente se componen por una fase continua y otra dispersa en forma de partículas de tamaño entre 1 nm y 1 μm [40], a estas partículas se les denomina partículas coloidales [41]. Dependiendo de la fase y de las propiedades del material disperso se pueden presentar una gama de sistemas, algunos ejemplos de estos sistemas se mencionan en la Tabla 2.1.

Hablando específicamente de las formaciones debidas a lípidos dispersos en fases

		Fase dispersa		
		Gas	Líquido	Sólido
Fase continua	Gas	No es posible	Niebla	Humo
	Líquido	Espuma	Membranas	Pinturas
	Sólido	Aerogeles	Gelatina	Cristal de ruby

Tabla 2.1: Ejemplos de formaciones coloidales para diferentes fases dispersas en relación a la fase continua, tabla tomada de [42].

líquidas, las interacciones que determinan la geometría de las formaciones son débiles (como van der Waals, hidrofóbicas, de enlaces de hidrógeno o de apantallamiento electrostático) [41]; por lo que la geometría de los agregados depende considerablemente de múltiples factores como los son: temperatura del medio, pH, concentración y forma de los lípidos. Algunas de las geometrías encontradas en este tipo de sistemas son: micelas, bicapas, monocapas y vesículas (véase Fig. 2.3). Estas estructuras reciben también nombres como coloides asociados o de asociación, fluidos complejos o materiales blandos de la cual deriva el nombre de la rama de la física que estudia estos colectivos conocida como Física de la Materia Condensada Blanda aludiendo también a las interacciones débiles (*soft interactions*) características en la dinámica de estos sistemas. Dentro de esta rama, existen formalismos matemáticos que estudian las condiciones y dinámica del ensamblaje de los lípidos en estas estructuras [39]; sin embargo y para fines prácticos, se considera ese tema más allá de los objetivos planteados en este trabajo. Centrándose únicamente en el estudio de las monocapas, tema principal de este trabajo, se describen en secciones posteriores las deducciones del cálculo para las propiedades físicas de las monocapas a partir de formalismos estadísticos y termodinámicos tanto experimental como numéricamente.

2.3. Interfases

En la física, se conoce como interfase a la separación entre dos regiones con diferentes materiales o el mismo material en diferente fase. Como ejemplo, se tiene las interfases líquido-líquido (agua-aceite) y las interfases líquido-gas (agua-vapor), así como se ilustra en la Fig. 2.4.

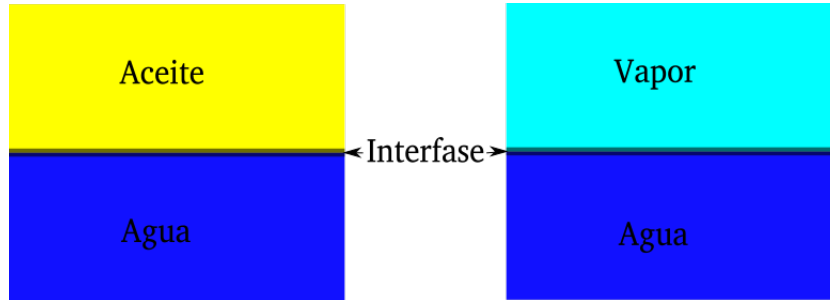


Figura 2.4: Esquema de la interfase para sistemas líquido-líquido (agua-aceite) y líquido-gas (agua-vapor).

La frontera o interfase se crea espontáneamente y puede ser entendida como un balance de fuerzas; desde un punto de vista simple, estas fuerzas tienen un origen intermolecular. Las moléculas en el interior del líquido son atraídas por sus vecinas aproximadamente igual en todas direcciones (molécula naranja en la Fig. 2.5), por lo que, en promedio temporal, no se espera una fuerza no balanceada en alguna dirección particular. Sin embargo, las moléculas en la capa de la superficie son atraídas igual por sus vecinas, no obstante sus vecinas están a sus costados y por debajo de ella (molécula verde en Fig. 2.5); por lo tanto, las moléculas de la superficie son atraídas al interior del cuerpo del líquido, disminuyendo el área superficial.

Dado que las moléculas de la superficie están rodeadas solo por los vecinos laterales e inferiores, no tienen asociada una energía tan baja como las moléculas al interior del líquido. Por lo que mover una molécula del interior del líquido a la superficie requiere añadir energía al sistema. Dado que la presencia de otra molécula en la superficie incrementará el área superficial, se deduce que se debe suministrar energía al sistema para incrementar el área superficial. La energía necesaria para incrementar el área superficial 1 m^2 se le conoce como tensión superficial.

2.3.1. Tensión superficial

Se puede definir la tensión superficial considerando que en la interfase de dos fluidos inmiscibles, llámese fluido 1 y fluido 2, los vecinos laterales de una molécula del fluido 1 pueden ser sustituidos por moléculas del fluido 2; esto conlleva un costo

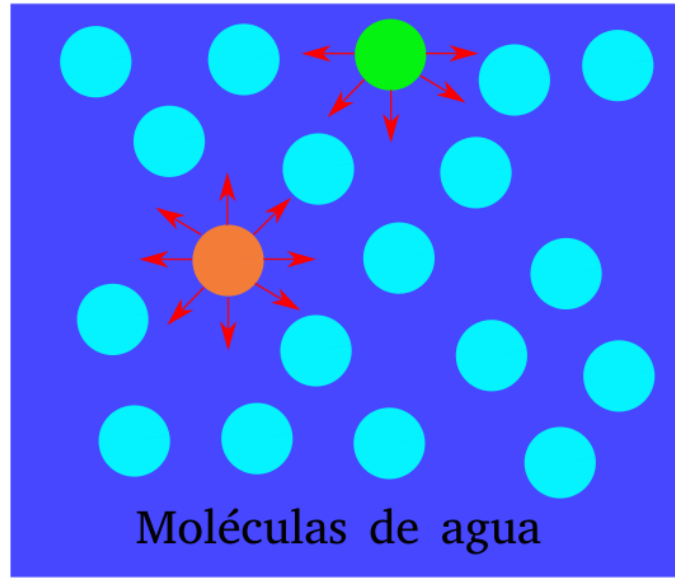


Figura 2.5: Balance de las fuerzas para moléculas de agua al interior del líquido (molécula naranja) y en la capa de la superficie (molécula verde). Imagen recreada a partir del libro [39].

energético ΔU igual a $U_{11} + U_{22} - 2U_{12}$ [41], donde U_{ij} es la energía de interacción entre una molécula del fluido i con otra del fluido j . Típicamente ΔU es del orden de $k_B T$, donde k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura en Kelvin. El costo energético por unidad de área requerido en la creación de la superficie, lo cual es la tensión superficial γ , es equivalente a $\Delta U/A_*$, donde A_* es el área promedio ocupada por una molécula en la superficie. Considerando que $A_* \approx l_*^2$, con l_* el tamaño promedio de las moléculas, obtenemos que:

$$\gamma \approx \frac{\Delta U}{l_*^2} \quad (2.1)$$

Para comprender mejor la tensión superficial, considérese un sistema donde se tiene una película delgada de un líquido que se estira sobre un alambre con un elemento móvil, tal como se ilustra en la Fig. 2.6. Si ahora se expande la película desplazando el alambre móvil a la derecha, se incrementa el área superficial. Para incrementar el

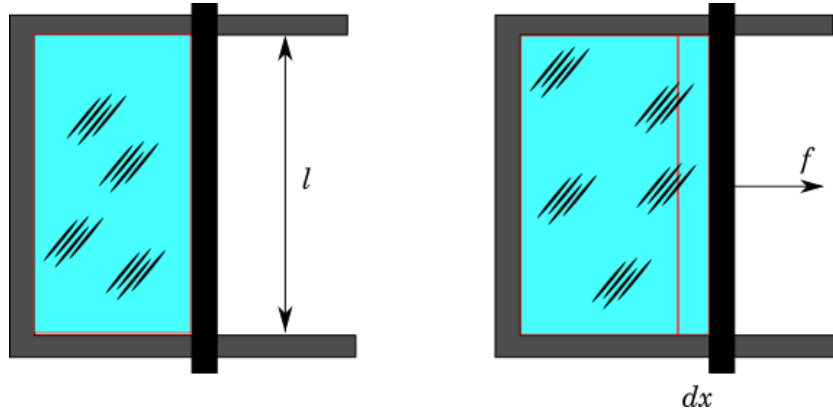


Figura 2.6: Estiramiento dx de una película de un líquido con un alambre de longitud l mediante una fuerza de magnitud f . Esquema realizado a partir de los esquemas mostrados en el libro [41].

área superficial en dA es necesario realizar un trabajo dW :

$$dW = f dx = \gamma dA = \gamma l dx \quad (2.2)$$

donde l es la longitud del alambre móvil, f es la fuerza necesaria para mover el alambre una distancia dx y γ es nombrada como energía superficial de Gibbs por unidad de área, también conocida como tensión superficial, cuyas unidades se expresa en Newtons por metro.

Desde un punto de vista más riguroso, se puede obtener una relación para γ a partir de la ec. 2.2, donde se relaciona que la tensión superficial esta ligada al trabajo necesario dW para incrementar el área superficial dA . Por lo que la variación de la energía libre de Helmholtz en esta transformación es descrita por la ecuación [41]:

$$dF = \gamma dA - PdV - SdT, \quad (2.3)$$

donde P es la presión, V el volumen y S la entropía. Considerando las variables pertinentes constantes, se obtiene que:

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{V,T}, \quad (2.4)$$

de manera equivalente, se puede obtener la relación de la tensión superficial para la energía libre de Gibbs ($dG = \gamma dA + VdP - SdT$), considerando la presión y temperatura constantes se obtiene que:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{P,T} \quad (2.5)$$

2.3.2. Presión superficial

Considérese una interfase agua-aire, el agua presenta un valor relativamente grande para la tensión superficial (72 mN/m a 20 °C) debido principalmente a que, en adición a las fuerzas de van der Waals y los enlaces hidrógeno, se presentan interacciones de carácter dipolar que incrementan el valor de la tensión superficial [39, 41]. Cuando en la interfase se introducen agentes externos, como lo son los lípidos, la tensión superficial disminuye; cualitativamente se puede asociar este fenómeno a que la parte hidrofílica de las moléculas se sitúa entre las moléculas de agua, esto hace que sean separadas entre sí, por lo tanto disminuyen las interacciones intermoleculares que deriva en una disminución de la tensión superficial. Al estudiar termodinámica, los sistemas involucran variables como volumen, temperatura y presión; en los sistemas que se analizaron en este trabajo se rigen bajo los parámetros de área, temperatura y presión superficial, que son los análogos de las variables termodinámicas clásicas. El parámetro de presión superficial (Π) se establece como la diferencia de la tensión superficial de una subfase (líquido puro) menos la tensión superficial de la subfase en presencia de los agentes externos [39, 41, 10]:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma. \quad (2.6)$$

2.3.3. Módulo de compresibilidad

La compresibilidad es un concepto estudiado en la mecánica de fluidos y termodinámica que asocia los cambios de volumen que experimentan los fluidos o sólidos debido a cambios de presión externas [43]. La deformación que sufren los cuerpos

pueden ser explicados de manera simple considerando la descripción lineal de la elasticidad de los cuerpos [44], donde la energía a lo largo de una dirección i es derivada a partir del tensor de desplazamiento u_{ij} :

$$u_{ij} = \frac{\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i}}{2}. \quad (2.7)$$

Utilizando esta aproximación, Kramer [45] obtuvo la siguiente expresión para la energía elástica por unidad de área contenida en una monocapa dos dimensional:

$$U_{elastica} = (1/2)E(u_{xx} + u_{yy})^2 + 2G(u_{xy}^2 - u_{xx}u_{yy}) - 2\Pi(u_{xz}^2 + u_{yz}^2) \quad (2.8)$$

donde E es el módulo de compresión superficial, G el módulo de cizallamiento y Π la presión superficial. De aquí se puede obtener la energía libre superficial F sumando el término de energía superficial simple $2\gamma_0(u_{xz}^2 + u_{yz}^2)$ a $U_{elastica}$:

$$U_{elastica} + 2\gamma_0(u_{xz}^2 + u_{yz}^2) = F \quad (2.9)$$

$$F = (1/2)E(u_{xx} + u_{yy})^2 + 2G(u_{xy}^2 - u_{xx}u_{yy}) - 2(\gamma_0 - \gamma)(u_{xz}^2 + u_{yz}^2) + 2\gamma_0(u_{xz}^2 + u_{yz}^2) \quad (2.10)$$

$$F = (1/2)E(u_{xx} + u_{yy})^2 + 2G(u_{xy}^2 - u_{xx}u_{yy}) + 2\gamma(u_{xz}^2 + u_{yz}^2). \quad (2.11)$$

Si se asume que u varía únicamente en la dirección x , se obtiene las siguientes relaciones para u_{ij} :

$$u_{ii} = \begin{cases} \frac{\partial u_x}{\partial x} & \text{si } i \text{ es } x \\ 0 & \text{otro caso} \end{cases} \quad (2.12)$$

$$u_{ij} = u_{ji} = \begin{cases} (1/2)\frac{\partial u_i}{\partial x} & \text{si } j \text{ es } x \\ 0 & \text{otro caso} \end{cases} \quad (2.13)$$

que derivan en una expresión simple para F :

$$F = (1/2)E \left(\frac{\partial u_x}{\partial x} \right)^2 + (1/2)G \left(\frac{\partial u_y}{\partial x} \right)^2 + (1/2)\gamma \left(\frac{\partial u_z}{\partial x} \right)^2. \quad (2.14)$$

Siguiendo el formalismo de Kramer desarrollado en [41], la fuerza por unidad de área se define como $\mathbf{F} = \partial^2 F / \partial u_{ij} \partial x_j$. En orden de relacionar E con la concentración superficial Γ , Levich consideró la fuerza de compresión $\mathbf{F}_x = E \partial^2 u_x / \partial x^2$ [46]. Esta fuerza a su vez se asocia al gradiente de tensión superficial, conocida también como la fuerza de Marangoni, análoga a la fuerza en el volumen en un medio donde la presión no es uniforme. En términos de Γ , \mathbf{F}_x puede ser escrita como $\mathbf{F}_x = -(\partial \Pi / \partial \Gamma)(\partial \Gamma / \partial x)$. Si se considera sistemas en los cuales es válido la conservación de la materia ($\partial \Gamma / \partial t + \Gamma \partial v_x / \partial x = 0$), se deriva que:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Gamma}{\partial x} &= -\Gamma \frac{\partial^2 u_x}{\partial x^2} \\ \mathbf{F}_x &= \Gamma \left(\frac{\partial \Pi}{\partial \Gamma} \right) \left(\frac{\partial^2 u_x}{\partial x^2} \right), \end{aligned} \quad (2.15)$$

de esta manera se define al módulo de compresión para una membrana insoluble como:

$$E = \Gamma \frac{\partial \Pi}{\partial \Gamma}. \quad (2.16)$$

De manera análoga, se tiene la representación del módulo de compresibilidad, considerando que el área promedio por molécula A y Γ son inversamente proporcionales:

$$E = -A \frac{\partial \Pi}{\partial A}. \quad (2.17)$$

El módulo de compresibilidad se puede obtener al derivar numéricamente los valores de la presión superficial reportados en la isoterma respecto al área por molécula promedio y multiplicarla por el valor del área por molécula.

Una interpretación cualitativa del comportamiento del módulo de compresibilidad puede derivarse de su interpretación como la energía necesaria para comprimir una superficie (o volumen); por lo que a valores altos de módulos de compresibilidad se requiere de una energía equivalente para comprimir la superficie haciendo al material poco compresible, o más rígido dicho de otra manera.

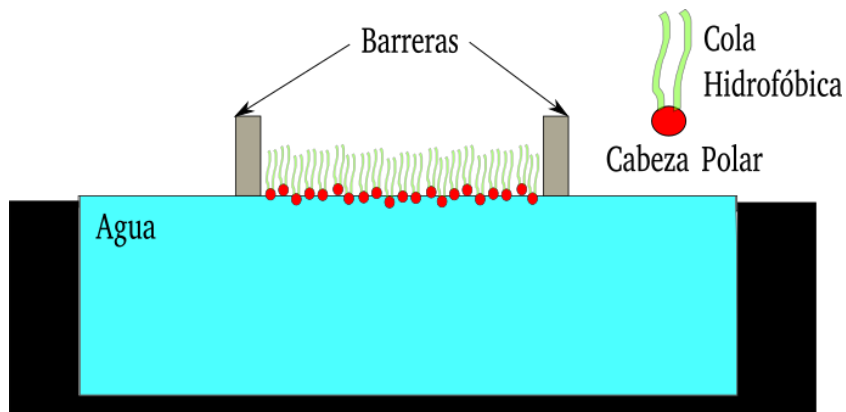


Figura 2.7: Esquema de una monocapa en la palangana de Langmuir.

2.4. Monocapas de Langmuir

Cuando los lípidos se esparcen en la interfase agua-aire, se le conoce como monocapa de Langmuir (en honor a Irving Langmuir), estas monocapas se caracterizan por ser insolubles en agua. Donde las cabezas polares de los lípidos quedan sumergidas en el agua, mientras que las colas hidrofóbicas quedan inmersas en la fase gaseosa (aire); la inclinación de las colas se determina por el arreglo de las moléculas circundantes, los tipos de lípidos que componen al sistema y el espacio disponible en el que se encuentran, mientras que si las moléculas se encuentran en un estado gaseoso (la separación entre los lípidos es muy grande) la inclinación de las colas es aleatoria.

Una de las principales diferencias, además de las estructurales, entre una monocapa y una bicapa es que la bicapa es mecánicamente estable en ausencia de un esfuerzo externo, mientras que las monocapas necesitan una presión lateral o superficial externa para mantener su fase en equilibrio. Usualmente, esta fuerza externa se añade por medio de barreras que contengan a la monocapa; el esquema de la Fig. 2.7 muestra una configuración clásica de una monocapa de Langmuir en un instrumento conocido como la palangana de Langmuir.

En la palangana de Langmuir las barreras son los elementos móviles análogos a Fig. 2.6, donde el área disponible para los lípidos en la interfase puede modificarse. La presión superficial se puede calcular en una palangana de Langmuir por medio de la introducción de una placa o rodillo que se moja en la superficie de la monocapa,

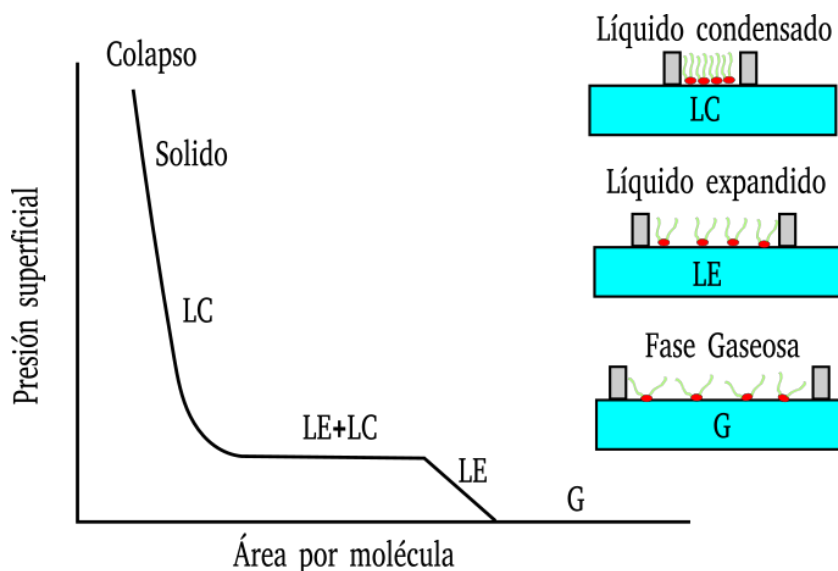


Figura 2.8: Ilustración de una isoterma para una monocapa de DPPC, así como una representación del ordenamiento de los lípidos en las diferentes fases de la monocapa: gaseosa (G), líquido expandido (LE), líquido condensado (LC) y sólido. Adaptación de [41].

este se une a un instrumento conocido como tensiómetro que al medir la fuerza que siente el rodillo se puede calcular la presión superficial (Π). De la relación entre Π y el área por molécula se obtienen gráficas conocidas como isothermas $\Pi - A$, como se ilustra en la Fig. 2.8, debido a que se desarrolla a temperatura constante.

Cuando el sistema está a áreas por moléculas grandes se presenta la fase gaseosa, la cual es caracterizada por poca interacción entre las moléculas. La primera aproximación puede ser mediante la expresión para los gases perfectos: $\Pi A_* \approx k_B T$. A medida que el área por molécula disminuye, se presenta una transición de fase gas-líquido; estas transiciones de fase son difíciles de estudiar debido a que sucede a presiones superficiales muy pequeñas. Lo que se sabe es que durante la transición de fase gas-líquido expandido (G-LE), la presión superficial no se mantiene constante similar a su análogo 3D, esto se debe a que estos sistemas son muy susceptibles a mínimas perturbaciones en los sistemas, por lo que cualquier factor externo modificará la medición realizada al sistema.

Posterior a la transición G-LE, se tienen dos variedades de estados condensados, líquido expandido (LE) y líquido condensado (LC). La región casi-horizontal de la

isoterma entre la fase LE y LC corresponde a una coexistencia de estas fases (LE+LC) indicando una transición de primer orden, este comportamiento no es perfectamente horizontal por lo que ocasionó una fuerte discusión sobre la existencia de la transición, atribuyéndose principalmente a impurezas del sistema [47]; no obstante, esta transición fue demostrada mediante observaciones ópticas típicas de las transiciones de fase [48].

Después de alcanzar una cierta presión superficial, todas las moléculas se ordenan de manera cristalina en arreglo hexagonal o cuadrático, mientras que sus colas quedan perpendiculares a la superficie, este comportamiento se atribuye a una fase sólida.

A medida que el área por molécula disminuye, las moléculas ya no pueden compactarse más, por lo que comienzan a formar estructuras más complejas (como multicapas) o los lípidos comienzan a desplazarse al interior de la subfase. A este comportamiento se le denomina colapso de la monocapa.

2.5. Energía libre

Como se ha mencionado, una molécula presente en un sistema tiene asociada una energía por el hecho de estar interactuando con sus vecinas. De esta manera, cuando una molécula migra de un estado A a un estado B, este proceso tiene asociada una energía conocida como energía libre, ya sea de Gibbs o Helmholtz dependiendo de las constantes termodinámicas involucradas en el proceso del cambio de estados. Esta energía se representa como ΔE y se determina mediante el cálculo de:

$$\Delta E_{AB} = \int_{\lambda_A}^{\lambda_B} \left\langle \frac{\partial H(\lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda'} d\lambda' \quad (2.18)$$

donde H , el Hamiltoniano, es una función dependiente del parámetro de acoplamiento λ ; esta dependencia define un camino que conecta dos estados del sistema denotados por A y B. El desarrollo matemático se explica con detalle en el capítulo 3, esta sección se centra en el concepto de la energía libre relacionada al cambio que experimentan los sistemas entre el vacío y un solvente, que puede ilustrarse con el diagrama de la

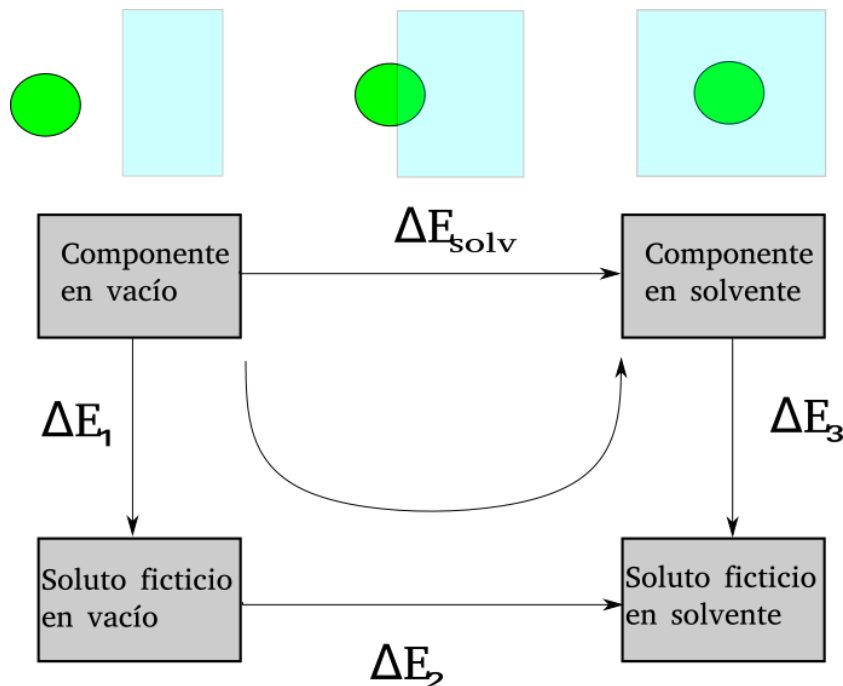


Figura 2.9: Diagrama de la determinación para la energía libre de solvatación. Este diagrama se realizó basándose en el esquema reportado en [49].

Fig. 2.9.

Citando al trabajo de Villa (2002) [50]: "La energía libre de solvatación, ΔE_{solv} , es el trabajo requerido para transferir una molécula de la fase gaseosa a la solución y se calculó de acuerdo con el ciclo termodinámico que se muestra en la Fig. 2.9; donde ΔE_1 es el trabajo requerido para eliminar todo el material interno no enlazado (interacciones del compuesto en vacío). Esto se logró mediante la mutación gradual de todos los átomos en un compuesto dado (estado A) en átomos "ficticios"(estado B). En este contexto, un átomo ficticio es un átomo para el cual la interacción no enlazada, es decir, los parámetros de Lennard-Jones y de interacción electrostática con todos los demás átomos, se han establecido en cero. Las interacciones de enlace dentro de la molécula y las masas de los átomos individuales se mantuvieron sin cambios. ΔE_2 es el trabajo requerido para transferir el soluto ficticio del vacío a la fase solvatada. Como la molécula no interactúa con el resto del sistema y el volumen disponible es el mismo, este término es efectivamente cero. ΔE_3 es el trabajo requerido para eliminar las interacciones soluto-disolvente y soluto-intramolecular. Esto se logró nuevamente

mediante la mutación gradual de todos los átomos en un compuesto dado (estado A) en átomos "ficticios"(estado B)".

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Métodos y procedimientos numéricos

3.1.1. Algoritmos para la Dinámica Molecular

Los algoritmos basados en dinámica molecular (DM) clásicos desprecian los efectos cuánticos en los sistemas y se derivan a partir de la solución para la segunda ley de Newton en el tiempo [51]:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i, \quad (3.1)$$

donde la etiqueta i indica cada partícula del sistema, m la masa y \mathbf{F} la fuerza neta en cada partícula, siendo esta última el cálculo de las interacciones inter o intramoleculares entre la partícula i y sus similares. Dado que $\mathbf{F} = -\nabla U$, las interacciones entre las partículas se realizan mediante los llamados potenciales de interacción molecular; las tablas 3.1 y 3.2 enlistan los potenciales ligados y no ligados, respectivamente, utilizados a lo largo de este trabajo [52].

El cálculo de los potenciales es la parte más costosa computacionalmente hablando, ya que si el sistema tiene N partículas y cada una de ellas interactúa con las demás, el tiempo de cómputo crece en relación al número de moléculas en el sistema como N^2 . No obstante, la mayoría de los potenciales son conocidos por ser de corto alcance, esto quiere decir que las contribuciones a la fuerza neta para una molécula por moléculas situadas después de una cierta distancia máxima (conocida como radio de corte, r_{cut})

Nombre	Potencial
Lennard-Jones (LJ)	$V(r_{ij})_{LJ} = 4\epsilon_{ij} \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6}$
Coulomb	$V(r_{ij})_c = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}}$

Tabla 3.1: Potenciales entre partículas no ligadas; donde r_{ij} representa la separación entre las partículas, ϵ_{ij} la profundidad del potencial LJ, σ_{ij} la distancia entre los centros de las partículas i y j cuando están en contacto, $f = \frac{1}{4\pi\epsilon_0}$ y ϵ_r la permitividad relativa.

Nombre	Potencial
Potencial Armónico	$V(r_{ij})_b = \frac{1}{2}k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2$
Potencial Armónico Angular	$V(\theta_{ijk})_a = \frac{1}{2}k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2$
Potencial Armónico Dihedro	$V(\xi_{ijkl})_{id} = \frac{1}{2}k_{ijkl}^\xi (\xi_{ijkl} - \xi_{ijkl}^0)^2$

Tabla 3.2: Potenciales entre partículas ligadas; donde r_{ij} representa la separación entre las partículas, k_* la rigidez del potencial, b_{ij} la distancia de equilibrio entre dos partículas, θ_{ijk}^0 el ángulo de equilibrio entre tres partículas y ξ_{ijkl}^0 el ángulo dihedro de equilibrio entre cuatro partículas.

puede ser despreciable. Por ello, un método para reducir los tiempos de cómputo en orden de N^2 a $N \log(N)$ es conocido como el método de celdas ligadas [53]; el cual consiste en descomponer el dominio en regiones proporcionales al radio de corte, conocidas como celdas, y realizar el cómputo de los potenciales para una molécula sólo sobre sus similares que se encuentren en la misma celda y sus ocho celdas vecinas, tal como se ilustra en la Fig. 3.1. Por último en la construcción de los métodos de búsqueda cabe mencionar que la manera clásica de minimizar los efectos de tamaño finito es por medio de la implementación de condiciones periódicas a la frontera.

Un aspecto a resaltar en la dinámica molecular clásica es que existen configuraciones distintas en las cuales se pueden desarrollar la evolución de los sistemas, estas configuraciones se caracterizan por mantener diferentes propiedades del sistema invariantes en el ensamble, ellas son NVE (número de partículas, volumen y energía constantes), $N\gamma T$ (número de partículas, tensión superficial y temperatura constantes), NPT (Número de partículas, presión y temperatura constantes) y NVT (número de partículas, volumen y temperatura constantes). En las secciones posteriores se mostrarán los resultados de una membrana de DPPC bajo condiciones de NPT, $N\gamma T$ y NVT, argumentando al final porque se decidió por implementar condiciones NVT para todos los sistemas.

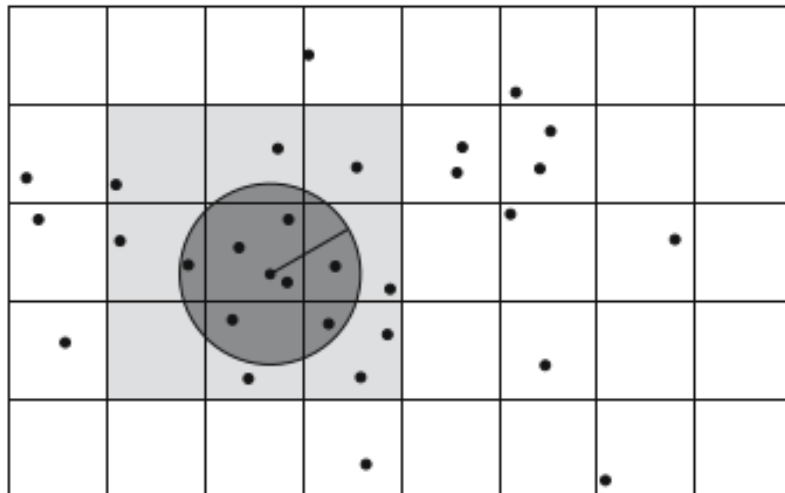


Figura 3.1: Ilustración de la descomposición del dominio en celdas como parte del método de celda ligada, remarcando el radio de corte para una molécula y las celdas en las cuales se realizará la búsqueda de las moléculas más cercanas. Imagen obtenida del libro citado en [51].

Para resolver la segunda ley de Newton (Ec.3.1) numéricamente en el tiempo se utilizan algoritmos integradores, los más usados en la dinámica molecular son el algoritmo *leap-frog* [54] y el algoritmo velocidades de Verlet [55]. En este trabajo se utilizó el integrador de *leap-frog* que consiste en iterar las posiciones y velocidades de cada molécula mediante las ecuaciones:

$$\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\Delta t) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}\mathbf{F} \quad (3.2)$$

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \Delta t \quad (3.3)$$

donde Δt es el tamaño de intervalo de tiempo, la deducción de estas ecuaciones a partir de la Ec.3.1 se encuentran en el apéndice A. El algoritmo *leap-frog* es un integrador de tercer orden en \mathbf{r} y es reversible en el tiempo, cuya principal ventaja sobre el algoritmo de Verlet (para sistemas que no tienen necesidad de una precisión muy alta para el ensamble de su temperatura o presión) es su mejor relación tiempo de cómputo *vs.* precisión.

En una simulación de dinámica molecular, la integración de las ecuaciones de mo-

vimiento de Newton proporciona los medios para muestrear las características físicas de un sistema dado, a través de su evolución en el conjunto microcanónico (NVE) [56]. Sin embargo, para muestrear otros conjuntos, se deben agregar variables adicionales, conocidas como grados de libertad extendidos (por ejemplo, algunos algoritmos como es el caso del método *linear constraint solver* conocido como LINCS [57] es utilizado para mantener los átomos de hidrógeno ligados a una molécula). Como se mencionó previamente, existen diferentes configuraciones en las cuales se desenvuelve la DM, manteniendo fijos parámetros como temperatura, presión y γ . Si se desea mantener la temperatura constante a lo largo de la evolución temporal del sistema se utilizan algoritmos conocidos como termostatos [58]; los más utilizados son los algoritmos de Berendsen [59], escalamiento de velocidades [60], Nosé-Hoover [61] y Parellinho-Raman [62], entre otros. Considerando el principio de equipartición de energía y la relación entre energía cinética y temperatura tenemos que:

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \quad (3.4)$$

$$\frac{1}{2} N_{df} k_B T = E_{kin} \quad (3.5)$$

donde E_{kin} es la energía cinética para el sistema a un tiempo dado, k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura del sistema y N_{df} son los grados de libertad, obtenidos de la relación $N_{df} = 3N - N_c - 3$, para N moléculas del sistema con N_c restricciones. De aquí que los termostatos básicamente regulan la temperatura del sistema aumentando o disminuyendo la velocidad de las moléculas.

De manera equivalente, el tensor de presión se deriva de la diferencia de la representación tensorial de la energía cinética del sistema $\mathbf{E}_{kin} = \frac{1}{2} \sum m_i \mathbf{v}_i \otimes \mathbf{v}_i$ y el tensor virial Ξ [60]:

$$\mathbf{P} = \frac{2}{V} (\mathbf{E}_{kin} - \Xi) \quad (3.6)$$

$$\Xi = -\frac{1}{2} \sum_{i < j} \mathbf{r}_{ij} \otimes F_{ij} \quad (3.7)$$

Cuando el sistema presenta más de una fase, separadas por superficies paralelas al

plano xy , un método para evolucionar el sistema es por medio de la tensión superficial, γ . Para calcular γ se utiliza la teoría de Kirkwood-Woof [63]:

$$\gamma(t) = \frac{L_z}{N} \left[P_{zz}(t) - \frac{P_{xx}(t) + P_{yy}(t)}{2} \right] \quad (3.8)$$

donde L_z es la longitud de la caja de simulación en la componente z , N el número de partículas en el sistema y P_{ii} son las componentes de la diagonal del tensor de presión. Podemos observar que para mantener la presión o γ constantes, se regulan tanto la velocidad de las partículas como el tamaño de la caja de simulación, esto se logra mediante algoritmos conocidos como acoplamientos de presión; los más usados son Berendsen [59], Parrinello-Rahman [62] y acoplamiento tensión superficial [60]. Por otro lado, para sistemas NVT, se prohíbe el cambio de las dimensiones de la caja permitiendo fluctuaciones en P y γ , es decir que los acoplamientos de presión son desactivados. Es por ello que a pesar de requerir menos algoritmos restringiendo el comportamiento de las partículas, se necesita un mayor tiempo de cómputo para que el sistema alcance el equilibrio.

Existen diferentes programas que resuelven las ecuaciones de movimiento 3.2 y 3.3 bajo los diferentes acoplamientos, en este trabajo se utilizó el software GROMACS [60, 49] que es una plataforma altamente paralelizada permitiendo realizar simulaciones en un menor tiempo. En la siguiente sección se hablará de los algoritmos y funciones utilizadas para el análisis de las propiedades físicas de los sistemas.

3.1.2. Métodos para el Análisis de Resultados de DM

Función de distribución radial

La función de distribución radial [64] (por sus siglas en inglés RDF) o función de correlación a pares ($g_{AB}(r)$), proporciona información relacionada con la distribución de un grupo de partículas (A) en relación a otro grupo de partículas (B), cuando la relación se realiza con el mismo grupo de partículas (AA) o (BB) se le llama función

de autocorrelación. La forma de calcular la RDF es por medio de la ecuación:

$$g_{AB}(r) = \frac{\rho(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)}{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)} \quad (3.9)$$

donde $\rho(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$ representa la densidad de dos átomos localizadas a \mathbf{r}_1 y \mathbf{r}_2 respecto al origen. La manera en la cual se calcula la RDF en algoritmos discretos en el tiempo es mediante la relación:

$$g_{AB}(r) = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad (3.10)$$

donde $\langle \rho_B \rangle_{local}$ es la densidad local del grupo de partículas B promediada alrededor de partículas del grupo A con un radio máximo r_{max} , N_X el número total de partículas del grupo X , r_{ij} es la distancia entre dos partículas i y j . Para encontrar la RDF se considera un promedio temporal sobre el último nanosegundo de simulación; mientras que para realizar el histograma por medio de la función δ , se divide el sistema en rebanadas de esferas de ancho $r + dr$ tal como se muestra en la Fig. 3.2.

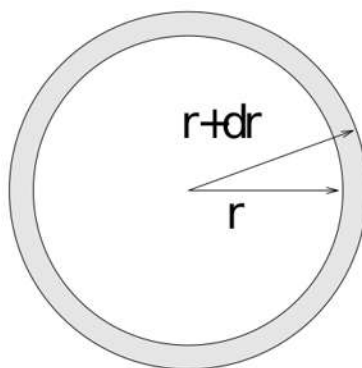


Figura 3.2: Esquema de la división del dominio de la simulación por medio de esferas de ancho $r + dr$ para el cálculo de la RDF.

Densidad de moléculas

La densidad es una de las propiedades que suelen monitorearse para ver la consistencia entre la configuración morfológica de las simulaciones y el valor conocido

para la densidad de las moléculas en estudio, usualmente se observa el valor promedio del agua dado que es la molécula predominante en los sistemas clásicos de DM [36]. Para calcular la densidad se realiza un histograma sobre el número de partículas que conforman una molécula a lo largo de un eje¹. Finalmente se divide el histograma entre el volumen relativo al ancho de la sección de búsqueda (dr en la Fig. 3.2) para la elaboración del histograma y el área de la caja de simulación. Al igual que la RDF, el conteo de partículas para el histograma se describe por una delta de Dirac, tal como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\rho_G(z) = \frac{1}{A_{box}h_{slice}} \sum_{i \in G}^{N_G} \delta(z_i - z) \quad (3.11)$$

donde $\rho_G(z)$ es la densidad del grupo de moléculas G respecto a la coordenada z de la caja de simulación con una área de A_{box} ; mientras que h_{slice} es el ancho de clase (o bin) para el histograma.

Parámetro de Orden

En el estudio de membranas toma importancia la orientación que tienen las colas de los lípidos respecto del vector normal al plano donde yace la membrana, puesto que es uno de los primeros indicadores del estado de fase en el cual se encuentra la membrana, *i.e.* gaseoso, líquido, líquido-condensado, etc. Para ello se utiliza el parámetro de orden S_{cd} [65, 66] definido como:

$$S_{cd} = \frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta \rangle - \frac{1}{2} \quad (3.12)$$

donde θ es el ángulo formado por la orientación relativa entre dos átomos de carbono consecutivos de las colas respecto a la normal al plano donde se encuentra la membrana. Los valores que puede tomar S_{cd} están en un intervalo entre 1 (orientación paralela entre los carbonos y la normal) y $-1/2$ (orientación antiparalela entre los carbonos y la normal), mientras que un valor para S_{cd} de 0 representa una orientación aleatoria.

¹Usualmente se selecciona el eje z por la anisotropía de los sistemas que involucran membranas.

3.1.3. Cálculo de Energía Libre

El cálculo de la energía libre [39] es utilizado para determinar los cambios que sufren los sistemas, cuánto trabajo pueden producir, así como las condiciones de configuraciones energéticamente favorables a lo largo de una coordenada de reacción. Se expresa mediante dos maneras diferentes: energía libre de Helmholtz (F) y energía libre de Gibbs (G). La energía libre es una propiedad extensiva, lo que significa que su magnitud depende de la cantidad de una sustancia en un estado termodinámico dado. Los cambios en la energía libre, ΔF o ΔG , son útiles para determinar la dirección del cambio espontáneo y evaluar el trabajo máximo que se puede obtener de los procesos termodinámicos que involucran reacciones químicas o de otro tipo. El método para calcular el cambio de la energía libre en DM es mediante simulaciones durante las cuales el Hamiltoniano del sistema varía lentamente entre un estado A y un estado B. Para ello se requiere modificar el Hamiltoniano en función de un parámetro λ , el cual varía entre 0 (estado A) y 1 (estado B).

$$H(p, q, 0) = H^A(p, q); H(p, q, 1) = H^B(p, q). \quad (3.13)$$

La energía libre de Helmholtz (F) está relacionada a la función de partición Q^F del sistema canónico (NVT), mientras que la energía libre de Gibbs (G) a la función de partición Q^G del ensamble NPT, para presión y temperatura constantes:

$$\begin{aligned} F(\lambda) &= -K_B T \ln Q^F \\ Q^F &= c \int \int \exp[-\beta H(p, q, \lambda)] dpdq \\ G(\lambda) &= -K_B T \ln Q^G \\ Q^G &= c \int \int \int \exp[-\beta H(p, q, \lambda) - \beta pV] dpdq dV \\ G &= F + pV, \end{aligned} \quad (3.14)$$

donde $\beta = 1/k_B T$ y $c = (N!h^{3N})^{-1}$. Las integrales no pueden ser obtenidas directamente de las simulaciones, sin embargo se puede obtener la derivada respecto a λ

como el promedio en el ensamble:

$$F = -K_B T \ln \left(c \int \int \exp[-\beta H(p, q, \lambda)] dp dq \right) \quad (3.15)$$

$$\frac{dF}{d\lambda} = -K_B T \frac{\int \int (-\beta) (\partial H / \partial \lambda) \exp[-\beta H(p, q, \lambda)] dp dq}{\int \int \exp[-\beta H(p, q, \lambda)] dp dq}$$

$$\frac{dF}{d\lambda} = \frac{\int \int (\partial H / \partial \lambda) \exp[-\beta H(p, q, \lambda)] dp dq}{\int \int \exp[-\beta H(p, q, \lambda)] dp dq} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{NVT, \lambda}, \quad (3.16)$$

de la misma manera se puede obtener la relación para G . Finalmente se llega a la diferencia energética entre dos estados (A y B) como:

$$F^B(V, T) - F^A(V, T) = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{NVT, \lambda} d\lambda, \quad (3.17)$$

$$G^B(p, T) - G^A(p, T) = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{NpT, \lambda} d\lambda. \quad (3.18)$$

Dentro del estudio de la DM, el cálculo de la energía libre es complejo [60, 67, 68, 69] dado que se requiere un tiempo de cómputo significativo para garantizar que la variación de los sistemas del estado A al estado B es suficientemente lenta para conservar el equilibrio. Para ello, existen diferentes métodos que han probado ser eficientes para el cálculo de energía libre, ellos son: Integrador termodinámico, perturbación de energía libre, potencial de fuerza media (PMF por sus siglas en inglés) [70] y el muestreo de sombrilla (US por sus siglas en inglés) [67]. En este trabajo se utilizó una combinación del PMF y US para hacer el análisis de la energía libre mediante el método WHAM, que se explicará a continuación.

Potencial de Fuerza Media

De acuerdo con las ecuaciones 3.17 y 3.18, se observa que la diferencia energética entre dos estados A y B está relacionada con la integral respecto a λ . El potencial de fuerza media (PMF) dice que la fuerza que se opone al proceso de transición entre los estados A y B, esta se relaciona con la variación energética mediante la siguiente

ecuación [70]:

$$\frac{\partial}{\partial \xi} \Delta A_{A \rightarrow B} = - \langle F_{\xi} \rangle_{\xi} \quad (3.19)$$

donde a ξ se le conoce como coordenada del parámetro de reacción y F_{ξ} es conocida como la fuerza de restricción, requerida para mantener al sistema en la coordenada ξ . En DM se propone una fuerza de empuje o arrastre contraria a F_{ξ} con un carácter armónico. GROMACS permite la incorporación de esta fuerza mediante el comando *pull force* en el archivo de parámetros (véase el capítulo 3.1.4), donde es necesario definir dos grupos: selectivo y referencia; el centro de masas (COM) del grupo de selección será empujado respecto al COM del grupo de referencia. En esta metodología también es necesario definir una constante de restricción para completar el potencial armónico:

$$U(\xi) = \frac{k}{2} (\xi - \xi_0)^2. \quad (3.20)$$

Del proceso de *empuje*, se obtiene un conjunto de trayectorias que describe el sistema entre los estados A y B, así mismo se obtiene una descripción de F_{ξ} , que puede ser asociada al cambio de energía libre por la Ec. 3.19. Sin embargo, este método es susceptible a diferentes factores como las condiciones iniciales, añadiendo que carece de suficiente estadística para una interpretación correcta de la variación de la energía libre. Un método que complementa la información obtenida del PMF es conocido como muestreo de sombrilla el cual se introduce en la siguiente sección.

Muestreo de Sombrilla

El método del muestreo de sombrilla (US, por sus siglas en inglés Umbrella Sampling) propone obtener del proceso de empuje diferentes configuraciones independientes espaciadas a lo largo de la coordenada ξ , conocidas como ventanas, para el cálculo de la energía potencial en cada configuración mediante un potencial conocido como potencial de sombrilla, que se añadirá al Hamiltoniano del sistema [67, 68, 69]:

$$U_i(\xi) = \frac{k_i}{2} (\xi - \xi_{0,i})^2, \quad (3.21)$$

donde k_i es la constante de restricción elegida en función de la energía potencial del sistema en cada ventana i a lo largo la coordenada ξ ; y $\xi_{0,i}$ es la posición de equilibrio del sistema. Generalmente se determina *a priori* el ancho y centro de cada ventana, usualmente tomando como centro el COM del sistema de referencia. Una vez determinados todas las ventanas que se utilizaran para el US, se realiza un simulación en DM para el cálculo de la energía potencial del sistema para cada ventana. Del resultado de esta simulación se obtendrá la estadística necesaria para calcular la variación del PMF a lo largo de la coordenada ξ , el método más utilizado para unir los datos estadísticos de las simulaciones es el método conocido como WHAM [71].

WHAM

Cuando se han terminado todas las simulaciones involucradas en el método US, con un potencial de sombrilla k_i , para cada N ventanas se guarda un histograma $h(\xi)$ a lo largo de la coordenada de reacción sesgado por el potencial paraguas $U_i(\xi)$. La forma habitual de combinar toda la estadística de cada ventana independiente es mediante el método WHAM (Weighted Histogram Analysis Method). Las ecuaciones del método WHAM son [71]:

$$P(\xi) = \frac{\sum_{l=1}^N h_l(\xi)}{\sum_{k=1}^N n_k \exp[-\beta(U_k(\xi) - f_k)]} \quad (3.22)$$

$$\exp(-\beta f_k) = \int d\xi P(\xi) \exp[-\beta U_k(\xi)] \quad (3.23)$$

donde β es el inverso de $k_B T$, N es el número de ventanas, l y k son los índices de las ventanas, n_j es el número de datos en el histograma h_j . El método WHAM contiene dos cantidades desconocidas que son la constante de energía libre f_k y la distribución de probabilidad insesgada $P(\xi)$ que está relacionada con el PMF como:

$$W(\xi) = -\beta^{-1} \ln [P(\xi)/P(\xi_0)]. \quad (3.24)$$

Las ecuaciones 3.22 y 3.23 están acopladas y se resuelven iterativamente. El histograma que se obtiene para el método WHAM es el PMF a lo largo de la coordenada ξ , este método también se encuentra incorporado en el software de GROMACS (`g_wham`). En la siguiente sección 3.1.4 se resumirán los archivos y procedimientos necesarios para ejecutar una simulación DM y US en GROMACS.

3.1.4. Procedimientos y parámetros

Archivos necesarios

Tal como se muestra en las tablas 3.1 y 3.2, existen diferentes interacciones entre dos o más partículas; a su vez, estas interacciones se rigen por las constantes de interacción. El valor de las constantes de interacción es aún una línea de investigación en progreso, ya que frecuentemente se actualizan los parámetros para que los sistemas reproduzcan de mejor manera diferentes propiedades físicas experimentales de los sistemas; tal como son tensión superficial, dipolos eléctricos, entre otros. Las constantes de interacción se guardan en archivos llamados campos de fuerzas (FF, por sus siglas en inglés). Existen diferentes FF; tal como AMBER [72], GROMOS [73], OPLS-AA/L [74] y CHARMM [52]. A lo largo de este trabajo se utilizó la última actualización de CHARMM conocido como CHARMM36 para parametrizar todas las moléculas de los sistemas y para parametrizar las moléculas de agua utilizamos el modelo TIP3P [75] dado que CHARMM36 está optimizado para trabajar con este modelo del agua. La parametrización de las moléculas de drogas se implementaron a partir de los identificadores asociados a cada droga en la base de datos para proteínas (PDB) [76].

En la estructura interna de GROMACS, los campos de fuerzas se contienen dentro de archivos conocidos como topologías (`.itp`). Dichos archivos contienen toda la información de los sistemas que se estudiarán, así como los parámetros que se involucran en la dinámica, en los cuales se indican la composición atómica de las moléculas; los enlaces ligados, exclusiones, ángulos ligados y dihedros entre átomos de la misma molécula; así como la cantidad de cada molécula de distintas especies que conformarán

al sistema. Dicho de otra manera, las topologías engloban la información para cada molécula distinta que conforman los sistemas así como la cantidad de cada una de ellas presente en los sistemas.

Por último, tenemos al archivo de la configuración inicial (.gro) y el archivo de parámetros de dinámica molecular (.mdp). El archivo de la configuración inicial indica las posiciones y velocidades de cada átomo en el sistema. Para encontrar la configuración inicial de una manera óptima se utilizó el constructor CHARMM-GUI [77], el cual a su vez utiliza el método de Monte Carlo para determinar la configuración energética óptima del sistema. Mientras que en el formato de ejecución se incluyen todos los parámetros necesarios para la DM: tamaño de paso de tiempo; número de pasos; temperatura y presión de referencia del sistema; y los algoritmos para los acoplamientos de presión y temperatura (si los hay). En la siguiente sección hablaremos de los procedimientos necesarios para garantizar una correcta DM y US.

Procedimientos

Dinámica Molecular

El primer paso para garantizar una MD exitosa consiste en la minimización de la energía del sistema, en la cual se implementa un algoritmo de descenso de gradiente modificando las posiciones de las partículas hasta alcanzar un mínimo de energía de referencia [60]. El método de minimización de energía por descenso de gradiente consiste en la actualización de la posición de las moléculas del sistema por la ecuación:

$$\mathbf{r}_{n+1} = \mathbf{r}_n + \frac{\mathbf{F}_n}{\max|\mathbf{F}_n|} h_n, \quad (3.25)$$

donde \mathbf{r} es el vector posición de una molécula para una iteración n , \mathbf{F} es el vector fuerza actuando sobre la molécula debida al negativo del gradiente de potencial V y h_n es el máximo desplazamiento. La notación $\max(\mathbf{F}_n)$ significa que es la magnitud máxima de una fuerza sobre cualquier molécula del sistema y se actualizan las fuerzas y energías por las nuevas posiciones. De esta manera, la condición para el valor de h_n es determinada por:

- Si $V_{n+1} < V_n$ las nuevas posiciones son aceptadas y $h_{n+1} = 1.2h_n$
- Si $V_{n+1} > V_n$ las nuevas posiciones son rechazadas y $h_{n+1} = 0.2h_n$,

el algoritmo termina cuando se alcanza un número máximo de iteraciones permitidas o la magnitud máxima de una fuerza sobre cualquier molécula es menor que una fuerza de tolerancia, ambos parámetros deben ser especificados en el archivo de parámetros (.mdp). Citando el manual de GROMACS [60] "*Knowledge of all local minima, including the global one, and of all saddle points would enable us to describe the relevant structures and conformations and their free energies, as well as the dynamics of structural transitions. Unfortunately, the dimensionality of the configurational space and the number of local minima is so high that it is impossible to sample the space at a sufficient number of points to obtain a complete survey. In particular, no minimization method exists that guarantees the determination of the global minimum in any practical amount of time. Impractical methods exist, some much faster than others. However, given a starting configuration, it is possible to find the nearest local minimum. "Nearest" in this context does not always imply "nearest" in a geometrical sense (i.e., the least sum of square coordinate differences), but means the minimum that can be reached by systematically moving down the steepest local gradient. Finding this nearest local minimum is all that GROMACS can do for you, sorry!*"

Las condiciones para realizar la minimización de energía son basadas en las recomendaciones de GROMACS [60]: tolerancia de fuerza 1000 kJ/mol/nm, tamaño de paso de energía 0.01 kJ/mol, número máximo de pasos 50000, el método de búsqueda fue el algoritmo de mallas descrito en el capítulo 3. El método de Ewald para mallas (PME, [78]) se utilizó para calcular las contribuciones de largo alcance (únicamente debido al potencial de Coulomb) al potencial de interacción. Se consideraron nuevamente los parámetros recomendados por GROMACS para monocapas, que consisten en una distancia de corte (r_{cut}) de 1.2 nm, con un orden 4 que equivale a una interpolación cúbica y aplicando correcciones de dispersión de largo alcance para energía y presión ($DispCorr = EnerPres$ en el archivo de parámetros). El método PME consiste en cambiar la suma de las interacciones electrostáticas de corto y largo alcance

en el espacio real por su equivalente en el espacio de Fourier, la ventaja de este método es la rápida convergencia de la suma en el espacio de Fourier en comparación con su equivalente en el espacio real cuando las interacciones se realizan a larga distancia.

El segundo paso es desarrollado para equilibrar el sistema a las condiciones deseadas; ya sea temperatura, presión o γ constantes. Usualmente se imponen restricciones a las moléculas para conservar su estructura, especialmente en moléculas complejas, como son los lípidos y proteínas. Dentro del proceso de equilibrio se desarrolla primero una simulación bajo condiciones canónicas (NVT), fijando el volumen de la caja al desactivar los acoplamientos de presión e implementando un termostato a una temperatura de referencia. Si los sistemas se rigen bajo condiciones NVT, este será su único paso de equilibrio, mientras que si son sistemas NPT o $N\gamma T$ será necesario un segundo paso de equilibrio para que el sistema alcance los valores impuestos a la presión o tensión superficial, respectivamente.

Las condiciones para desarrollar el equilibrio bajo NVT son: integrador leap-frog, con un tamaño de paso de 2 fs; algoritmo LINCS para mantener la estructura atómica de las moléculas; para optimizar el cálculo de las interacciones de corto y largo alcance se utilizó el algoritmo PME con un radio de corte para el potencial de Coulomb y van der Waals de 1.2 nm; algoritmo de *v-rescale* como termostato fijando una temperatura de 298 K como referencia.

Para desarrollar el proceso de equilibrio en los sistemas bajo condiciones NPT y $N\gamma T$, se utilizan las mismas condiciones descritas para los sistemas NVT añadiendo algoritmos de control de presión, ya sea mediante las ecuaciones 3.6 y 3.7 para sistemas NPT o indirectamente por la Ec. 3.8 para sistemas $N\gamma T$. Estudios previos han demostrado que el algoritmo de Berendsen es el más eficiente para controlar la presión al involucrar restricciones a la dinámica molecular [59, 67].

Una vez realizados los procesos de minimización de energía y equilibrio se procede a implementar los algoritmos de dinámica molecular para la evolución temporal de los sistemas. En este paso, las restricciones sobre las moléculas son eliminadas para dejar a los sistemas evolucionar únicamente siendo afectados por los potenciales de interacción molecular, termostatos y barostatos. Las condiciones para llevar a cabo la

dinámica molecular, ya sin restricciones, se mantienen constantes; no obstante los algoritmos utilizados para regular la presión y temperatura se modifican; el termostato se cambia de v-reescale a Nosé-Hoover, por su parte el barostato cambia de Berendsen a Parrinello-Rahman. Lo anterior debido a razones tales como mayor exactitud, variaciones menos abruptas en las mediciones aunque se eleva el tiempo de cómputo requerido para realizar los cálculos [49, 79, 80].

Procedimiento para el muestreo de sombrilla

La metodología desarrollada para implementar el muestreo de sombrilla (por sus siglas en inglés, *umbrella sampling* US) es la descrita en el trabajo de Lemkul (2010) [67, 68]. La cual establece un proceso de empuje de un grupo A respecto a un grupo de referencia inmóvil B mediante una fuerza de empuje. De este proceso se escogen veinticinco ventanas las cuales serán evolucionadas mediante MD clásico en un ensamble canónico para calcular la energía potencial del grupo A respecto a su entorno de las diferentes ventanas. El análisis de la estadística obtenida de las veinticinco ventanas es procesada mediante el método WHAM que se utilizará para el cálculo del potencial de fuerza media de la droga a través de la membrana.

La configuración inicial de los sistemas utilizados para realizar el US, es la configuración final de la dinámica molecular de los sistemas de membranas en ausencia de las drogas, lo anterior para garantizar que el sistema se encuentre en equilibrio antes de realizar el US. La membrana se sitúa en el plano xy centrada en la caja de simulación a lo largo del eje z . Posteriormente, se coloca la droga aproximadamente a un nanómetro por encima de la interfase lípido-vacío para finalmente comenzar con el proceso de empuje.

Para realizar el proceso de empuje se implementa un sistema donde la molécula de droga será llevada a través de la membrana respecto a una partícula de prueba fija en una posición determinada, la inclusión de la partícula de prueba fue implementada en el trabajo de J.V. Ferreira [69]. En nuestro trabajo, la partícula de prueba se sitúa en el centro de masas (COM) de la droga para empujar la droga a través de la membrana, tal como se muestra en la Fig. 3.3, este proceso se realiza mediante una fuerza inversa

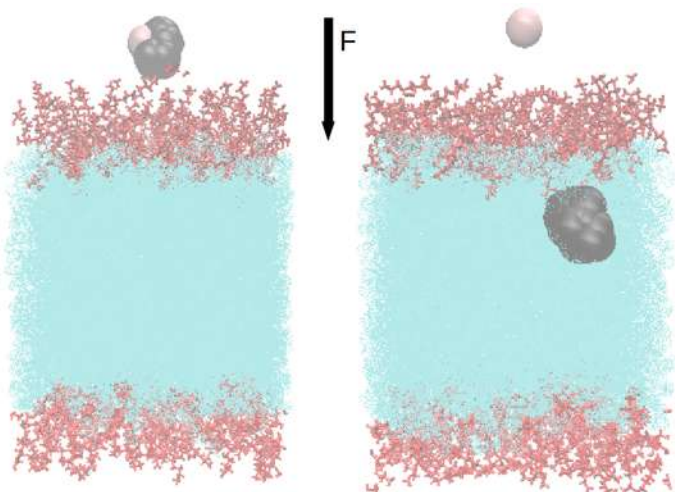


Figura 3.3: Esquema del empuje de una droga a través de una membrana por medio de una fuerza derivada del potencial armónico (Ec. 3.20) entre la droga y una partícula virtual (*dummy*), desde una configuración inicial (izquierda) hasta una final (derecha). Cada color en el esquema representa un tipo molécula: los lípidos son rojos, la droga es de color negro, el agua es azul y la partícula *dummy* es gris.

a la fuerza de restricción (Ec. 3.19) derivada del Hamiltoniano al agregar el potencial armónico (Ec. 3.20), donde la coordenada del parámetro de reacción (ξ) se escoge como el vector normal a la membrana (eje z).

Las condiciones del proceso de empuje implementados para este trabajo y que son añadidas al archivo de parámetros de DM son: tiempo de 500 ps, utilizando una constante de restricción para el potencial armónico de $1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ en la dirección z y una velocidad de empuje de $0.01 \text{ nm}\cdot\text{ps}^{-1}$. Una vez terminado el proceso de empuje, como se ha mencionado previamente, se escogieron veinticinco ventanas (o configuraciones iniciales), cuya diferencia entre cada ventana radica en la separación entre los centros de masa de la droga a lo largo de ξ ; la separación elegida en este trabajo es de 0.2 nm para cada ventana.

El último paso consiste en desarrollar una simulación de dinámica molecular durante 10 ns en un ensamble canónico, resultando en un total de 250 ns de simulación por sistema. Para ello, se elimina la fuerza de empuje y restricciones a las moléculas, utilizando las mismas condiciones que en la sección anterior para iterar en el tiempo los sistemas NVT. Finalmente, se utiliza el método WHAM disponible en GROMACS

mediante el comando *gwham* para unir toda la estadística recabada de las veinticinco simulaciones de las ventanas, calculado de esta manera el potencial de fuerza media.

En el siguiente capítulo se discutirá la selección del ensamble con el cual se realizó, basándose en el análisis de los resultados obtenidos de una membrana de DPPC bajo condiciones NVT, $N\gamma T$ y NPT, particularmente la reproducibilidad de la tensión superficial de los sistemas tomando como referencia los valores experimentales de trabajos previos.

3.2. Materiales y métodos experimentales

3.2.1. Materiales

En el desarrollo de este trabajo se utilizó el lípido 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DPPC, Peso molecular $Mw=734$ g/mol) obtenido de Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaste, AL, USA). Así como cloroformo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) el cual se utilizó como solvente para suspender los lípidos de DPPC. Los lípidos (liofilizados y en solución) se almacenaron a una temperatura igual o menor que -20° C y constan de una pureza del 99%. Así mismo, se realizaron experimentos con sevoflurano (SF, $Mw = 200.055$ g/mol) de la marca SVOFAST por parte de la farmacéutica Baxter, S.A. de C.V. (Guayama, Puerto Rico, USA), con una pureza del 99.5%. Por último, el agua ultrapura que se utilizó en este trabajo tiene una resistividad de 18.2 M Ω , que fue obtenida de por un proceso de purificación por ósmosis inversa usando los equipos RiOs 8 y Simplicity-UV Millipore.

3.2.2. Métodos

Formación de la Monocapa

La solución de los lípidos suspendidos en cloroformo se realiza en una concentración de 1 mg/mL; para ello, se utilizó una báscula (RadWag) para pesar 1mg de DPPC en un matraz aforado de 1 mL.

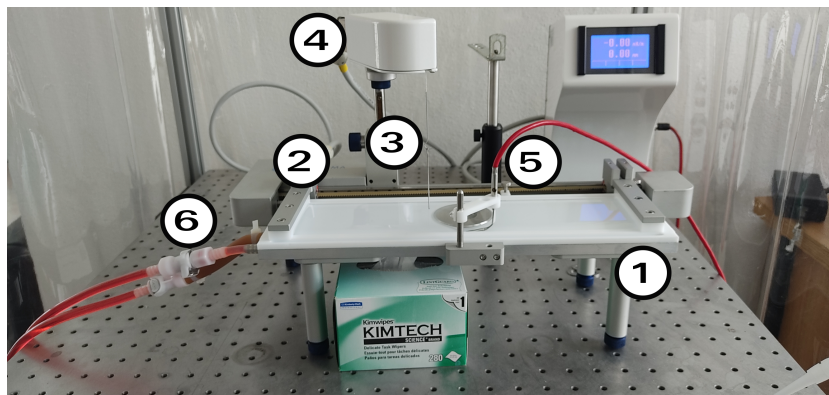


Figura 3.4: Montaje de la palangana de Langmuir, donde se numeran los componentes para realizar los experimentos: (1) recipiente de teflón, (2) barreras de teflón, (3) rodillo de Du Noüy–Padday, (4) tensiómetro, (5) termopar y (6) conexión del recirculador.

Por otro lado, para realizar el procedimiento de la formación de la monocapa es necesario equipo de laboratorio especializado listado a continuación:

- Palangana de Langmuir (KSV Nima);
- Microjeringa Hamilton de 10 μL ;
- Barreras de teflon;

El sistema se montó como se muestra en la Fig. 3.4, donde se puede apreciar la **palangana de Langmuir** utilizada en este trabajo, cuyo depósito está hecho a base de teflón. En la parte superior de la palangana se puede ver las **barreras de teflón** en contacto con la interfase para contener los lípidos en un área determinada y poder realizar variaciones en el área superficial a una velocidad ajustable. Las dimensiones de la palangana son:

- Área superficial de 273 cm^2 entre barreras.
- Volumen de la subfase de 109.2 mL.
- Dimensiones internas 364 mm \times 75 mm \times 4 mm.

La **microjeringa** (Fig. 3.5) es utilizada para depositar los lípidos en la superficie del agua, esparciendo los lípidos en toda la superficie, tal como se ilustra en la Fig. 3.5.

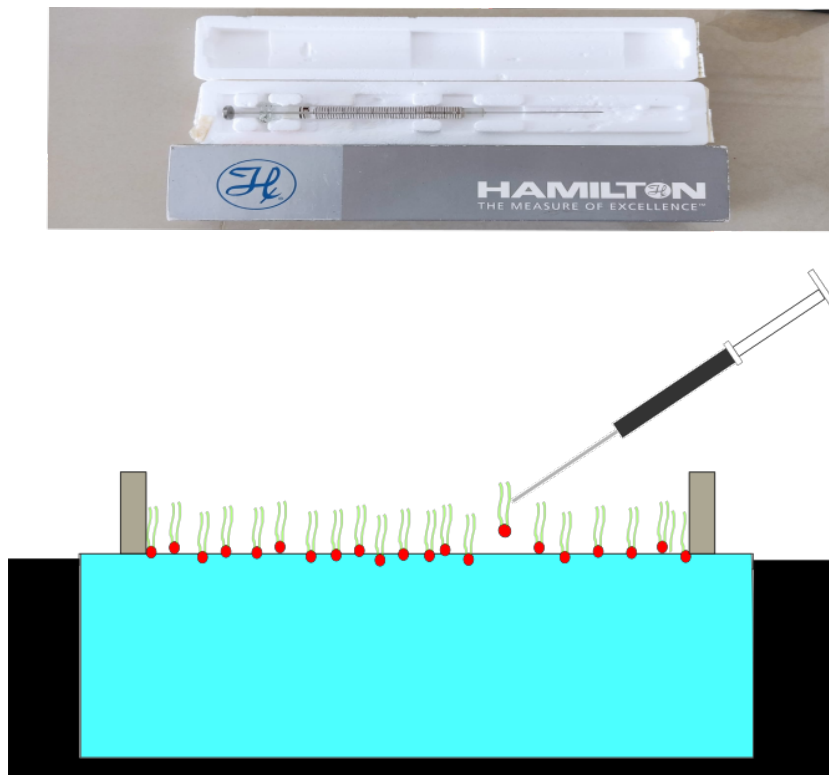


Figura 3.5: Arriba: Foto de una microjeringa de 5 μL de la marca Hamilton. Abajo: Representación esquemática de la deposición de los lípidos en la interfase aire-agua.

En este proceso se debe tener especial cuidado, dado que si al momento de depositar el contenido de la microjeringa en la superficie se generan gotas muy grandes o chorros de material, este contenido se va al fondo del contenedor, puesto que la densidad del cloroformo es mayor que la del agua.

Una vez depositados los lípidos en la interfase aire-agua, es necesario esperar un periodo de 20 minutos para permitir que todo el cloroformo se evapore de la superficie, dejando únicamente los lípidos en la interfase. Cuando el material se deposita en la superficie del agua, la dispersión del material continuará hasta que la presión superficial alcance un valor de equilibrio. Esta presión de distribución de equilibrio (Π_e) se define como la que se genera espontáneamente cuando el material se pone en contacto con una superficie de agua [81, 82]. Una forma de ver este fenómeno es mediante la comparación con un sistema de un sólido en presencia de su vapor; existe una presión de vapor de equilibrio para este sistema, si la presión se supera (el vapor

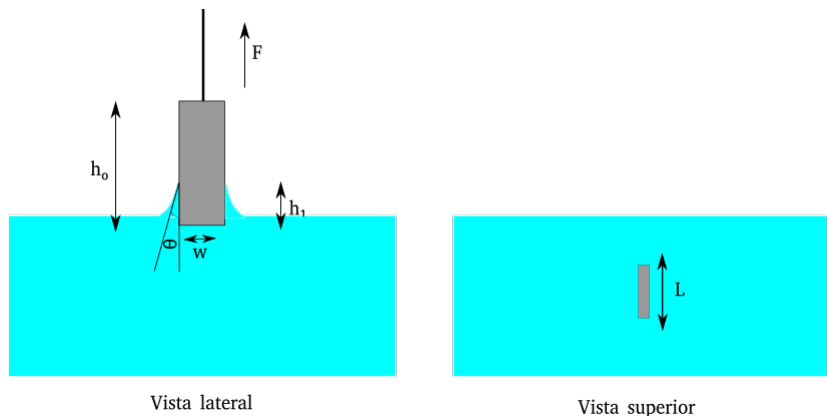


Figura 3.6: Diagrama esquemático del método de la placa de Wilhelmy.

se sobresatura) se producirá una deposición sobre la superficie sólida. Esto también ocurre para una monocapa que se espera que forme cristales si la presión superficial supera la presión de distribución de equilibrio. Dicho esto, una vez que la presión superficial (Π) es menor que Π_e se puede considerar que la monocapa es metaestable y se continua con el experimento.

Medición de la presión superficial

El Tensiómetro es el instrumento encargado de registrar la fuerza que experimenta un objeto suspendido en la interfase y así poder calcular la tensión superficial o la presión superficial por la ec. 2.6. Una primera aproximación para realizar esta medición es la metodología atribuida al científico alemán Ludwig Wilhelmy [83], descrita a continuación.

En la metodología desarrollada por Wilhelmy, se suspende del tensiómetro una placa delgada (con un espesor pequeño más no despreciable) que estará en contacto con una superficie líquida (agua). Al estar en contacto, se formará un menisco en torno a ella, tal como se ilustra en la Fig. 3.6; en el esquema se ilustra que h_0 es lo alto, w el ancho y L el largo de la placa de Wilhelmy, así como h_1 la altura del menisco sobre la placa, θ el ángulo de contacto. De esta manera, la relación entre la fuerza que siente el tensiómetro debido a la tensión superficial es mediante la ecuación [84]:

$$F_{\gamma,\text{gas/líquido}} = \gamma P \cos \theta, \quad (3.26)$$

donde P es el perímetro de la placa que está en contacto con la superficie y θ es conocido como el ángulo de contacto. El método de Wilhelmy sucede principalmente en equilibrio, por lo que sobre la placa existe un balance de fuerzas. El balance de las fuerzas involucradas se expresa a continuación:

$$F + F_{\text{flotabilidad}} - F_{\text{gravedad}} - F_{\gamma,\text{gas/líquido}} - F_{\gamma,\text{líquido/sólido}} = 0 \quad (3.27)$$

donde:

$$\begin{aligned} F_{\text{flotabilidad}} &= \rho g h_1 w L \\ F_{\text{gravedad}} &= \rho g h_0 w L \\ F_{\gamma,\text{gas/líquido}} &= 2(L + w)\gamma \cos \theta \\ F_{\gamma,\text{líquido/sólido}} &\approx 0 \end{aligned} \quad (3.28)$$

con w siendo el ancho de la placa, h_0 la altura de la placa, h_1 la parte de la placa que se encuentra sumergida, L el largo de la placa y ρ la densidad del material. Con estas condiciones, se eleva el rodillo justo antes de que el menisco se rompa; en ese momento la F alcanza niveles máximos y la $F_{\text{flotabilidad}} = 0$.

Usualmente se elige el platino como material para elaborar la placa que estará en contacto con las superficies o interfase debido a que es un material químicamente inerte y es fácil de limpiar. Otra razón muy importante es que puede humedecerse de manera óptima debido a que su valor de energía libre superficial es muy alta y por lo tanto generalmente forma un ángulo de contacto $\theta = 0$ con líquidos.

Con las consideraciones antes mencionadas, se llega a la siguiente ecuación para medir la tensión superficial a partir de la medición del tensiómetro y de las características de la placa de Wilhelmy:

$$\gamma = \frac{F - \rho g h_0 w L}{2(L + w)}. \quad (3.29)$$

Hay varias modificaciones del método de la placa de Wilhelmy, y la más común utiliza un rodillo de platino en lugar de una placa, este método es conocido como método de Du Noüy–Padday. Esto permite la medición en recipientes más pequeños y, por lo tanto, es adecuado para experimentos en los que solo se pueden proporcionar pequeñas cantidades de líquido. Esto se debe a que al utilizar las placas en recipientes pequeños, los bordes del recipiente pueden estar cerca del menisco, lo cual afectaría su equilibrio. La geometría juega un papel importante en la ec. 3.29, donde el perímetro y el largo de la placa es importante; para el caso del rodillo de Du Noüy–Padday se puede reescribir la ec. 3.29 como:

$$\gamma = \frac{F - gm}{2\pi r}, \quad (3.30)$$

donde m es la masa y r el radio del rodillo.

3.2.3. Obtención de las Isotermas

El equipo necesario para obtener las isotermas de los sistemas es el siguiente:

- Palangana de Langmuir;
- Barreras de teflón;
- Recirculador (ThermoFisher Scientific);
- Tensiómetro (KSV Nima);
- Rodillo de Du Noüy-Padday en platino (KSV Nima, perímetro de 3.318 mm)

En la Fig. 3.4 se observan los diferentes componentes utilizados para monitorear el sistema: el rodillo de platino colgado del tensiómetro para medir la presión superficial y el termopar utilizado para medir la temperatura del sistema. La temperatura es controlada mediante un recirculador conectado al extremo izquierdo de la palangana con una precisión de ± 1 °C.

Los sistemas estudiados con la palangana de Langmuir son susceptibles a los cambios de temperatura, a los movimientos bruscos y a las impurezas que se encuentren

en el medio. Por ello, la palangana se encuentra en una mesa antivibraciones cubierta con un plástico para evitar en medida de lo posible las partículas dispersas de polvo en el ambiente. En este mismo sentido, la limpieza de la palangana es un factor a tomar en cuenta, ya que la menor de las impurezas modifica el sistema, afectando los resultados en la medición en la presión superficial. Por lo mencionado anteriormente, se implementa una metodología de limpieza de la palangana descrita a continuación:

- Superficie de teflón de la palangana:
 - Lavar profundamente con etanol y Kimwipes (pañuelos desechables libres de pelusa) para remover residuos de experimentos previos u orgánicos
 - Enjuagar con agua ultrapura
 - Lavar con cloroformo para asegurar que las partículas adheridas en el teflón sean removidas debido a las propiedades de solvente que tiene el cloroformo
 - Enjuagar la palangana dos veces más con agua ultrapura
- El rodillo de platino se limpia primero con etanol y cloroformo para remover residuos. Por último se somete a la llama azul de un soplete de isobutano para terminar la esterilización de la superficie
- Las barreras y el termopar no pueden ser expuestos a cloroformo debido su diseño, así que solo son lavados meticulosamente con etanol y enjuagados con agua ultrapura

Para poder garantizar que la superficie de la palangana se encuentra limpia, se mide la tensión superficial únicamente con agua, cuyo resultado esperado es que la medición se mantenga invariable a un valor de referencia. Una vez terminado el proceso de limpieza de la palangana y montado el equipo como se muestra en la Fig. 3.4, se espera un lapso de tiempo de diez a quince minutos para permitir al recirculador llevar al sistema a una temperatura en promedio constante de 20°C. En ese momento, se coloca la referencia en la medición del tensiómetro a 0 mN/m y se realiza una compresión de las barreras a una velocidad constante de 5 mm/min. Los resultados se muestran en la Fig. 3.7.

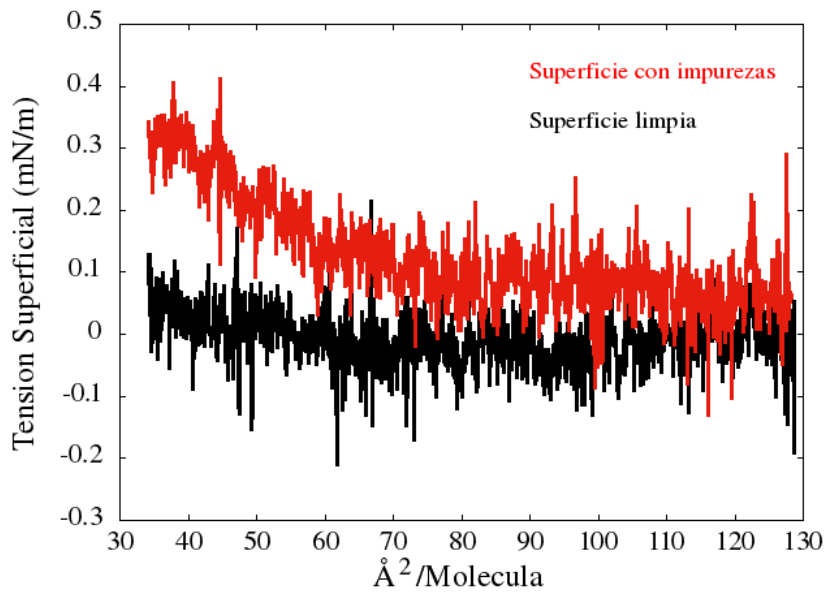


Figura 3.7: Medición de la presión superficial del agua con y sin impurezas en la palangana de Langmuir.

En la Fig. 3.7 se puede observar como la presión superficial medida del agua en una superficie limpia se mantiene oscilando en valores cercanos a 0 mN/m; por el contrario, en el caso para el cual la superficie de la palangana presenta impurezas la presión superficial tiende a aumentar a medida que el área entre las barreras disminuye. Así mismo, la Fig. 3.8 muestra los valores medidos por el termopar, donde se aprecia como la temperatura toma valores cercanos a 20 °C, siendo esta una prueba de la eficiencia del recirculador para mantener la temperatura en promedio constante.

3.2.4. Introducción de las drogas a los sistemas

En el capítulo 5, se hablará de la interacción de una membrana de DPPC con una droga con propiedades anestésicas llamada sevoflurano. Esta droga tiene la característica de ser muy volátil, por lo que se implementa una serie de experimentos para tratar de evitar que la droga se escape de la interfase al medio circundante. De la misma manera, se compararán los resultados reportados experimentalmente con los numéricos, por lo tanto se realizan disoluciones de sevoflurano en alcohol etílico al 99 % de pureza a fin controlar las relaciones para las concentraciones relativas en-

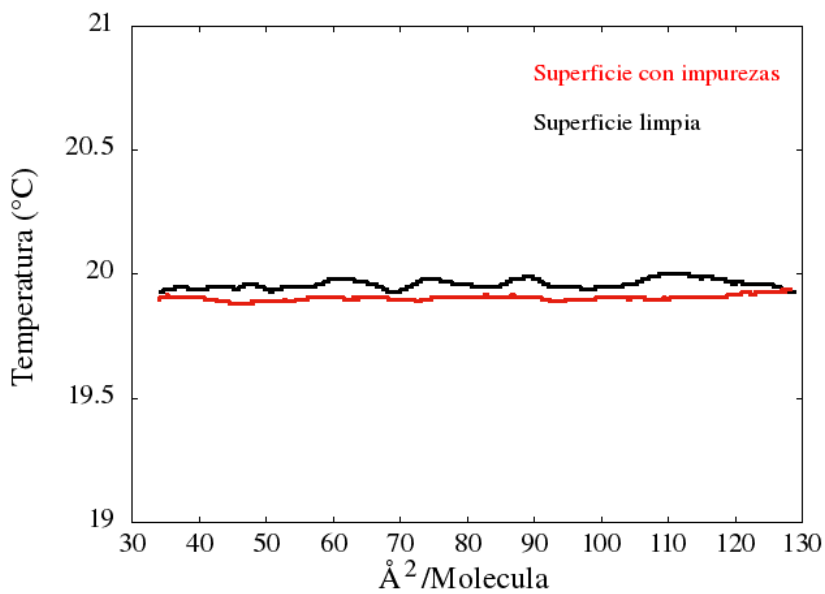


Figura 3.8: Medición de la temperatura por medio del termopar para los sistemas de agua ultrapura con y sin impurezas en la palangana de Langmuir.

tre el número de moléculas de DPPC y el número de moléculas total en la interfase (χ_{DPPC}).

Deposición en la subfase

La introducción de la droga en la subfase se desarrolló mediante un sistema montado como el diagrama mostrado en la Fig. 3.9.

La jeringa que se utilizó en fue una Microjeringa Hamilton de 10 μL para la introducción de las moléculas de droga al sistema. Previo a introducir las drogas, es necesario que el sistema esté en equilibrio; por lo tanto, la microjeringa debe estar posicionada en un lugar fijo antes de la formación de la membrana en la interfase agua-aire.

Una vez que el cloroformo se ha evaporado de la interfase, se introduce lentamente el contenido de la microjeringa a la subfase. Una vez vaciado el contenido de la microjeringa es necesario esperar un tiempo de treinta minutos para que el alcohol se absorba en la subfase, mientras que el sevoflurano se dirigirá a la interfase debido a sus propiedades hidrofóbicas. De esta manera, el tiempo para que el sistema alcance

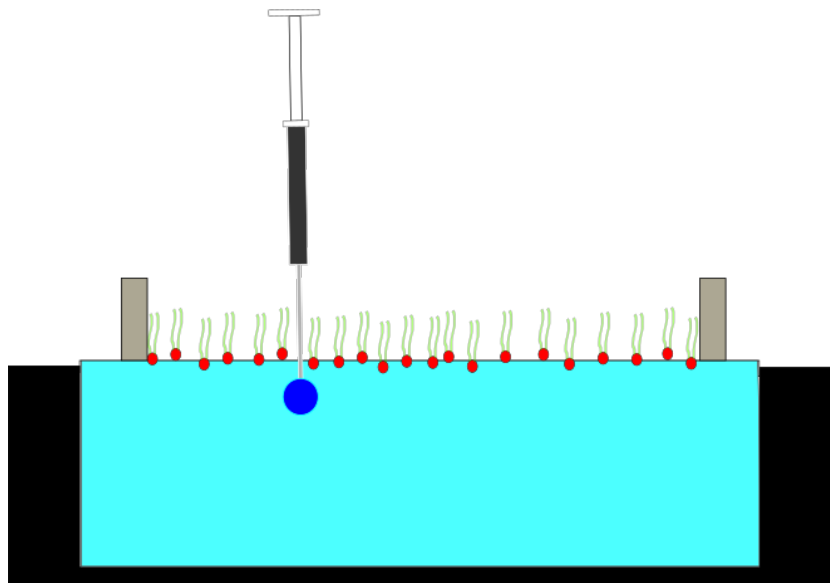


Figura 3.9: Esquema de la deposición del sevoflurano en la subfase.

el equilibrio entre la deposición de los lípidos en la interfase y la incorporación del sevoflurano es de aproximadamente sesenta minutos.

Capítulo 4

Dinámica Molecular de las Membrana con Agentes Externos

4.1. Comprobación de los métodos numéricos

En este capítulo se describe brevemente la forma de construir una monocapa de DPPC, así como los resultados de esta bajo diferentes ensambles termodinámicos, que sentarán las bases para discutir el ensamble que se elegirá para desarrollar los sistemas de membranas lipídicas con agentes químicos externos (drogas).

4.1.1. Configuraciones iniciales

Al trabajar con diferentes ensambles, las configuraciones pueden obtenerse de diferentes maneras, como ejemplo tenemos el método de Monte Carlo, auto-ensamble, o programas constructores que se encuentran en línea. En este trabajo, se decidió utilizar el ensamblador conocido como CHARMM-GUI [77] de los desarrolladores del campo de fuerzas CHARMM, que a su vez utilizan el método Monte Carlo para encontrar la configuración energética óptima. Este constructor utiliza el campo de fuerzas conocido como CHARMM36 [52] para parametrizar las moléculas que conforman los sistemas, así como el modelo de agua conocido como TIP3P [75].

Utilizando CHARMM-GUI, la forma de construir una monocapa es mediante la

implementación de una membrana bicapa; para ello se escoge el número de lípidos para cada monocapa de la membrana bicapa, en este trabajo se decide trabajar con una cantidad de 40 lípidos por monocapa debido a que trabajos anteriores han demostrado una buena consistencia entre resultados experimentales y numéricos para esta cantidad de lípidos, particularmente la tensión superficial. La bicapa se sitúa en el centro de una caja de simulación y se llena con agua hasta que el agua contenida en la caja de simulación alcance una densidad aproximada de 1000 kg/m^3 ; posteriormente, por condiciones periódicas a la frontera, el sistema se recorre hasta que las monocapas quedan en los extremos de la caja de simulación y en medio se encuentra el agua. Finalmente, se sitúan dos capas de vacío de 10 nm entre las monocapas para evitar que las monocapas interactúen entre sí. Una vez construida la membrana, la configuración inicial se deriva del método Monte Carlo mediante su configuración energética óptima.

Ya que se define la cantidad de lípidos por monocapa, se determina el área en la cual yacerán, conocida como *plateau*. Diferentes trabajos numéricos y experimentales han determinado la relación que existe para la tensión superficial y el área disponible por molécula (llamada en inglés como *mean molecular area, mma*). Tomando como referencia los datos experimentales, se construyeron tres sistemas iniciales a *mma* de 55, 63 y $90 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, los cuales serán sometidos a un proceso de minimización, equilibrio y dinámica molecular (MD) bajo los ensambles NVT, $N\gamma T$ y NPT; la Fig. 4.1 muestra las configuraciones iniciales de las membranas de DPPC a un área por molécula de 55 y $90 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$.

4.1.2. Minimización de energía y equilibrio

Como se mencionó en el capítulo 3.1.4, el primer paso para cualquier simulación consiste en la minimización de energía de los sistemas. Este procedimiento es implementado para todas los sistemas descritos en este trabajo y se obtienen resultados iguales para cada uno de ellos, esto se debe a que es el mismo tipo de moléculas involucradas en la dinámica y que viene de un procesamiento por Monte Carlo que ya tiene al sistema en una configuración muy cercana al equilibrio. La Fig. 4.2 muestra

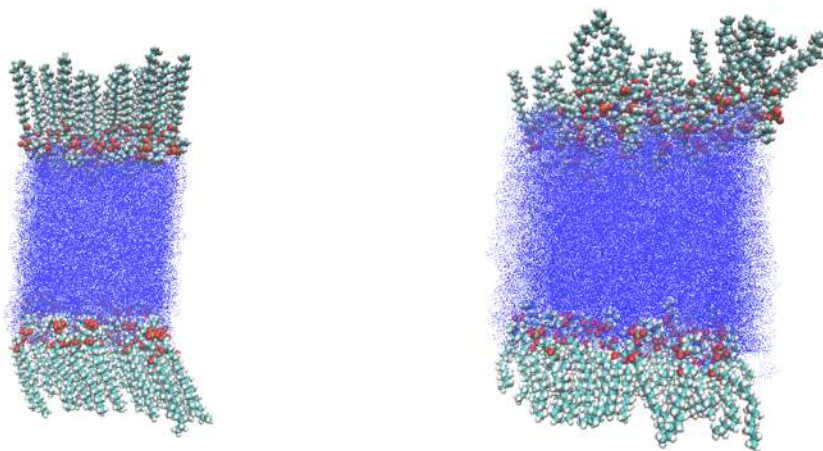


Figura 4.1: Configuración inicial de las membranas monocapas de DPPC a un área promedio por molécula de 55 (izquierda) y 90 (derecha) $\text{Å}^2/\text{molécula}$.

el descenso en la energía potencial del sistema de la membrana a $55 \text{ Å}^2/\text{molécula}$

Posterior a la minimización de energía se sigue con un proceso de equilibrio bajo condiciones NVT, para ello se inician las velocidades de las moléculas en relación a una distribución de Maxwell alrededor de 298 K por la ec. 3.5. Se dejaron equilibrar los sistemas un total de 20 ns para los sistemas que únicamente serán desarrollados bajo condiciones NVT; en el caso de los sistemas NPT o $N\gamma T$ se utilizaron 10 ns para el equilibrio NVT y 10 ns para equilibrar la presión o γ , según sea el caso. La Fig. 4.3 muestra la evolución de la temperatura al comienzo del equilibrio para los sistemas NVT, $N\gamma T$ y NPT. Después de 20 ps la temperatura en el ensamble alcanza la temperatura de referencia y se mantiene a lo largo de los procesos subsecuentes de equilibrio y MD.

Como se mencionó, para los casos de NPT y $N\gamma T$ es necesario equilibrar los sistemas en la presión y tensión superficial de referencia. El tensor de presiones para los sistemas de monocapas es inhomogéneo, en este trabajo las componentes importantes corresponden a la diagonal del tensor de presión, esto se debe a la forma de calcular la tensión superficial por la ec. 3.8. Sin embargo una buena referencia es que la com-

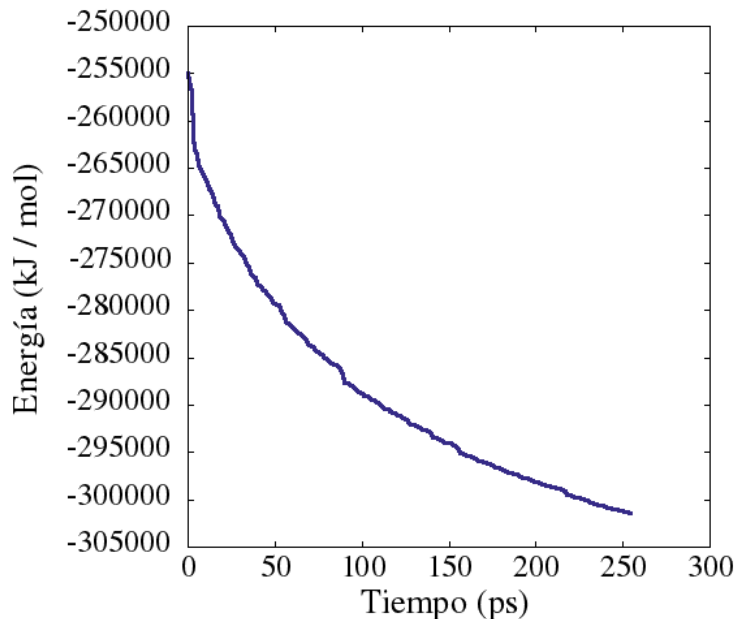


Figura 4.2: Minimización de la energía potencial de un sistema bajo un algoritmo de descenso de gradiente; este proceso se repite para todos los sistemas, obteniendo el mismo comportamiento debido a los tamaños pequeños de los sistemas.

ponente P_{zz} tiende a oscilar alrededor de cero en los sistemas donde no se impone una condición a la presión (NVT y $N\gamma T$) y para el caso NPT la componente P_{zz} se fija a 0; por lo tanto, se ilustran los resultados de la componente P_{zz} para observar el comportamiento de la presión debido a los tres diferentes ensambles. Después de 10 ns de equilibrio, los resultados de la presión en el último nanosegundo del proceso son mostrados en la Fig. 4.4, donde se observa que en promedio los barostatos mantienen la presión constante a cero, no obstante el ensamble NPT muestra una mayor variación entre las mediciones de la presión a lo largo de la evolución temporal.

La diferencia en el proceso de equilibrio para controlar la temperatura no fue significativa, es decir, los tres sistemas mostraron un buen comportamiento al mantener en promedio la temperatura del sistema alrededor de 298 K, tal como puede observarse en la Fig. 4.3, con desviaciones estándar (s) en el último ns del proceso de equilibrio de 2.02 K para NVT, 2.10 K para $N\gamma T$ y 1.85 K para NPT. Basándose en los resultados de la presión, se puede notar que en el sistema NPT la presión varía de manera significativa respecto sus análogos NVT y $N\gamma T$; para corroborar que este

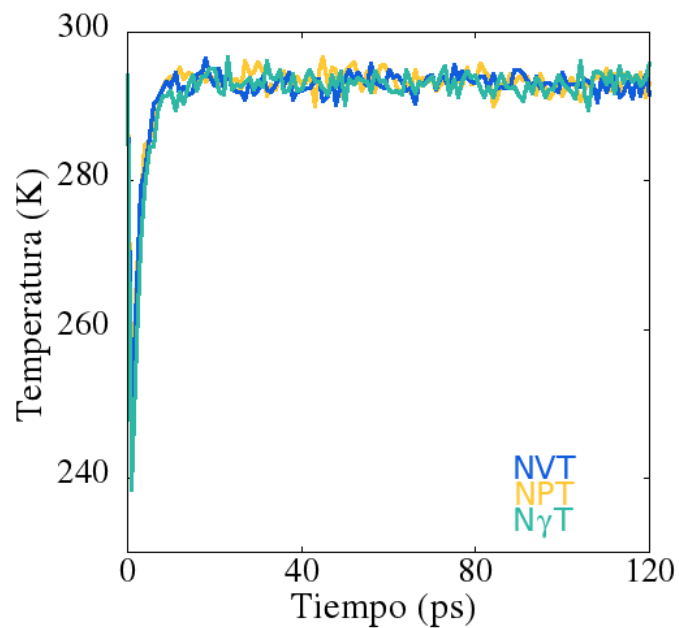


Figura 4.3: Resultado de los primeros 120 ps del proceso de equilibrio de temperatura bajo el ensamble NVT, N γ T y NPT.

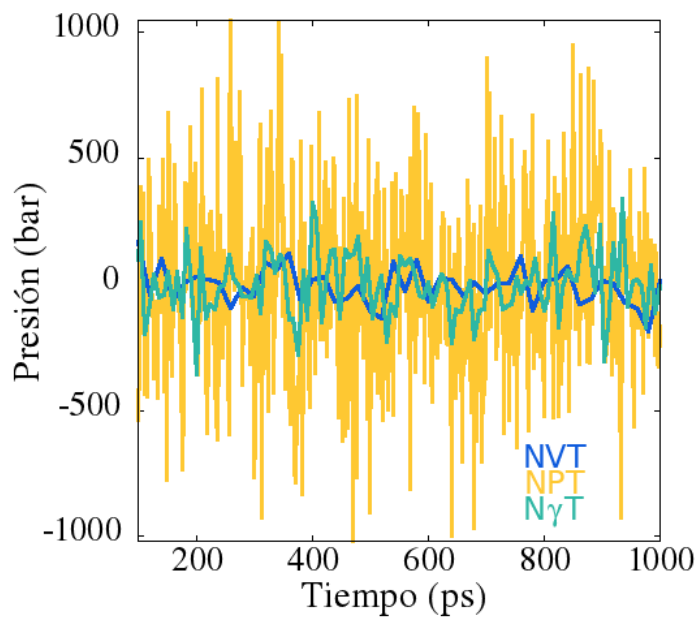


Figura 4.4: Componente zz del tensor de presión en el último ns del proceso de equilibrio para los sistemas NVT, N γ T y NPT.

comportamiento no se debiera a una falta de tiempo para llegar al equilibrio se dejó equilibrar por 20, 40, 80 y 100 ns adicionales, sin embargo, el comportamiento de la presión fue el mismo.

4.1.3. Dinámica Molecular

Después del proceso de minimización de energía y equilibrio, los sistemas se desarrollaron en GROMACS por un total de 15 ns bajo los algoritmos de iteración temporal, descritos en el capítulo 3, para dinámica molecular sin ninguna restricción a las interacciones entre las moléculas. El criterio que se utilizó para determinar el ensamble en el cual se desarrolló este trabajo fue mediante el análisis de tensión superficial de los sistemas a diferentes mma , utilizando como referencia los datos numéricos reportados para el DPPC [85].

La tabla 4.1 muestra los valores para la tensión superficial de los sistemas bajo condiciones NVT y NPT, obtenida de los últimos 5 ns de cada simulación. Para obtener el área superficial en los sistemas NPT es importante mencionar que se desarrolla bajo condiciones semiisotrópicas en la presión, esto quiere decir que el acoplamiento de presión es isotrópico en la dirección x e y , pero diferente en la dirección z . Se desarrollaron una serie de simulaciones que consistieron en la implementación sistemáticas de diferentes valores de la presión P_{xx} entre -50 bar hasta 50 bar hasta alcanzar el área superficial deseada de 55 , 63 y $90 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, manteniendo $P_{zz} = 0$ [60]. Los resultados muestran que la relación entre el mma y γ para los sistemas bajo el ensamble NPT para mma menores que 90 tienen γ negativa, lo cual es físicamente inadecuado para el tipo de sistemas que se pretenden estudiar y la principal razón por los valores negativos obtenidos para este sistema es que las condiciones impuestas para los sistemas están mal implementadas.

Área Superficial ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	NPT (mN/m)	NVT (mN/m)
55	-107.57	38.6
63	-38.22	52.17
90	5.77	61.17

Tabla 4.1: Relación de tensión superficial para ensambles NPT y NVT.

Al igual que el sistema bajo el ensamble NPT, en el ensamble $N\gamma T$ se varía la tensión superficial hasta alcanzar la *mma* deseada. En la tabla 4.2 se presentan los resultados de la membrana de DPPC bajo los ensambles NVT y $N\gamma T$. Los sistemas bajo $N\gamma T$ permanecen en un intervalo de *mma* entre 55 y 63 Å²/molécula, mientras que para valores superiores a una tensión superficial de 55 mN/m los sistemas presentan inestabilidades y la subrutina se rompe; en este trabajo se desconoce la razón por la cual los sistemas $N\gamma T$ no superan un área por molécula de 63 Å²/molécula con las condiciones descritas en la sección anterior.

Área Superficial (Å ² /molécula)	$N\gamma T$ (mN/m)	NVT (mN/m)
55	35.76	38.61
60	40.86	-
63	50.90	52.17
90	-	61.17

Tabla 4.2: Relación de tensión superficial para ensambles $N\gamma T$ y NVT.

Debido a los resultados presentados en las tablas 4.1 y 4.2, se decidió que el ensamble con el que se desarrollen los sistemas es el ensamble NVT, puesto que el ensamble NPT presenta tensiones superficiales negativas y que el ensamble $N\gamma T$ no supera el área promedio por molécula de 63 Å²/molécula; debido a que se estudiarán las fases de líquido expandido (*mma* > 70 Å²/molécula) y líquido condensado (*mma* < 65 Å²/molécula). En el siguiente capítulo se utilizará el ensamble NVT para simular una membrana mixta de DPPC/DPPG interactuando con agentes externos; en este trabajo, los agentes externos consistirán en cuatro diferentes drogas con propiedades anestésicas.

4.2. Membrana DPPC/DPPG con agentes externos

Como se hace mención en el capítulo 1, en este trabajo se decidió utilizar una membrana compuesta de dos lípidos conocidos como dipalmitoilfosfatidilcolin (DPPC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) (véase Fig. 1.2), debido a que se ha demostrado que el 80% de los lípidos que componen el surfactante pulmonar es una mezcla de 4:1 de lípidos fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilglicerol (PG) [36, 86]. Se utilizaron

cinco diferentes configuraciones para explorar dos fases de la membrana; 90 y 75 Å²/molécula para la fase líquido expandido, y para líquido condensado se utilizaron 63, 55 y 50 Å²/molécula. Las propiedades que se analizaron son: tensión superficial, función de distribución radial, densidad y parámetro de orden; todas están descritos en el capítulo 3. Antes de introducir las drogas a la membrana, es necesario desarrollar una validación del sistema, lo anterior para evitar trabajar con un modelo inválido; de esta manera se propuso un análisis de la tensión superficial de los sistemas a diferentes mma y compararlos con el trabajo de Hu [36].

4.2.1. Validación de los sistemas iniciales

Siguiendo los procedimientos descritos en el capítulo 3.1.4 y utilizando un ensamble NVT, se realizaron la minimización y equilibrio de los sistemas, cuyos resultados se muestran en la Fig. 4.5, donde se observa que los sistemas llegan a un valor cercano al equilibrio, logrando que la fuerza que experimentan sus átomos no supera los 1000 kJ/mol/nm (véase capítulo 3.1.4) utilizando el método de descenso de gradiente. Mientras que la temperatura de referencia fue fijada a 293.15 K, la cual se mantiene de manera adecuada por el termostato *v-reescale* con una desviación estándar de $s = 0.71$ K en promedio.

Una vez alcanzado el equilibrio para cada sistema, se dejó evolucionar bajo condiciones NVT por 20 ns, donde se utilizaron los últimos 5 ns de simulación para el análisis de las propiedades físicas de los sistemas.

En este trabajo se utilizó el comportamiento de la tensión superficial como validación de los sistemas dado que los sistemas que involucran monocapas de DPPC y DPPG han sido estudiados ampliamente tanto numéricamente como experimentalmente. Como punto de comparación se utilizó el trabajo desarrollado por Hu [36], en el cual describen el comportamiento de una membrana DPPC/DPPG cuando interactúa con ketoprofeno. La comparación entre el trabajo de Hu y los resultados obtenidos de este trabajo se muestran en la Fig. 4.6, donde se puede observar una diferencia entre los valores de la tensión superficial, no obstante preserva la forma de la curva. La diferencia entre los valores de la tensión superficial se deben principalmente a la

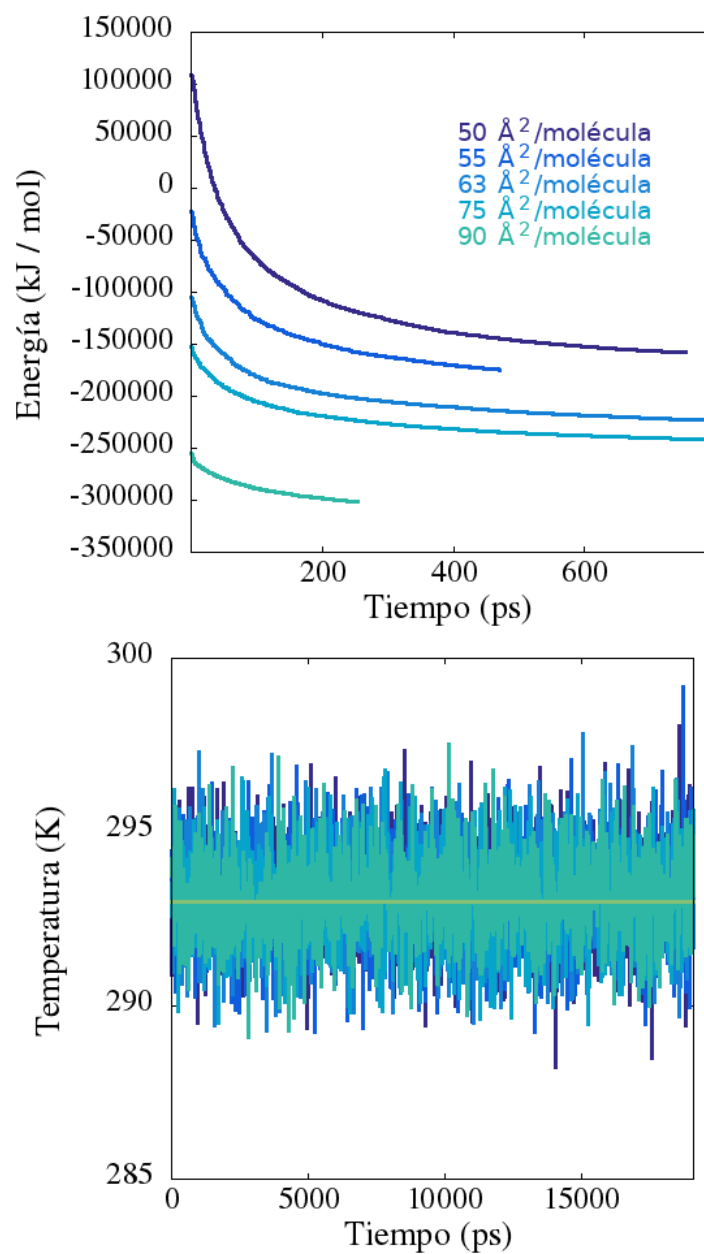


Figura 4.5: Gráficas de la minimización de energía para los sistemas libres de droga a diferentes área por molécula (imagen superior), así como la temperatura en el proceso de equilibrio (imagen inferior) donde la línea amarilla representa la 293.15 K.

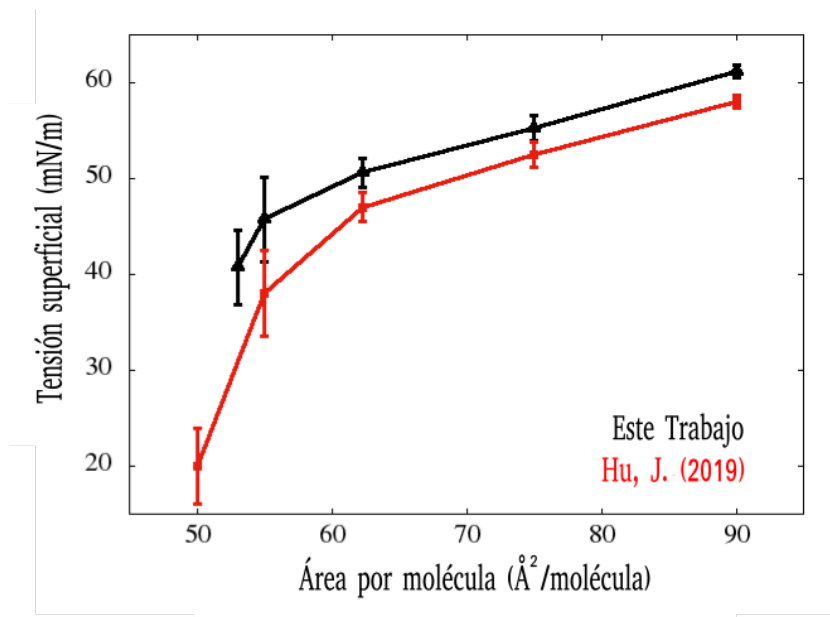


Figura 4.6: Comparación entre los resultados de una membrana DPPC/DPPG presentado en el trabajo desarrollado por Hu en 2019 [36] y los resultados de los sistemas descritos en este trabajo.

versión tanto del software (GROMACS 5.0 para Hu y GROMACS 2020.1 para este trabajo) y campo de fuerza (Charm36 versión 2018 para Hu y charmm36 versión 2020 para este trabajo).

La presión superficial se calcula mediante la ec. 2.6, sin embargo existe una discusión relacionada al parámetro a considerar en γ_0 ; algunos trabajos utilizan el valor experimental conocido para el agua a 20°C que corresponde a un valor de 72 mN/m, mientras que otro consideran la tensión superficial reportada (o calculada) para el modelo de agua que están empleando en sus simulaciones. El valor de la tensión superficial para el modelo de agua TIP3P a 290 K es ≈ 58 mN/m [87].

Independientemente de la elección de γ_0 , la presión superficial reportada a 90 Å²/molécula experimentalmente para membranas DPPC/DPPG corresponde a valores cercanos a 0 [88], de esta manera los resultados en este trabajo se aproximan de mejor manera a los reportados experimentalmente. Con base en los resultados descritos, se valida que los sistemas están correctamente equilibrados y corresponden a sistemas físicos aceptables, por lo que se siguió con la introducción de las drogas a

los sistemas en su configuración final, para así garantizar que los sistemas representen configuraciones aceptables energética y estructuralmente.

4.2.2. Interacción membrana-drogas

En esta sección se discutirá brevemente la metodología que se utilizó para la incorporación de las drogas a los sistemas previamente equilibrados y validados. Para ello se utilizaron cuatro diferentes moléculas con propiedades: anestésicas, morfina, lidocaína, THC y CBD; cuyas estructuras moleculares se encuentran en la Fig. 1.2.

El método que se utilizó para introducir las moléculas en los sistemas consistió en depositar en las dos interfaces vacío-lípido ocho drogas de manera aleatoria en cada interfase mediante el comando de GROMACS *gmx insert - molecules*. Posteriormente, para garantizar que la distribución de las moléculas sea adecuada, se implementó una minimización de energía previo al proceso de equilibrio, tal como se realiza con los sistemas compuestos únicamente de lípidos. Como los sistemas se encuentran previamente en equilibrio, el proceso dura apenas unas decenas de ciclos. Para ver como la incorporación de las drogas no afecta de manera significativa la configuración energética, se realizó el proceso de minimización de energía con una membrana en su configuración previa a la minimización de energía añadiendo desde el inicio las moléculas de droga, el resultado se muestra en la Fig. 4.7.

Posterior a la minimización de la energía, se procede con la implementación de los algoritmos para el equilibrio y su posterior iteración en DM. Nuevamente, los algoritmos regulan satisfactoriamente la temperatura y presión. Las configuraciones finales de los sistemas obtenidos de la dinámica molecular se muestran en la Fig. 4.8; donde se puede observar de manera cualitativa como las diferentes configuración estructurales de las membranas, debidas al espacio disponible (área por molécula), afectan el agrupamiento de las drogas en torno a ellas mismas y también relativas a la membrana.

Para medir de manera cuantitativa las afectaciones en los sistemas, a partir de las simulaciones DM, se calculan las propiedades de la capa superficial: tensión superficial, perfil de densidad, función de distribución radial y el parámetro de orden de los

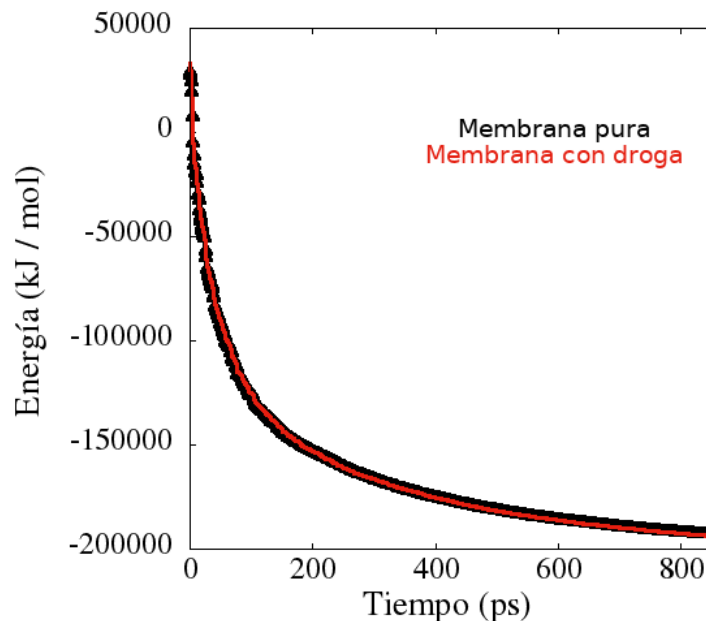


Figura 4.7: Relación entre las energías de la membrana de DPPC/DPPG pura y con la presencia de las drogas en la interfase durante el proceso de minimización de energía.

sistemas; estas propiedades están considerando el error estadístico de las simulaciones y el promedio de tiempo de los últimos cinco ns de la simulación DM.

4.2.3. Cambios físicos y estructurales

Tensión superficial

La primera propiedad que se analizó fue el cambio inducido a la tensión superficial del sistema (véase Fig. 4.6) al introducir las moléculas de droga a la interfase. Para que los valores de la tensión superficial no quedarán encimados, debido a que se consideran las mismas áreas por molécula y que los valores de la tensión no varían en gran medida, se consideró la concentración superficial (Γ) en lugar del área por molécula. Para calcular Γ se divide la masa de las moléculas que componen cada interfase entre el área en el que se encuentran, mientras que la tensión superficial se calcula utilizando la teoría de Kirkood-Woof mediante la ec. 3.8; los resultados se muestran en la Fig. 4.9.

La tensión superficial de todos los sistemas disminuye a medida que aumenta

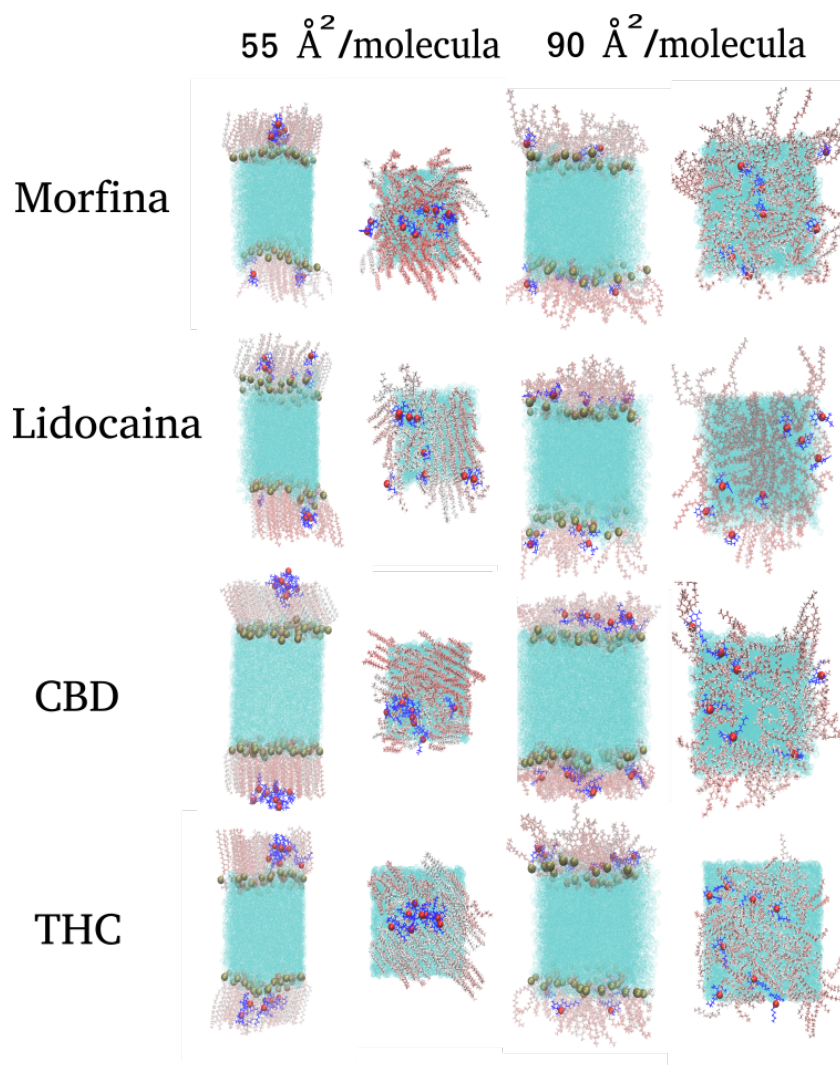


Figura 4.8: Configuración final de los sistemas membrana-drogas.

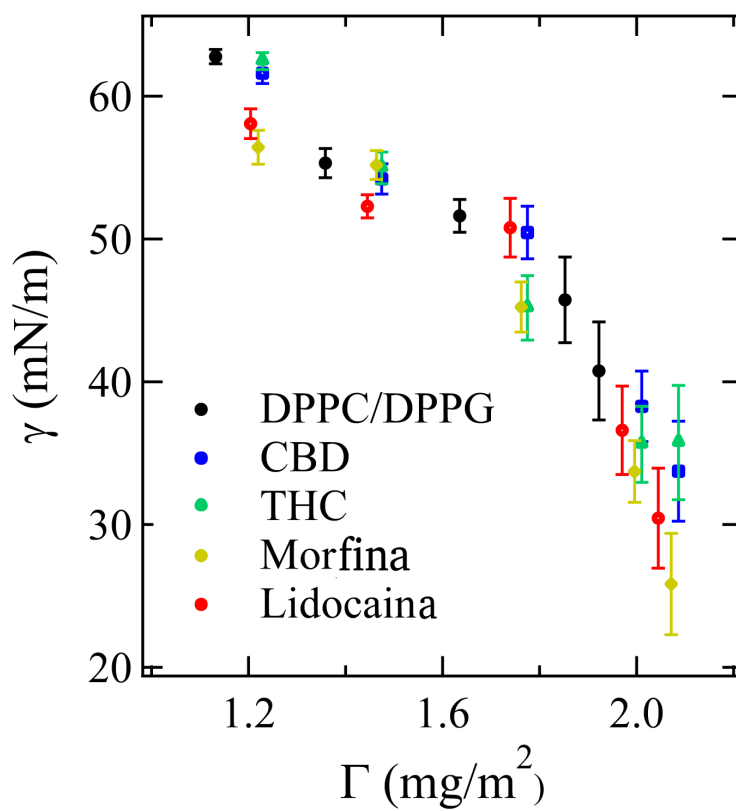


Figura 4.9: Variaciones de la tensión superficial de la membrana DPPC/DPPG en relación a la concentración superficial (Γ) debido a la introducción de las drogas a la interfase.

Γ , este efecto se debe al carácter anfílico de los lípidos cuando se adsorben en la interfase de agua [86, 89]. Sin embargo, la diferencia de γ entre una monocapa con y sin la presencia de las drogas, se debe a la adsorción de las moléculas en la monocapa lipídica impulsada por la interacción entre la *colina* en el grupo principal de lípidos y el benceno de las moléculas de las drogas, que se atribuye principalmente a la interacción catión- π [90]. Dado que Γ aumenta para las moléculas de lípidos y drogas, como consecuencia γ disminuye, por lo tanto, las capas superficiales mixtas de droga-lípidos mostraron una tensión superficial ligeramente menor en áreas más pequeñas por molécula (mayor Γ) que la compuestas únicamente por lípidos, esta podría ser la razón por la cual la capa superficial presenta inestabilidades o rupturas (colapsos) en áreas más pequeñas por molécula [36, 69, 91].

Perfil de densidades y RDF

El perfil de densidad (*gmx density*) y la función de distribución radial (*gmx rdf*) se obtuvieron utilizando el paquete GROMACS [60, 49]. La Fig. 4.10 muestra el perfil de densidad respecto al centro de masas (COM) de cada droga a lo largo del eje z -. Cada perfil de las drogas estudiadas se encuentra en áreas moleculares entre 55 y 90 \AA^2 /molécula. Observamos que el pico de la densidad de la molécula se desplaza hacia la interfase agua-lípidos a medida que aumenta el área molecular media. Se observa a una presión superficial más alta que la posición de la densidad máxima de morfina se superpone a la interfase agua-lípidos, y el CBD tiene una distribución más amplia; este comportamiento no se observa para la lidocaína y el THC (ver Fig. 4.10).

Estos resultados sugieren que las interacciones entre las moléculas de morfina y el CBD con los grupos de cabeza en los lípidos favorecen un acercamiento a la interfase agua-lípidos incluso cuando los lípidos se encuentran en una fase líquido-condensado (LC, que corresponde a $mma = 55 \text{\AA}^2$ /molécula). Sin embargo, los perfiles de densidad de lidocaína y THC muestran un comportamiento diferente. A presiones superficiales más altas, las moléculas se acercan a las cabezas polares de los lípidos, pero evitan la interfase agua-lípidos, permaneciendo dentro de las colas de hidrocarburos lipídicos. Este comportamiento probablemente se deba a la compleja interacción catión- π que

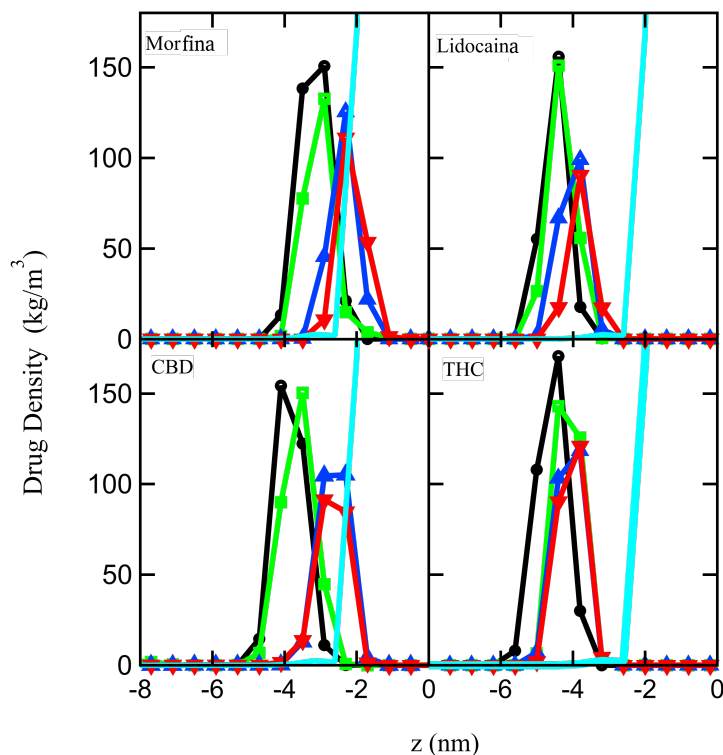


Figura 4.10: Perfil de densidades para las drogas variando las áreas moleculares entre 55 (círculos negros), 63 (cuadrados verdes), 75 (triángulos azules) y 90 (triángulos invertidos rojos) $\text{\AA}^2/\text{molécula}$, la línea color azul cielo es el perfil de densidad del agua.

puede ser atractiva o repulsiva [92].

Las funciones de distribución radial (RDF) se calculan a partir de las posiciones promedio de los grupos de átomos específicos y son útiles para investigar la variación de las posiciones relativas de las moléculas en la interacción por pares [64]. Se calculó la RDF para los átomos de oxígeno en una interacción por pares con otro oxígeno del mismo tipo de droga, y los átomos de oxígeno de las drogas con los átomos de fosfato en los lípidos. Sin embargo, como las moléculas de morfina, CBD y THC tienen más de un átomo de oxígeno en su estructura molecular, para calcular la RDF se utilizaron los átomos resaltados en la Fig. 1.2 (rojo para oxígeno y azul para fosfato).

La Fig. 4.11, muestra el comportamiento de la RDF frente a la distancia reescalada entre los grupos oxígeno y fosfato (RDF O-P). Se produce un aumento en la amplitud para la RDF a medida que el área por molécula aumenta en todas las drogas estudiadas. El incremento de amplitud se produce en la distancia de equilibrio media entre

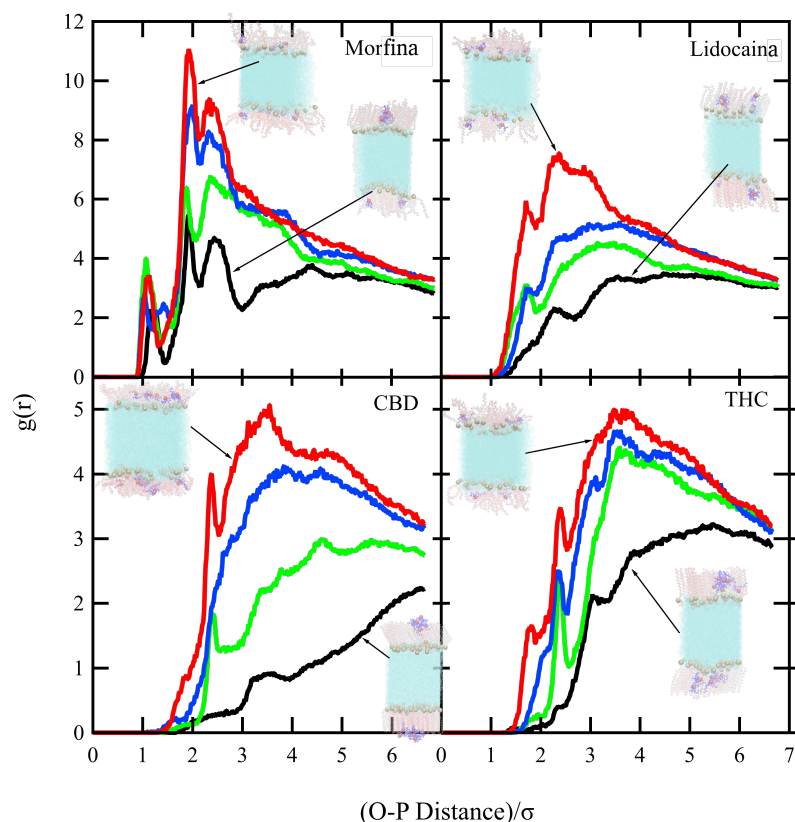


Figura 4.11: Función de distribución radial del oxígeno de la morfina, lidocaína, CBD y THC en relación con el grupo fosfato de los lípidos en diferentes áreas moleculares medias: 55 (negro), 62,3 (verde), 75 (azul) y 90 (rojo) Å²/molécula. Los recuadros muestran un corte lateral de la configuración final de los sistemas, en el que observamos la relación entre la RDF_{O-P} y el posicionamiento de las drogas en relación con la interfase lípido-agua.

los átomos de oxígeno de las drogas en relación con los grupos fosfato de los lípidos; el RDF está claramente distribuido para la morfina a distancias $\approx 2\sigma$ y lidocaína a distancias $\approx 2.5\sigma$. Se observa una distribución más amplia de RDF para CBD y THC; sin embargo, el pico se ubica en $\approx 3.5\sigma$ para ambas drogas. El comportamiento de la RDF sugiere que, en equilibrio, la morfina prefiere estar más cerca de las cabezas polares de los lípidos, sin embargo, como se observa en los perfiles de densidad, estas drogas se encuentran dentro de las colas de lípidos. Por otro lado, la distribución más amplia para la lidocaína, el CBD y el THC, sugiere que estas drogas están más alejadas de las cabezas polares y muy probablemente en las colas hidrocarbonadas de los lípidos.

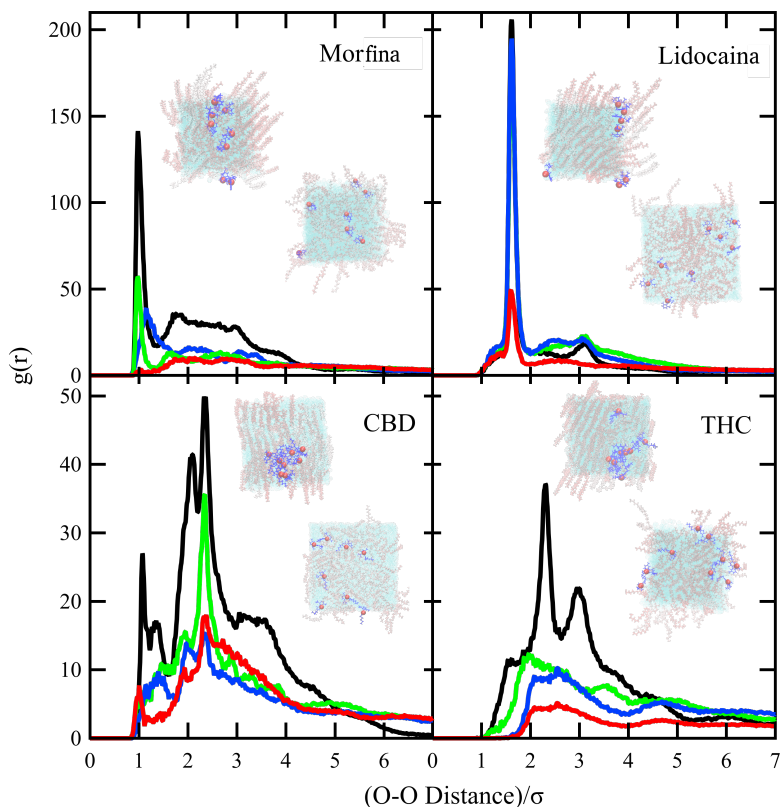


Figura 4.12: Función de distribución radial de los átomos de oxígeno de la morfina, lidocaína, CBD y THC en relación con las drogas del mismo tipo en diferentes áreas moleculares: 55 (negro), 62,3 (verde), 75 (azul) y 90 (rojo) $\text{\AA}^2/\text{molécula}$. Los recuadros muestran la configuración de equilibrio de los sistemas, visto desde la parte superior del cuadro de simulación, estos cuadros muestran cómo se organizan las drogas, la estructura de las drogas en forma de *cluster* corresponde a una fase lipídica compacta en áreas moleculares bajas.

La figura 4.12 muestra la RDF frente a la distancia reescalada de los átomos de oxígeno del mismo tipo de droga. La amplitud de RDF aumenta a medida que disminuye el área molecular; por lo que se infiere que las drogas tienden a autoagregarse. Observamos una distribución marcada para la morfina ($55 \text{\AA}^2/\text{molécula}$) y la lidocaína (de 55 a $75 \text{\AA}^2/\text{molécula}$), lo que sugiere que estos fármacos tienden a agruparse a una media más baja de áreas moleculares que el CBD y el THC.

Resumiendo la información de las distancias de equilibrio promedio O-P y O-O, el panorama completo sugiere que a concentraciones más bajas de lípidos en la superficie, las drogas se distribuyen uniformemente, la morfina y la lidocaína se acercan a las cabezas polares de los lípidos a distancias promedio de $\sim 2\sigma$, más cerca que CBD

y THC que promedia distancias de $\sim 3.5\sigma$. Cuando aumenta la concentración de lípidos en la superficie, las cuatro drogas tienden a formar grupos y son repelidas por las cabezas polares; de nuevo, la morfina y la lidocaína son los fármacos menos repelidos por las cabezas polares.

Parámetro de orden

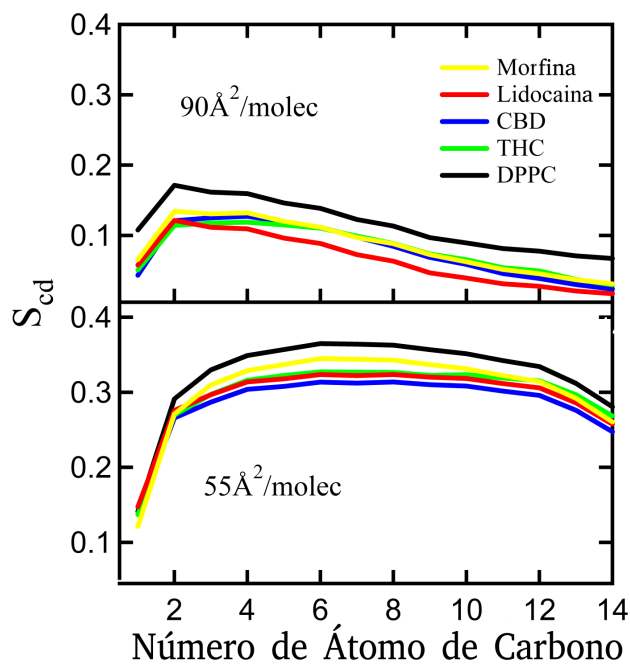
Como se describe en el capítulo 4, el parámetro de orden (S_{cd}) es un buen indicador de la fase en la que se encuentra el sistema. Mediante el comando `gmx order` de GROMACS se calculó el S_{cd} de las colas hidrocarbonadas de los lípidos individuales para cada sistema; donde se consideró como referencia los sistemas que no contienen drogas, los resultados se muestran en la Fig. 4.13.

La disminución en el parámetro de orden surge cuando las membranas lipídicas cambian de fases líquidas ordenadas a desordenadas sin considerar la inclusión de las drogas [36, 86]. Como era de esperar, el parámetro de orden disminuye cuando las drogas están en el sistema, ya que el orden de las colas hidrocarbonadas de los lípidos se ve interrumpido por las diferentes moléculas de drogas que interactúan con ellas. Sin embargo, la inclusión de drogas a las concentraciones estudiadas no induce una transición de fase de las monocapas.

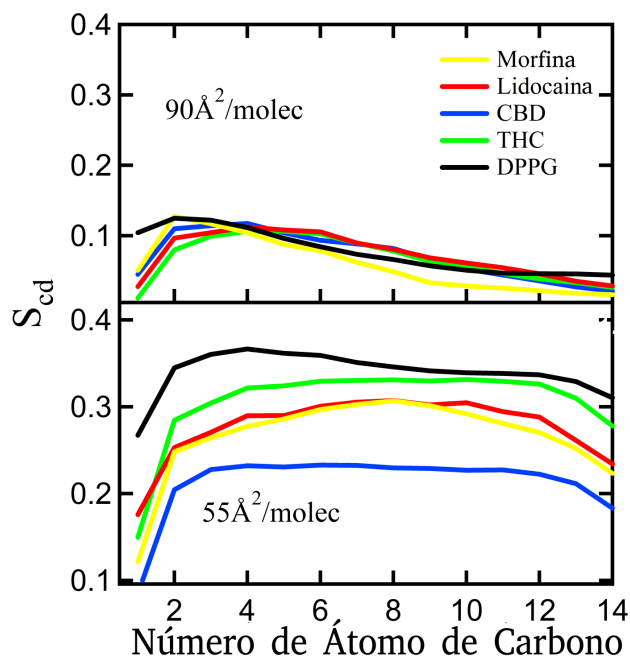
Se eligieron los sistemas de lípidos en el diagrama de fase en las fases líquida expandida (LE) y líquida condensada (LC). En las simulaciones realizadas no se consiguieron valores estables de tensión superficial para estudiar la coexistencia de fases LE+LC en la monocapa, probablemente debido a inestabilidades provocadas por el tamaño de la caja de simulación y el número de lípidos.

4.2.4. Resultados para la energía libre

La figura 4.14 muestra los valores del potencial de fuerza media (PMF) del método del muestreo de sombrilla (US), estos valores se obtienen para cada molécula de droga en diferentes posiciones de prueba en la monocapa de DPPC/DPPG por medio del método de empuje para PMF descrito en 3.1.4. Para la capa lipídica superficial fijamos



(a)



(b)

Figura 4.13: Parámetro de orden para los lípidos DPPC (a) y DPPG (b), en relación al número de átomo de carbono en la cadena de los lípidos donde 1 corresponde al átomo de carbono más próximo a la cabeza; se muestran los sistemas con un área molecular de $90 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ (superior) y $55 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ (inferior).

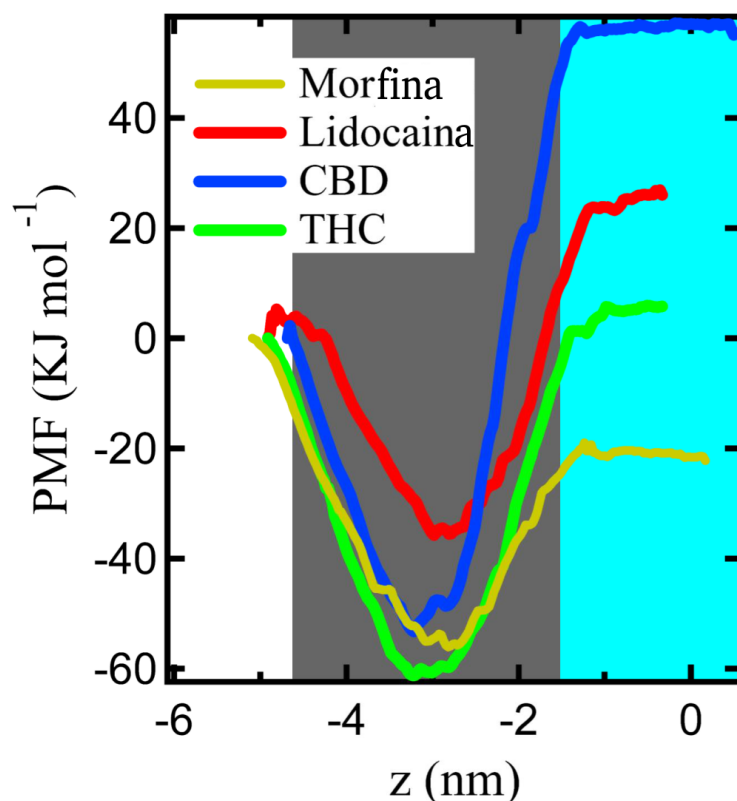


Figura 4.14: Potencial de fuerza media de una sola molécula de morfina, lidocaína, CBD y THC a través de la monocapa de DPPC/DPPG en un área de por molécula de $55 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. El vacío está representado en el área blanca, la región ocupada por lípidos con la cola apuntando hacia el vacío en color gris, y el agua es el área en azul.

el área por molécula en $55 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, que corresponde a la fase LC. Los resultados de PMF son consistentes con los resultados de las secciones anteriores; tal es el caso de RDF ya que se aprecia que las moléculas de las drogas tienden a permanecer dentro de las colas lipídicas, y el PMF muestra que la región de las colas es energéticamente favorable para las drogas ya que presenta un mínimo de potencial.

Las interacciones catión- π y el impedimento estérico de los grupos de cabeza de lípidos se oponen a las moléculas para cruzar la barrera [39]. Las interacciones al inicio de la trayectoria de la molécula de droga desde el vacío a través de la membrana hacen posible que las moléculas se inserten espontáneamente en la región de la membrana dentro del grupo de cola de los lípidos. Por lo tanto, el PMF (en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) disminuye a -53.3 para CBD, -61.2 para THC, -35.7 para lidocaína y -56 para morfina;

este mínimo representa el sitio energéticamente más favorable para cada droga. Sin embargo, a medida que el fármaco se acerca a los grupos de cabeza de los lípidos, prevalece la naturaleza estérica de los lípidos, lo que hace que el camino a través de la membrana de la molécula sea más complejo. Sumando la hidrofobicidad de las drogas conduce a un aumento en el PMF.

Una vez que las drogas alcanzan la fase acuosa, la molécula de droga queda rodeada únicamente por moléculas de agua y disminuyen las interacciones droga-lípidos, por lo tanto, los cambios en PMF se vuelven imperceptibles; en la fase acuosa, los PMF alcanzan valores aproximados de 57 para CBD, 5 para THC, 25 para lidocaína y -21 para morfina, en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Entre el mínimo de PMF dentro de las colas lipídicas y el valor en la fase acuosa, los sistemas presentan una barrera energética que impide que las drogas atraviesen la interfase lípido-agua; el valor de las barreras para cada droga es 110 para CBD, 66.2 para THC, 60.7 para lidocaína y 35 para morfina, en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Con base en la diferencia entre el PMF en el vacío (donde su valor es $0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) y el PMF en agua se, se calcula la energía libre (ΔE) para una sola molécula de droga [36, 69]. La tabla 4.3 muestra la energía libre obtenida del método US para cada droga. También se considera como punto de referencia trabajos numéricos y experimentales previos, la diferencia entre los resultados experimentales y las simulaciones previas está relacionada con imprecisiones en el campo de fuerza o porque hay diferentes lípidos en la interfase vacío-agua. Hasta donde se tiene conocimiento, no hay información en la literatura sobre la energía libre asociada a la hidratación del CBD y THC.

A pesar de las diferencias entre los valores numéricos y los resultados experimentales, la simulación proporciona una buena aproximación del comportamiento de las moléculas que interactúan con los sistemas lipídicos. Los resultados del US, junto con los resultados de las secciones anteriores, muestran la persistencia de las drogas en la región dentro de las colas lipídicas; sin embargo, la estructura ordenada formada por las cabezas polares de los lípidos dificulta el paso de las moléculas de las drogas, en consecuencia, aumenta el valor de PMF. Por lo tanto, a medida que se agregan

Tabla 4.3: Valores de ΔE para las drogas presentadas en este trabajo y en referencias.

Fuente	Droga	ΔE (kJ·mol ⁻¹)	Método
Reportado aquí	Morfina	-21	MD
Braun et al. [93]	Morfina	-32.9	HSM, DSC y TGA
Paloncývá et al. [94]	Morfina	-39.3	MD (COSMOtherm)
Reportado aquí	Lidocaína	25	MD
Shehatta [95]	Lidocaina	44.36	<i>Potentiometric Titration</i>
Saeedi et al. [96]	Lidocaina	9.1	MD (GROMACS)
Reportado aquí	CBD	57	MD
Reportado aquí	THC	5	MD

más moléculas de fármaco al sistema, pueden quedar atrapadas dentro de las colas de lípidos y es posible formar agregados debido a otras interacciones (*i.e.*, interacciones estéricas de los lípidos). Los resultados mostraron una tendencia a que los dos componentes principales del cannabis permanecieran dentro de la membrana. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que este comportamiento podría estar relacionado con las propiedades anestésicas del CBD y el THC en comparación con el comportamiento de la lidocaína. Sin embargo, se necesita más investigación sobre las interacciones del CBD y el THC con las proteínas incrustadas en la membrana para completar esta hipótesis.

Capítulo 5

Membrana DPPC y Sevoflurano

En esta sección se mostrarán los resultados numéricos y experimentales para sistemas de una membrana de DPPC interactuando con sevoflurano, para así comparar los resultados y obtener conclusiones relacionadas al mecanismo de interacción entre los componentes mencionados.

5.1. Resultados experimentales

Para obtener un mejor control en la cantidad de material de sevoflurano depositado en la subfase, se realizaron soluciones de sevoflurano (SF) en alcohol etílico de alta pureza (99.5 %, Sigma Aldrich). La densidad del sevoflurano a una temperatura de 20 °C es de 1.5 mg/mL, por lo que se realizaron tres diluciones en alcohol etílico para obtener densidades de 0.15, 0.015 y 0.0015 mg/mL. Dentro del uso de sevoflurano en el ámbito quirúrgico se ha reportado una concentración alveolar mínima para SF en un rango entre 2.1 y 2.8 % para adultos entre 18 y 40 años [97]; por lo que se realizaron experimentos partiendo de concentraciones superiores de SF en la subfase hasta alcanzar valores cercanos a los reportados en el uso para humanos.

En las simulaciones en dinámica molecular (DM) se realizan las proporciones con base en el número de moléculas en la interfase, debido al número pequeño de moléculas que se estudian en este tipo de sistemas en comparación al número de moléculas que se encuentran presentes en los experimentos. En los experimentos, se referirá a la

concentración de sevoflurano en la subfase en partes por billón, tomando en cuenta que hay una posibilidad que no todas las moléculas de SF se encuentren en la interfase lípido-agua; mientras que en la simulación se toma en cuenta la concentración relativa superficial del DPPC (χ_{DPPC}):

$$\chi_{DPPC} = \frac{\text{moles}_{DPPC}}{\text{moles}_{Totales}} = \frac{\text{partículas}_{DPPC}}{\text{partículas}_{Totales}}, \quad (5.1)$$

donde los sistemas que presentan únicamente DPPC corresponde a un valor máximo de $\chi_{DPPC} = 1$, valor que disminuye cuando se introducen moléculas de sevoflurano a los sistemas.

5.1.1. Influencia de alcohol etílico en la monocapa

Como se reporta al inicio de esta sección, se realizaron disoluciones de sevoflurano en alcohol etílico, por que el primer paso a considerar es observar si hay influencia del alcohol depositado en la subfase a las propiedades de la monocapa. Los resultados de la isoterma comparando las monocapas de DPPC con y sin la introducción de alcohol en la subfase se presentan en la Fig. 5.1.

Los cambios debidos a la introducción de alcohol en la subfase parece no ser significativos en la isoterma. Una manera en la cual las pequeñas variaciones en la isoterma cobran más relevancia es en el análisis del módulo de compresibilidad, el cual puede ser derivado de la isoterma mediante la ec. 2.17. La comparación entre los módulos de compresibilidad se muestra en la Fig. 5.2. El módulo de compresibilidad para la monocapa de DPPC presenta un comportamiento más suave cuando se introduce el alcohol en la subfase, esto puede ser explicado por las propiedades tensoactivas del alcohol, incluso se utiliza como estabilizador y antiespumante en algunos procesos [98, 99]. Debido a este motivo, se utilizó los sistemas de DPPC con alcohol en la subfase como referencia para los sistemas en los cuales se introducirá sevoflurano diluido con alcohol etílico con la finalidad de asegurar que las variaciones en los sistemas sean debidas a las interacciones intermoleculares por parte de los lípidos y las moléculas de sevoflurano.

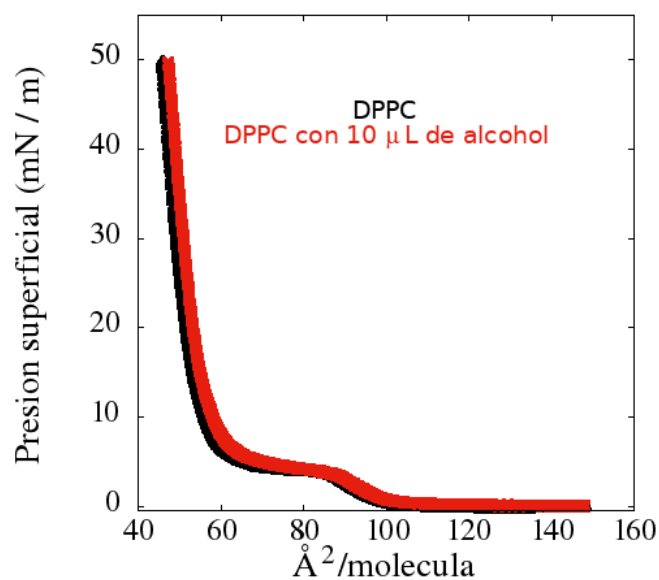


Figura 5.1: Isoterma de dos monocapas de DPPC: (negro) subfase agua ultrapura y (rojo) subfase de agua ultrapura con 10 μL de alcohol etílico de alta pureza.

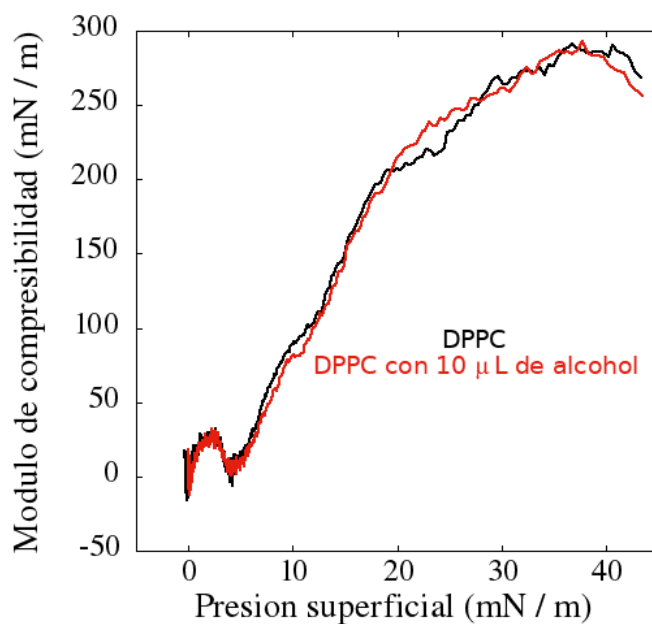


Figura 5.2: Módulo de compresibilidad para las monocapas de DPPC derivado numéricamente de la Fig. 5.1 mediante la ec. 2.17: (negro) subfase agua ultrapura y (rojo) subfase de agua ultrapura con 10 μL de alcohol etílico de alta pureza.

Experimento	Concentración (mg/mL)	Volumen (μL)	ppb
DPPC	1	20	0
SF	0.15	10	13.76
SF	0.15	5	6.88
SF	0.015	10	1.37
SF	0.015	5	0.68
SF	0.0015	10	0.13
SF	0.0015	5	0.06
SF	0.0015	1	0.01

Tabla 5.1: Relación del volumen depositado para los experimentos realizados. En todos los experimentos se depositaron 20 μL de DPPC, la variación se desarrolla en la concentración y volumen depositado de sevoflurano (SF).

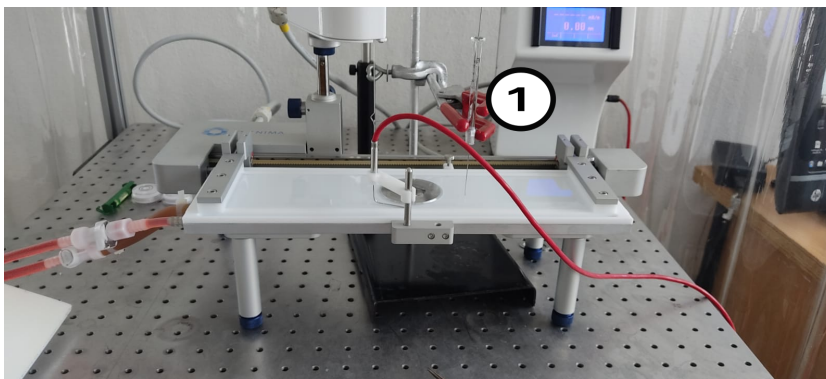


Figura 5.3: Imagen del experimento montado para la introducción de las moléculas de droga en la subfase. En comparación con la Fig. 2.7, se añade una microjeringa de 10 μL (1) para depositar las diferentes concentraciones mencionadas en la tabla 5.1.

5.1.2. Análisis de isoterms y módulos de compresibilidad

En la tabla 5.1 se da la relación entre la cantidad de material depositado para los sistemas en estudio para esta sección. La cantidad de moléculas aproximadas de DPPC en la monocapa es de 1.6411×10^{16} , mientras que las moléculas de SF varían entre 0.4516×10^{16} y 451.597×10^{16} . En todos los sistemas se depositaron en la interfase un volumen de 20 μL de una disolución de DPPC en cloroformo cuya concentración es 1 mg/mL.

Siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3.2.4, se montó un arreglo experimental mostrado en la Fig. 5.3; para el cual se deposita en la subfase las diferentes cantidades de SF, una vez pasado un tiempo de treinta minutos se retira la microjeringa de la palangana una vez depositada la droga. El proceso de introducción de las

drogas al sistema y el retiro de la jeringa deben ser realizados con extremo cuidado para evitar inducir corrientes o perturbaciones que puedan llevar lípidos al fondo de la palangana. Las isotermas resultantes son mostradas en la Fig. 5.4.

En las imágenes dentro de la Fig. 5.4 se grafica como referencia la concentración del SF que representa la isoterma de la monocapa de DPPC en una subfase de agua con 10 μL de alcohol etílico de alta pureza. Los resultados mostrados en las isotermas de los sistemas, no muestran cambios considerables tomando como referencia el comportamiento o forma de la isoterma característica del DPPC. Para tener información más relevante entre los diferentes sistemas se calculó el módulo de compresibilidad de los sistemas, cuyos resultados se muestran en la Fig. 5.5.

Los resultados muestran una evidente disminución en el módulo de compresibilidad a medida que se incrementa la concentración de sevoflurano en la subfase; no obstante, las gráficas están divididas por la cantidad de material depositado, debido a una aparente dependencia en la disminución del módulo de compresibilidad con la cantidad de alcohol que se introduce al sistema, a pesar de que en la Fig. 5.1 muestra que 10 μL de alcohol etílico no disminuye el módulo de compresibilidad. Para complementar los resultados experimentales se realizaron experimentos de la monocapa de DPPC con una concentración mayor de SF sin diluir en etanol, los resultados son mostrados en la Fig. 5.6.

En la Fig. 5.6 aparece un corrimiento a la derecha en las isotermas aunque no se modifica la forma característica de una monocapa de DPPC ($ppb = 0$), lo cual puede explicarse por un aumento considerable en las moléculas que se encuentran presentes en la interfase pero que no interactúan fuertemente con los lípidos; mientras que el módulo de compresibilidad disminuye nuevamente dependiendo de la concentración de SF en la subfase. La Fig. 5.7 muestra el comportamiento del módulo de compresibilidad respecto a la concentración depositada en la subfase de SF, tomando como referencia un valor constante de la presión superficial (Π).

En los sistemas para $ppb < 20$ (imagen superior en la Fig. 5.7), se muestra una clara tendencia a disminuir el módulo de compresibilidad a medida que se aumenta la concentración del SF en la subfase para $\Pi > 5 \text{ mN/m}$. Para los sistemas con $ppb > 100$

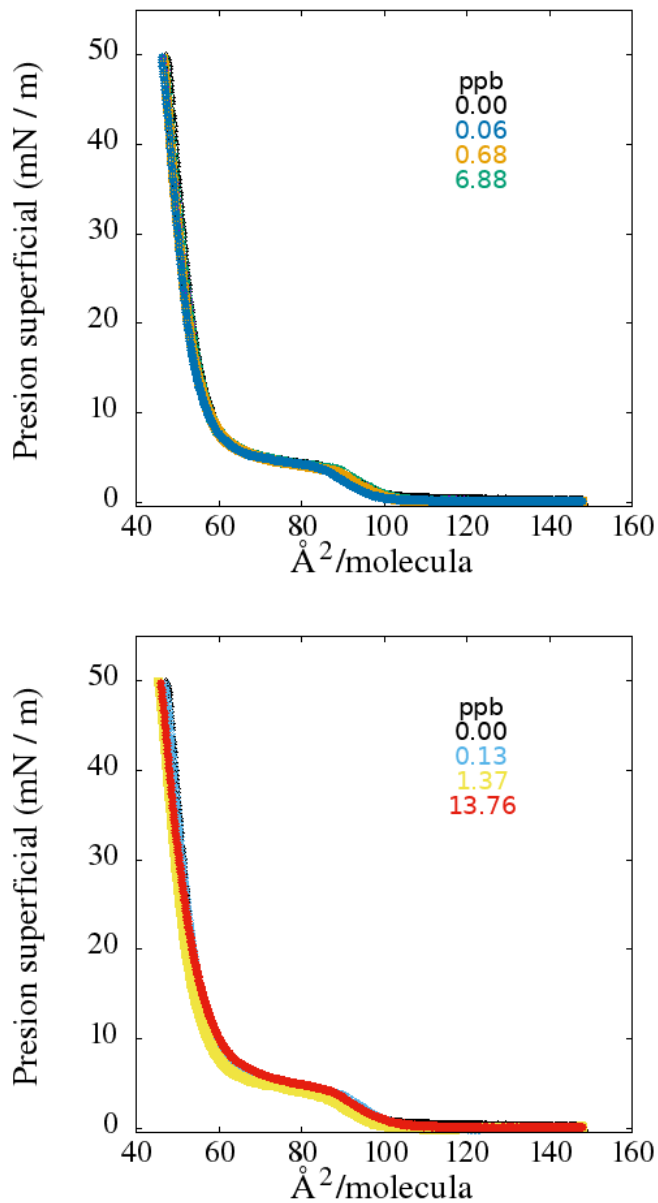


Figura 5.4: Isothermas para monocapas de DPPC bajo las diferentes concentraciones mencionadas en la tabla 5.1, clasificadas por la cantidad de volumen depositado de las disoluciones de SF: 5 μL (arriba) y 10 μL (abajo).

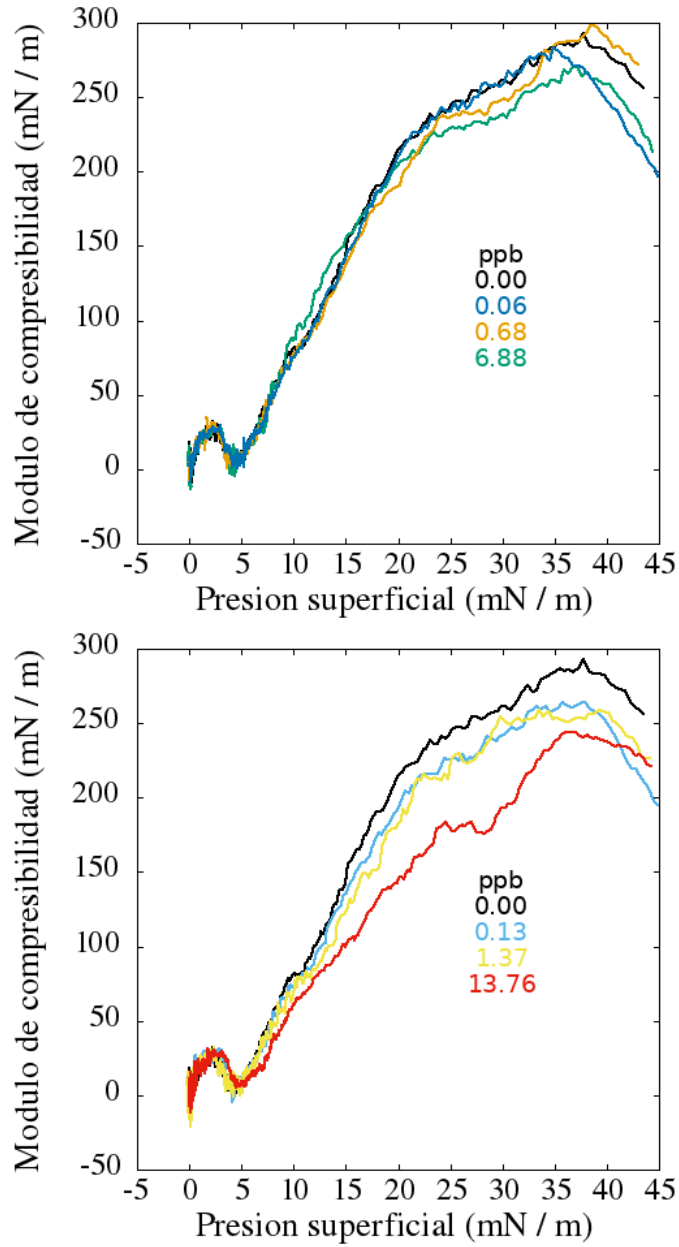


Figura 5.5: Módulos de compresibilidad para los sistemas descritos en la tabla 5.1, clasificadas por la cantidad de volumen depositado de las disoluciones de SF: 5 μL (arriba) y 10 μL (abajo).

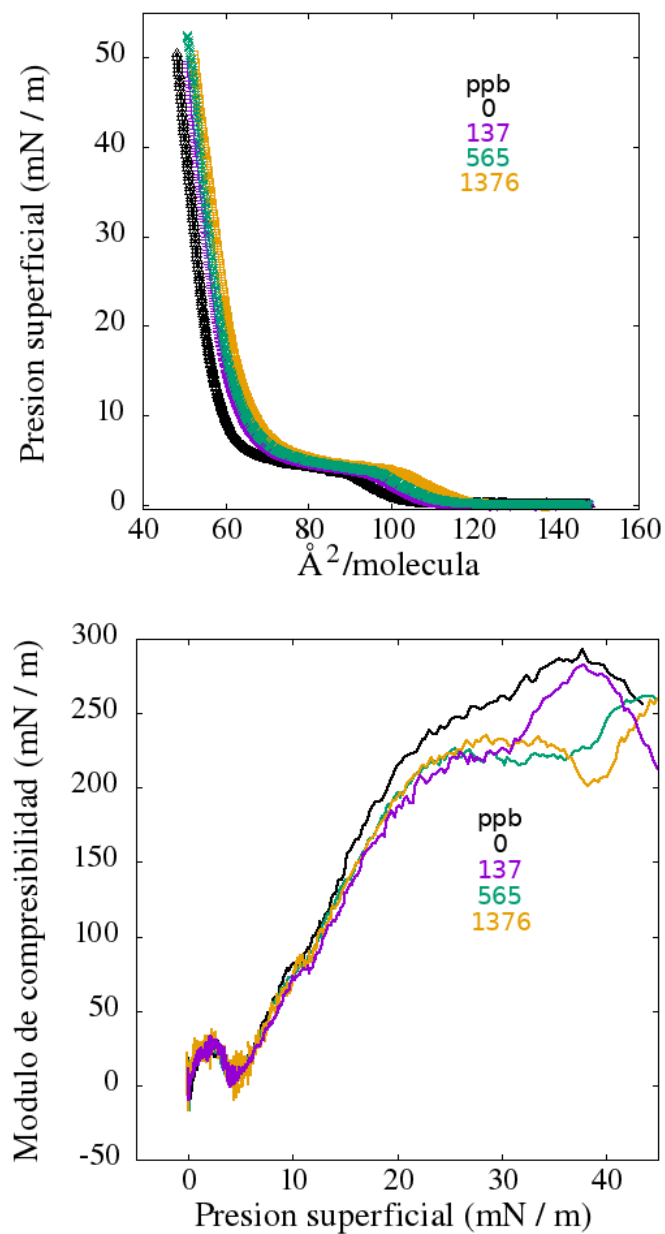


Figura 5.6: Isotermas y módulos de compresibilidad para diferentes concentraciones de SF sin diluir en alcohol etílico en la subfase.

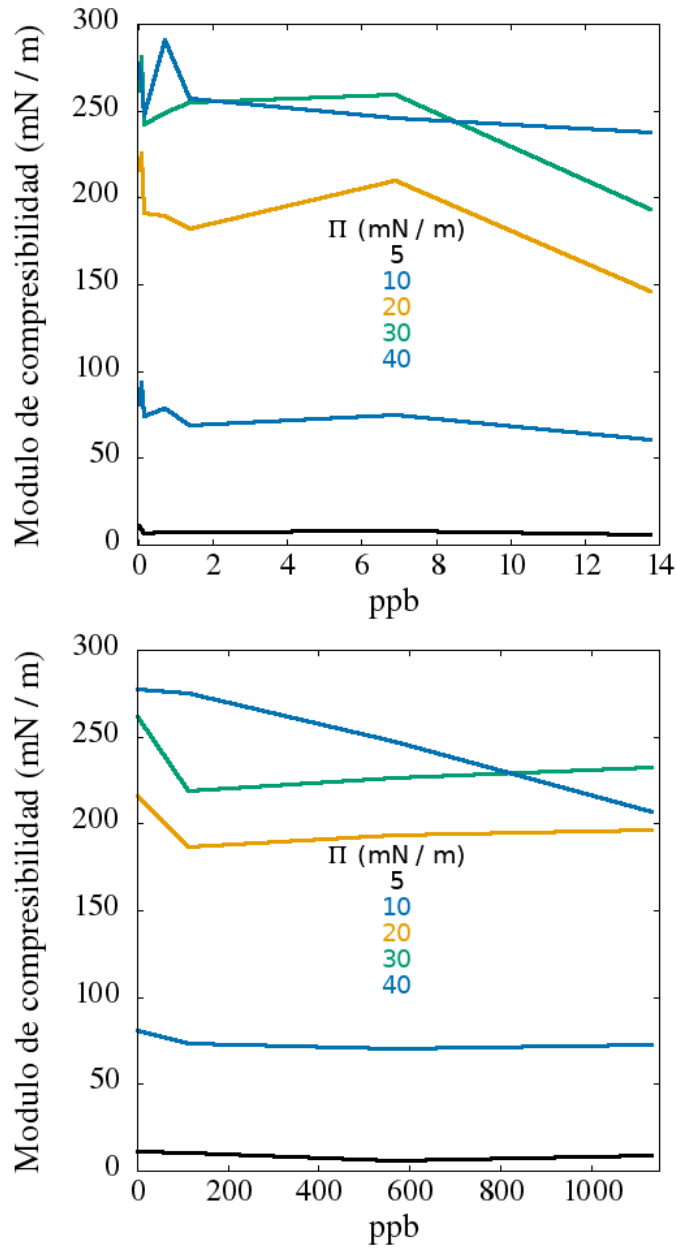


Figura 5.7: Módulos de compresibilidad en relación a la concentración en la subfase de SF manteniendo una presión superficial como referencia; la imagen superior son los resultados correspondientes a SF disuelto con alcohol etílico y la inferior es SF puro depositado en la subfase.

(imagen inferior en la Fig. 5.7) la disminución del módulo prevalece únicamente para $\Pi = 40$ mN/m; sin embargo, los valores para Π de 10, 20 y 30 mN/m tienen un decremento en el módulo de compresibilidad hasta $ppb < 200$, posteriormente se aprecia una tendencia a aumentar el módulo de compresibilidad.

Comparando el comportamiento del módulo de compresibilidad cuando se depositan 10 μ L de SF en alcohol etílico con el caso cuando se deposita SF puro, es claro que la disolución del SF en alcohol interactúa de manera distinta con la monocapa. La causa de este comportamiento puede atribuirse a que el alcohol etílico ayuda a que el SF permanezca en la subfase y eventualmente llegue a la monocapa debido a que el SF es soluble en alcohol etílico y presenta una baja solubilidad en agua, sin embargo no se cuenta con la información necesaria para verificar esta hipótesis. En el trabajo de Müller [100], se estudió el efecto que causa el sevoflurano en ratas que fueron expuestas previamente a alcohol etílico, mostrando que los tiempos de absorción de la anestesia disminuyen, así como la disminución de la concentración alveolar mínima; atribuyendo este fenómeno a que los receptores del alcohol etílico y el sevoflurano son, en su mayoría, los mismos. Dentro del modelo simple de interacción de una monocapa con SF estudiado en este trabajo, se observa que la combinación del alcohol etílico y el SF también afecta de manera diferente las monocapas en comparación a cuando se suministra de manera aislada el SF, aún en concentraciones grandes.

5.2. Resultados numéricos

Con la finalidad de realizar una interpretación numérica de la interacción entre el SF y la monocapa de DPPC, se plantearon sistemas de una membrana monocapa de cuarenta lípidos y ocho moléculas de SF ($\chi_{DPPC} = 0.833$), mientras que la proporción molecular es mayor a la clínicamente recomendada [97, 101, 102]. También se desarrolla el método de muestreo de sombrilla (US) para obtener el potencial de fuerza media (PMF) de una partícula de SF al atravesar la membrana de DPPC.

A diferencia con los parámetros para el estudio del CBD y THC, la parametrización de las interacciones moleculares entre el SF y el DPPC no se obtuvieron directamente

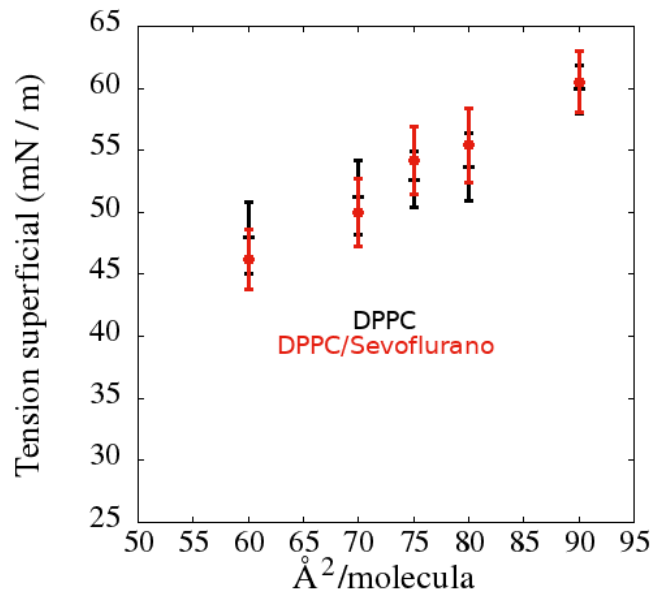


Figura 5.8: Valores de la tensión superficial obtenido de la DM bajo condiciones NVT para una monocapa de DPPC (negro) y DPPC con sevoflurano (rojo), al variar el área por molécula.

de CHARMM por medio de las moléculas cargadas del PDB, debido a que no existen a la fecha, análisis previos bajo DM para sevoflurano. Por lo que se utilizó el programa de lector de ligaduras desarrollado por Kim (2017) [79] para la parametrización de pequeñas moléculas orgánicas en el campo de fuerzas CHARMM36.

5.2.1. Tensión superficial

Una vez obtenido el campo de fuerzas para la DM de la monocapa de DPPC con SF, se siguieron los procedimientos descritos en el capítulo 3.1.4 para el desarrollo de los sistemas. Nuevamente, se emplearon condiciones NVT donde se varía el área por molécula en cantidades de: 90, 80, 75, 70, 60 y 55 Å²/molécula. Los resultados del cálculo de la tensión superficial mediante la ec. 3.8 para cada sistema se muestra en la Fig. 5.8.

El comportamiento que se ilustra en la Fig. 5.8 muestra que la introducción del sevoflurano en los sistemas, no afecta la tensión superficial; considerando que las diferencias entre γ , para la monocapa de DPPC pura y la monocapa con la introducción

de la droga, está contenida en los errores estadísticos al calcular la tensión superficial. Este comportamiento es esperado considerando los resultados mostrados en la Fig. 5.4, dada la ec. 2.6 para la relación entre la presión superficial (Π) y la tensión superficial (γ); al no variar significativamente la presión superficial, la variación de la tensión superficial tampoco debe variar de manera considerable.

A pesar de introducir grandes cantidades de moléculas de SF a los sistemas las variaciones son mínimas por lo que se conlleva sugerir que el cálculo, tanto numérico como experimental, de la tensión superficial no es un parámetro adecuado para medir las afectaciones inducidas a una membrana bajo los efectos de SF, sin embargo, el módulo de compresibilidad puede ser un buen parámetro para ver los cambios de manera más perceptible (véase la Fig. 5.5). En la siguiente sección se analiza los cambios estructurales y configuracionales de la monocapa.

5.2.2. Propiedades estructurales

En la Fig. 5.10 se observan los resultados para el parámetro de orden para los átomos de carbono de las colas de los lípidos de DPPC para la monocapa pura (superior) y cuando se introducen las moléculas de SF (inferior) a diferentes áreas por moléculas. La principal variación ocurre a valores de 60 y 70 Å²/molécula; para 60 Å²/molécula ocurre un aumento del parámetro de orden en los últimos átomos de carbono. En el caso de 70 Å²/molécula eleva el parámetro de orden entre los primeros carbonos; no obstante, en los átomos de carbono que se encuentran al final de la cola vuelve a disminuir. En ninguno de los dos casos se induce un cambio de fase. Este comportamiento es contrario a lo mostrado por las drogas analizadas en el capítulo 4.

En las figuras 5.11 y 5.12 se muestran los valores de la función de distribución radial entre los oxígenos de SF en relación con ellos mismos y los oxígenos de SF con los átomos de fósforo de DPPC, respectivamente. En la Fig. 5.11 se aprecia como a valores de mma iguales o mayores que 70 Å²/molécula las moléculas de SF se encuentran dispersas en toda la monocapa, cualitativamente se puede apreciar en la Fig. 5.9; sin embargo, en la fase líquido-condensado (LC) las moléculas de SF se

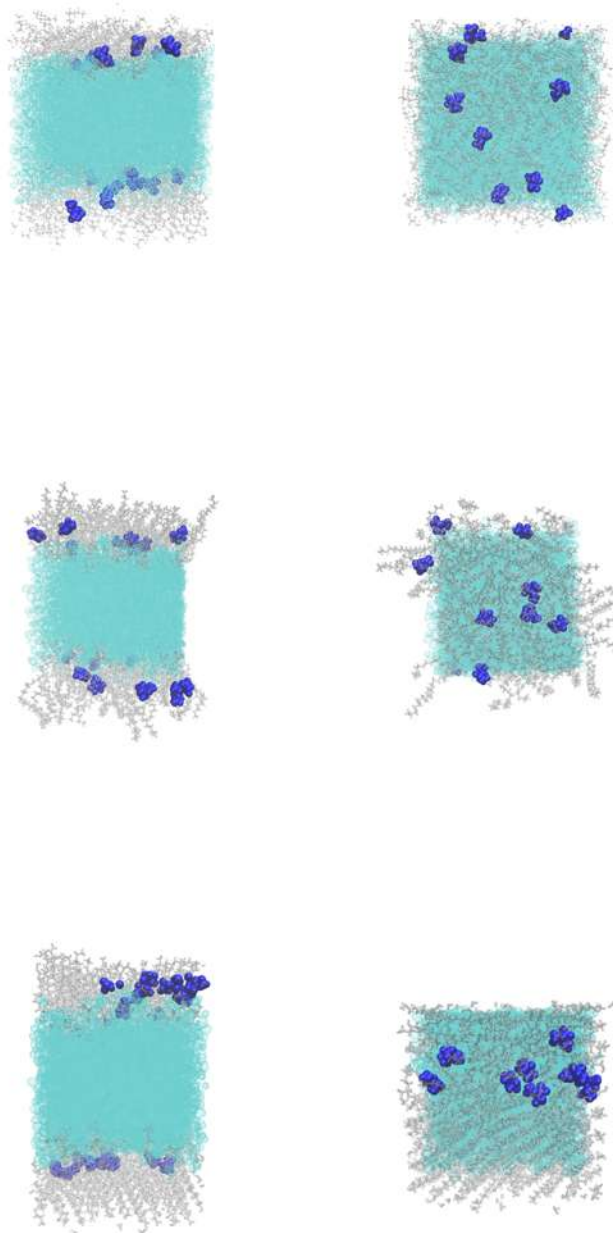


Figura 5.9: Configuración final de los sistemas a un área por molécula de 90 (arriba), 70 (en medio) y 60 (abajo) $\text{Å}^2/\text{molécula}$ vistos desde una perspectiva lateral (izquierda) y desde arriba (derecha).

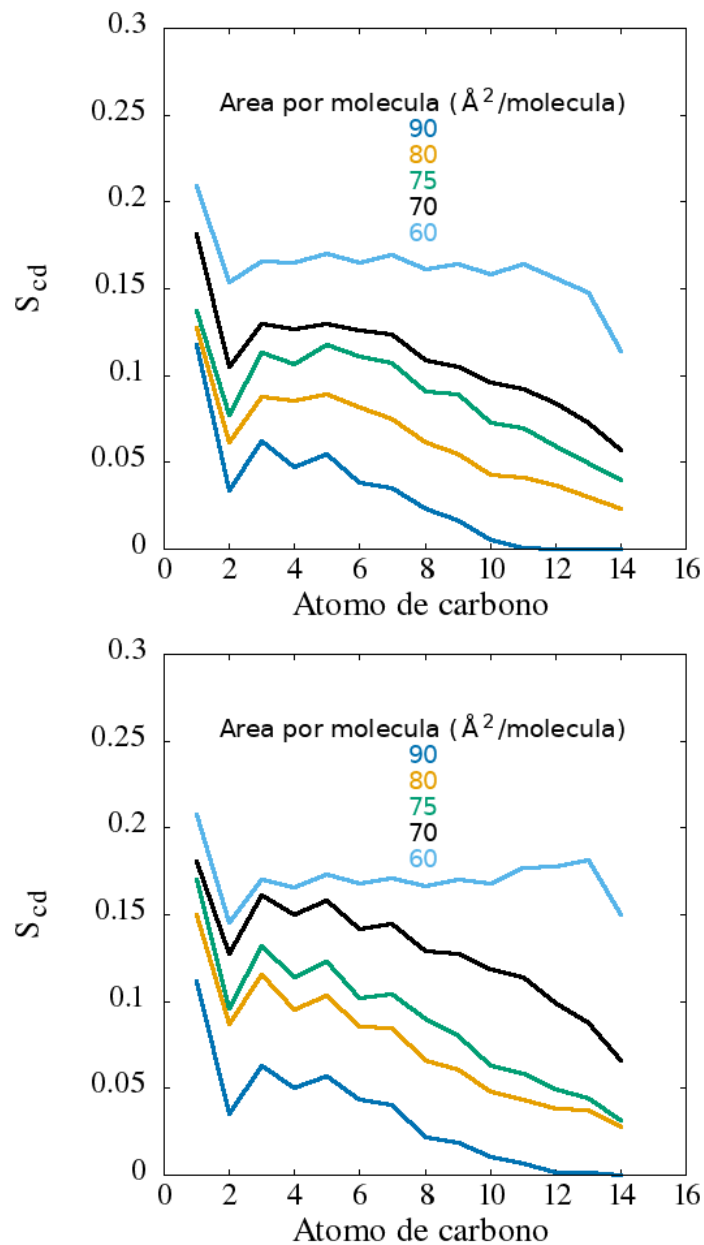


Figura 5.10: Valores del parámetro de orden de los átomos de carbón en las colas de los lípidos para la monocapca de DPPC pura (superior) y en presencia de SF (inferior).

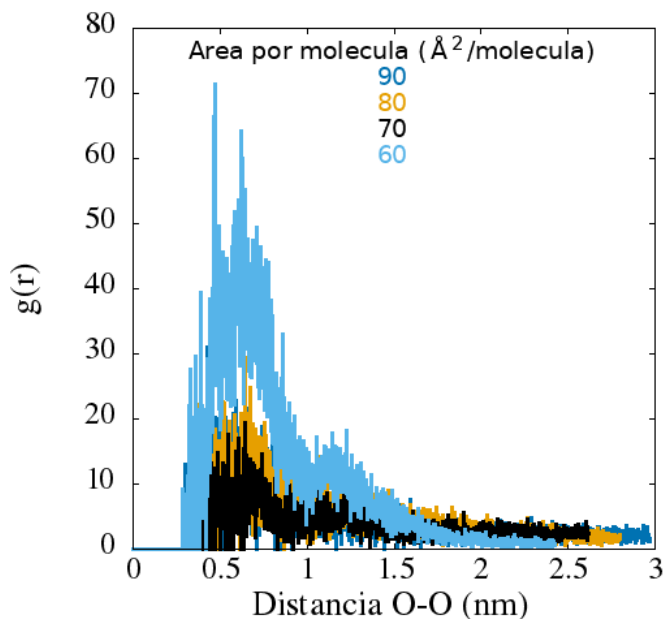


Figura 5.11: Valores de la RDF entre los átomos de oxígeno del SF en relación con ellos mismos a diferentes áreas por molécula.

comienzan a agregar aunque en menor medida si se comparan con el CBD, THC, morfina o lidocaína.

Si se analiza el comportamiento de la función de distribución radial (RDF) presentado en la Fig. 5.12 se aprecia como, en el caso en el cual la monocapa se encuentra en el estado líquido-expandido (LE), las moléculas de SF se encuentran en la región de las colas más cercanas a la cabeza de los lípidos, aproximadamente a 1 nm de distancia (véase la Fig. 5.12 y cualitativamente se observa en las imágenes de la izquierda dentro de la Fig. 5.9). Mientras que en la configuración que corresponde al estado LC, los átomos de SF se alejan de las cabezas y se agregan.

Comparando los resultados para la RDF y el parámetro de orden para las drogas analizadas en el capítulo 4 con los resultados para el SF, se tiene que el SF induce un incremento en el parámetro de orden; mientras que en la RDF muestran un comportamiento similar aunque la razón principal para las drogas del capítulo 4 es asociada a las interacciones catión- π , esta interacción no puede ser ligada a las moléculas de SF debido a que no presentan un anillo de benceno en su estructura. De forma general considerando los resultados mostrados hasta este punto se infiere que, para las molé-

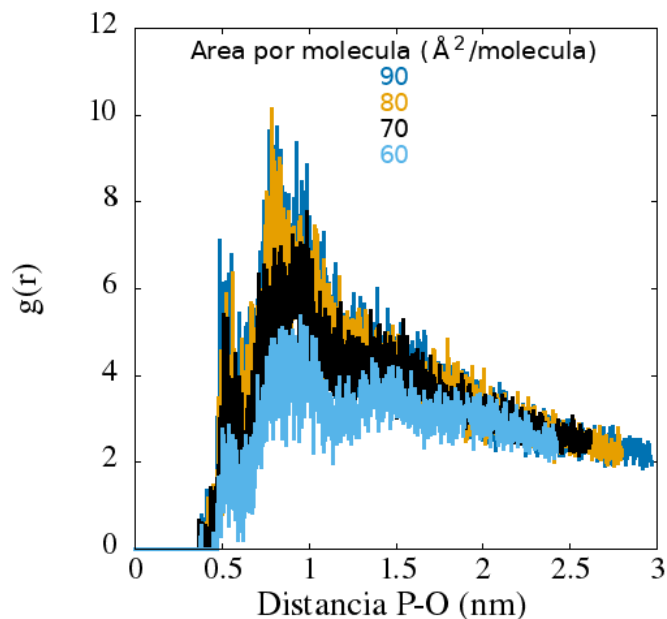


Figura 5.12: Valores de la RDF entre los átomos de oxígeno del SF en relación con los átomos de fósforo del DPPC a diferentes áreas por molécula.

culas pequeñas estudiadas en este trabajo, el fenómeno de alejarse de las cabezas de los lípidos así como agregarse entre sus similares en la fase LC, es fundamentalmente debido a dos razones: electrostáticas y estructurales (por la organización de los lípidos para fases condensadas).

Para terminar el análisis numérico del SF y la monocapa de DPPC, se utiliza el método US (al igual que en el capítulo 4) para encontrar las configuraciones energéticamente favorables del sevoflurano dentro de la membrana.

5.2.3. US

Siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección 3.1.4, se toma una molécula de SF situándose a una distancia aproximada de 1 nm por arriba de la membrana y se comienza con el empuje a través de la membrana. De ahí se toman ventanas de 0.2 nm de espaciamiento entre cada una para evolucionar en DM por 500 ps cada configuración.

Se tomó como membrana la configuración final de la membrana de DPPC previamente equilibrada a un área por molécula de $55 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, los resultados para el

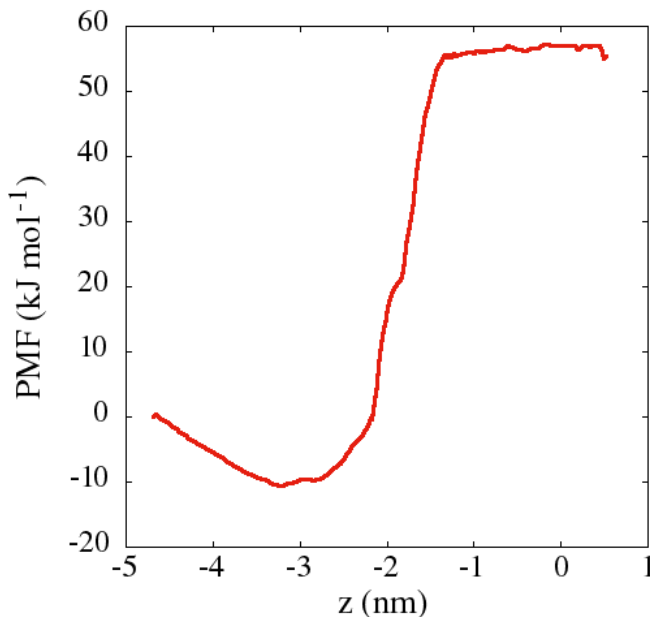


Figura 5.13: Valores del PMF obtenidos del método US para una molécula de SF a través de una monocapa de DPPC.

PMF para una molécula de SF se muestran en la Fig. 5.13.

El comportamiento que describe el PMF muestra un valle con un mínimo de potencial a un valor de ≈ -10 kJ/mol a una distancia de -3.8 nm, correspondiente a la zona donde se encuentran las colas de los lípidos (tal como se ve en la Fig. 4.14); seguido de comportamiento creciente hasta alcanzar un valor oscilante de 58 kJ/mol una vez que llega a la fase acuosa.

La barrera de potencial que se forma entre el SF y la fase acuosa tiene un valor aproximado de 68 kJ/mol por lo que el SF no puede alcanzar la fase acuosa espontáneamente una vez que se encuentra entre las colas de los lípidos. Sin embargo el mínimo de potencial obtenido entre las colas de los lípidos es pequeño en comparación a los alcanzados por el CBD, THC, morfina y lidocaína; esto sugiere que la droga prefiere situarse entre las colas de los lípidos, no obstante, mover la droga de los lípidos al vacío (fase gaseosa) requerirá un menor trabajo en comparación con las drogas antes mencionadas.

Los resultados del US predicen que las moléculas de SF son altamente dinámicas en la interfase gas-lípido debido a que el mínimo de potencial reportado es de

un valor pequeño; sin embargo hace falta más información para determinar si este comportamiento pueda ser atribuido al decremento del módulo de compresibilidad de las monocapas por el SF. No obstante, diferentes trabajos donde se estudian monocapas de diferentes composiciones interactuando con drogas (que tienen propiedades anestésicas [103], anticancerígenas [104] o antimicrobianas [105]) han reportado que la introducción de drogas a los sistemas lipídicos disminuyen el módulo de compresibilidad.

Capítulo 6

Conclusiones

En este trabajo, se realizaron una serie de diferentes aproximaciones atomísticas de simulaciones de dinámica molecular para estudiar las interacciones entre una monocapa de DPPC/DPPG en presencia de los dos componentes más abundantes presentes en la marihuana (THC y CBD), con dos fármacos anestésicos bien estudiados (morfina y lidocaína). En comparación con las monocapas lipídicas libres de fármacos, la disminución de la tensión superficial en los sistemas con presencia de fármacos conduce a sitios que presentan inestabilidades estructurales que provocan rupturas de membranas en menor área por molécula; trabajos anteriores reportaron este mismo comportamiento. Además, el perfil de densidad y el RDF nos dan información sobre el comportamiento de las moléculas del fármaco en la membrana, siendo una de las principales características que los fármacos permanecen en la región de colas de hidrocarburos lipídicas. La morfina fue la que mostró mayor cercanía a la interfase lipídica en relación a las demás drogas estudiadas, este suceso puede ser asociado a una mayor actividad por parte de la morfina.

Hasta donde se tiene conocimiento en esta investigación, esta es la primera vez que se informan cálculos de energía libre para CBD y THC utilizando métodos de dinámica molecular. Se obtuvieron valores de energía molar libre de 57 kJ/mol para CBD y 5 kJ/mol para THC. La resistencia que presentan los fármacos para atravesar la barrera de potencial monocapa, observada en el PFM, muestra que el comportamiento del CBD y el THC es similar al de la lidocaína debido a las barreras energéticas entre

el mínimo del potencial en las colas lipídicas; su valor en la fase acuosa da como resultado un valor positivo de energía libre. Además, la barrera potencial creada entre la energía mínima y máxima, alcanzada en la fase acuosa, sugiere que una vez que cualquiera de los fármacos CBD, THC o lidocaína interactúan con la membrana, son adsorbidos en la membrana incluso en el caso de una pequeña área molecular media ($55 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$).

También se desarrollaron experimentos y simulaciones donde se estudia los efectos que tiene el sevoflurano sobre una monocapa de DPPC. En los resultados reportados en este trabajo se aprecia en la tensión superficial que no es un parámetro adecuado para analizar este tipo de sistemas; debido a la poca variación apreciable por la introducción del sevoflurano, incluso a concentraciones elevadas. No obstante, en el módulo de compresibilidad se observan disminuciones considerables inducidas por la droga, así como un posible efecto subyacente en la interacción SF alcohol étílico. Lo que motiva a seguir estudiando este tipo de sistemas para obtener mayor información y a la postre fundamentar el mecanismo de acción y la efectos en las membranas por parte de las drogas con propiedades anestésicas, entendiendo la complejidad biológica en las interacciones entre organismos vivos y drogas que conlleva los sistemas en cuestión.

Bibliografía

- [1] Plini, Natural history, praefatio, libri i, ii, with and english translation, Harvard University Press, Volume I, First printing 1938.
- [2] B. Franklin and W. Brownrigg, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1774, 445–460.
- [3] R. J. Strutt, Proceedings of the Royal Society of London, 1890, **47**, 364–367.
- [4] W. Pfeffer, Osmotische untersuchungen: studien zur zellmechanik, W. Engelmann, 1921.
- [5] C. E. Overton, Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle, Fäsi & Beer, 1895.
- [6] A. Pockels, Nature, 1891, **43**, 437–439.
- [7] A. Pockels, Nature, 1892, **46**, 418–419.
- [8] A. Pockels, Nature, 1893, **48**, 152–154.
- [9] I. Langmuir, Journal of the American chemical society, 1916, **38**, 2221–2295.
- [10] I. Langmuir, Journal of the American chemical society, 1917, **39**, 1848–1906.
- [11] S. J. Singer and G. L. Nicolson, Science, 1972, **175**, 720–731.
- [12] W. Almers and C. Stirling, The Journal of membrane biology, 1984, **77**, 169–186.

- [13] M. A. Yildirim, K.-I. Goh, M. E. Cusick, A.-L. Barabási and M. Vidal, Nature biotechnology, 2007, **25**, 1119–1126.
- [14] P. Cohen, Nature reviews Drug discovery, 2002, **1**, 309–315.
- [15] P. V. Escribá, J. M. González-Ros, F. M. Goñi, P. K. Kinnunen, L. Vigh, L. Sánchez-Magraner, A. M. Fernández, X. Busquets, I. Horváth and G. Barceló-Coblijn, Journal of cellular and molecular medicine, 2008, **12**, 829–875.
- [16] W. Dowhan *et al.*, Annual review of biochemistry, 1997, **66**, 199–232.
- [17] E. L. Abel, Marihuana: the first twelve thousand years, Springer Science & Business Media, 2013.
- [18] V. Di Marzo, Trends in pharmacological sciences, 2006, **27**, 134–140.
- [19] T. B. Wood, W. N. Spivey and T. H. Easterfield, Journal of the Chemical Society, Transactions, 1899, **75**, 20–36.
- [20] A. Jacob and A. Todd, Journal of the Chemical Society (Resumed), 1940, 649–653.
- [21] M. Quiroga, Adicciones, 2000, **12**, 117–133.
- [22] H. V. Curran, C. Hindocha, C. J. Morgan, N. Shaban, R. K. Das and T. P. Freeman, Psychological medicine, 2019, **49**, 1574–1580.
- [23] H. Meng, T. Dai, J. G. Hanlon, J. Downar, S. M. Alibhai and H. Clarke, Current Opinion in Supportive and Palliative Care, 2020, **14**, 87–93.
- [24] J. Ahrens, R. Demir, M. Leuwer, J. De La Roche, K. Krampfl, N. Foadi, M. Karst and G. Haeseler, Pharmacology, 2009, **83**, 217–222.
- [25] D. G. Boychuk, G. Goddard, G. Mauro and M. F. Orellana, J oral facial pain headache, 2015, **29**, 7–14.
- [26] A. Aran, H. Cassuto, A. Lubotzky, N. Wattad and E. Hazan, Journal of Autism and Developmental Disorders, 2019, **49**, 1284–1288.

- [27] C. Carroll, P. Bain, L. Teare, X. Liu, C. Joint, C. Wroath, S. Parkin, P. Fox, D. Wright, J. Hobart et al., Neurology, 2004, **63**, 1245–1250.
- [28] M. W. Elmes, M. Kaczocha, W. T. Berger, K. Leung, B. P. Ralph, L. Wang, J. M. Sweeney, J. T. Miyauchi, S. E. Tsirka, I. Ojima et al., Journal of Biological Chemistry, 2015, **290**, 8711–8721.
- [29] P. Morales, D. P. Hurst and P. H. Reggio, Phytocannabinoids, 2017, 103–131.
- [30] Y.-m. Bian, X.-b. He, Y.-k. Jing, L.-r. Wang, J.-m. Wang and X.-Q. Xie, Acta Pharmacologica Sinica, 2019, **40**, 374–386.
- [31] W. Kopeć, J. Telenius and H. Khandelia, The FEBS journal, 2013, **280**, 2785–2805.
- [32] J. A. Campagna, K. W. Miller and S. A. Forman, New England Journal of Medicine, 2003, **348**, 2110–2124.
- [33] M. J. Arcario, C. G. Mayne and E. Tajkhorshid, Journal of Biological Chemistry, 2017, **292**, 9480–9492.
- [34] S. M. Saad, Z. Policova, E. J. Acosta, M. L. Hair and A. W. Neumann, Langmuir, 2009, **25**, 10907–10912.
- [35] A. K. Sachan, R. K. Harishchandra, C. Bantz, M. Maskos, R. Reichelt and H.-J. Galla, ACS nano, 2012, **6**, 1677–1687.
- [36] J. Hu, H. Liu, P. Xu, Y. Shang and H. Liu, Langmuir, 2019, **35**, 13452–13460.
- [37] F. Michel and J.-M. Constantin, Expert opinion on pharmacotherapy, 2009, **10**, 861–873.
- [38] J. Torres García and S. Durán Agüero, Nutricion hospitalaria, 2015, **31**, 76–83.
- [39] J. N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces (With Applications to Colloidal and Biological Systems). Academic Press, London, Orlando, San

- Diego, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo 1985. 296 Seiten, Preis: 65.00., 1986.
- [40] R. G. Jones, I. U. of Pure, A. C. P. Division and E. S. Wilks, Compendium of polymer terminology and nomenclature: IUPAC recommendations, 2008, RSC Pub., 2009.
- [41] D. Langevin, Emulsions, microemulsions and foams, Springer, 2020.
- [42] X. Domènech and J. Peral, Química ambiental de sistemas terrestres, Reverté, 2006.
- [43] W. Greiner, L. Neise and H. Stöcker, Thermodynamics and statistical mechanics, Springer Science & Business Media, 2012.
- [44] L. D. Landau and E. M. Lifshits, Fluid mechanics, by LD Landau and EM Lifshitz, Pergamon Press Oxford, UK, 1959, vol. 11.
- [45] L. Kramer, The Journal of Chemical Physics, 1971, **55**, 2097–2105.
- [46] V. G. Levich, Englewoods Cliffs, 1962.
- [47] N. Pallas and B. Pethica, Langmuir, 1985, **1**, 509–513.
- [48] M. Lösche, E. Sackmann and H. Möhwald, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 1983, **87**, 848–852.
- [49] H. Bekker, H. Berendsen, E. Dijkstra, S. Achterop, R. Vondrumen, D. VANDERSPOEL, A. Sijbers, H. Keegstra and M. Renardus, 4th International Conference on Computational Physics (PC 92), 1993, pp. 252–256.
- [50] A. Villa and A. E. Mark, Journal of computational chemistry, 2002, **23**, 548–553.
- [51] T. J. Barth, M. Griebel, D. E. Keyes, R. M. Nieminen, D. Roose and T. Schlick, Texts in Computational Science and Engineering, Springer, 2003.

- [52] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov *et al.*, Journal of computational chemistry, 2010, **31**, 671–690.
- [53] M. Pinches, D. Tildesley and W. Smith, Molecular Simulation, 1991, **6**, 51–87.
- [54] W. F. Van Gunsteren and H. J. Berendsen, Molecular Simulation, 1988, **1**, 173–185.
- [55] H. Grubmüller, H. Heller, A. Windemuth and K. Schulten, Molecular Simulation, 1991, **6**, 121–142.
- [56] R. A. Lippert, C. Predescu, D. J. Ierardi, K. M. Mackenzie, M. P. Eastwood, R. O. Dror and D. E. Shaw, The Journal of chemical physics, 2013, **139**, 10B621_1.
- [57] B. Hess, Journal of chemical theory and computation, 2008, **4**, 116–122.
- [58] P. H. Hünenberger, Advanced computer simulation, 2005, 105–149.
- [59] A. Lemak and N. Balabaev, Molecular Simulation, 1994, **13**, 177–187.
- [60] M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess and E. Lindahl, SoftwareX, 2015, **1**, 19–25.
- [61] W. G. Hoover, Physical review A, 1985, **31**, 1695.
- [62] R. Martoňák, A. Laio and M. Parrinello, Physical review letters, 2003, **90**, 075503.
- [63] J. G. Kirkwood and F. P. Buff, The Journal of chemical physics, 1951, **19**, 774–777.
- [64] B. G. Levine, J. E. Stone and A. Kohlmeier, Journal of computational physics, 2011, **230**, 3556–3569.
- [65] H. Martinez-Seara and T. Rog, in Biomolecular Simulations, Springer, 2013, pp. 407–429.

- [66] L. S. Vermeer, B. L. De Groot, V. Réat, A. Milon and J. Czaplicki, European Biophysics Journal, 2007, **36**, 919–931.
- [67] G. Patey and J. Valleau, Chemical Physics Letters, 1973, **21**, 297–300.
- [68] J. A. Lemkul and D. R. Bevan, The Journal of Physical Chemistry B, 2010, **114**, 1652–1660.
- [69] J. V. N. Ferreira, T. M. Capello, L. J. Siqueira, J. H. G. Lago and L. Caseli, Langmuir, 2016, **32**, 3234–3241.
- [70] M. Sprik and G. Ciccotti, The Journal of chemical physics, 1998, **109**, 7737–7744.
- [71] J. S. Hub, B. L. De Groot and D. Van Der Spoel, Journal of chemical theory and computation, 2010, **6**, 3713–3720.
- [72] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman and D. A. Case, Journal of computational chemistry, 2004, **25**, 1157–1174.
- [73] C. Oostenbrink, T. A. Soares, N. F. Van der Vegt and W. F. Van Gunsteren, European Biophysics Journal, 2005, **34**, 273–284.
- [74] G. A. Kaminski, R. A. Friesner, J. Tirado-Rives and W. L. Jorgensen, The Journal of Physical Chemistry B, 2001, **105**, 6474–6487.
- [75] P. Mark and L. Nilsson, The Journal of Physical Chemistry A, 2001, **105**, 9954–9960.
- [76] P. D. Bank, Nature New Biol, 1971, **233**, 223.
- [77] S. Jo, J. B. Lim, J. B. Klauda and W. Im, Biophysical journal, 2009, **97**, 50–58.
- [78] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee and L. G. Pedersen, The Journal of chemical physics, 1995, **103**, 8577–8593.

- [79] S. Kim, J. Lee, S. Jo, C. L. Brooks III, H. S. Lee and W. Im, CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules, 2017.
- [80] J. A. Lemkul and D. R. Bevan, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008, **470**, 54–63.
- [81] M. Iwahashi, N. Maehara, Y. Kaneko, T. Seimiya, S. R. Middleton, N. R. Pallas and B. A. Pethica, Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases, 1985, **81**, 973–981.
- [82] M. C. Petty, Langmuir-Blodgett Films, 1996.
- [83] L. Wilhelmy, Ann. Phys. Chem. Leipzig, 1863, **119**, 177.
- [84] B. Rapp, Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics; Elsevier BV: Cambridge, MA, USA, 2017, 453–465.
- [85] C. Tempira, O. Ollila and M. Javanainen, Journal of chemical theory and computation, 2022, **3**, 1862–1869.
- [86] T. Broemstrup and N. Reuter, Biophysical journal, 2010, **99**, 825–833.
- [87] C. Vega, J. L. Abascal, M. M. Conde and J. L. Aragones, Faraday discussions, 2009, **141**, 251–276.
- [88] J. Hu, X. Li, M. Li, Y. Shang, Y. He and H. Liu, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, **190**, 110922.
- [89] A. Olżyńska, M. Zubek, M. Roeselova, J. Korchowiec and L. Cwiklik, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2016, **1858**, 3120–3130.
- [90] D. A. Dougherty, Accounts of chemical research, 2013, **46**, 885–893.
- [91] C.-J. Högberg and A. P. Lyubartsev, Biophysical journal, 2008, **94**, 525–531.
- [92] J. P. Gallivan and D. A. Dougherty, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, **96**, 9459–9464.

- [93] D. E. Braun, T. Gelbrich, V. Kahlenberg and U. J. Griesser, Molecular pharmaceutics, 2014, **11**, 3145–3163.
- [94] M. Paloncýóová, R. DeVane, B. Murch, K. Berka and M. Otyepka, The Journal of Physical Chemistry B, 2014, **118**, 1030–1039.
- [95] I. Shehatta, International journal of research in physical chemistry and chemical physics, 2002, 1005.
- [96] M. Saeedi, A. P. Lyubartsev and S. Jalili, Biophysical Chemistry, 2017, **226**, 1–13.
- [97] X. Liu, J. Dingley, M. Elstad, E. SCULL-BROWN, P. Steen and M. Thoresen, Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 2013, **57**, 646–653.
- [98] R. Sha, Q. Meng and L. Jiang, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2012, **87**, 368–373.
- [99] X. Yu, N. Jiang, X. Miao, R. Zong, Y. Sheng, C. Li and S. Lu, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2020, **591**, 124545.
- [100] J. Müller, W. Plöchl, P. Mühlbacher, A. Graf, A.-M. Kramer, B. K. Podesser, T. Stimpfl and T. Hamp, Scientific Reports, 2022, **12**, 1–7.
- [101] N. Tanaka, Y. Saito, Y. Hikawa, K. Nakazawa, K. Yasuda and K. Amaha, Masui. The Japanese Journal of Anesthesiology, 1997, **46**, 1575–1579.
- [102] S. Gibert, N. Sabourdin, N. Louvet, M.-L. Moutard, V. Piat, M.-L. Guye, A. Rigouzzo and I. Constant, The Journal of the American Society of Anesthesiologists, 2012, **117**, 1253–1261.
- [103] J. Mildner, A. Wnętrzak and P. Dynarowicz-Latka, The Journal of membrane biology, 2019, **252**, 31–39.
- [104] A. Casadó, M. C. Giuffrida, M. L. Sagristá, F. Castelli, M. Pujol, M. A. Alsina and M. Mora, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2016, **1858**, 422–433.

- [105] S. W. Nowotarska, K. J. Nowotarski, M. Friedman and C. Situ, Molecules, 2014, **19**, 7497–7515.
- [106] S. L. Duncan and R. G. Larson, Biophysical journal, 2008, **94**, 2965–2986.

Índice de figuras

1.1. Esquema del modelo de membrana celular como un mosaico fluido donde los lípidos componen una matriz y las proteínas están inmersas en la matriz. Imagen adaptada de [11].	4
1.2. Estructura atómica de las moléculas utilizadas en este trabajo. Los átomos en color rojo (drogas) y azul (lípidos) serán utilizados en secciones posteriores para realizar el cálculo de la función de distribución radial entre las drogas y los lípidos.	7
2.1. Estructuras moleculares de los lípidos más abundantes en la naturaleza.	12
2.2. Ejemplo de la nomenclatura X:Y para los ácidos grasos 4:0 conocido como ácido butírico y 16:1 conocido como ácido palmitoleico.	13
2.3. Ilustración de las diferentes estructuras que pueden obtenerse del agrupamiento de los lípidos dispersos en un medio. Imagen realizada con base en [39].	14
2.4. Esquema de la interfase para sistemas líquido-líquido (agua-aceite) y líquido-gas (agua-vapor).	16
2.5. Balance de las fuerzas para moléculas de agua al interior del líquido (molécula naranja) y en la capa de la superficie (molécula verde). Imagen recreada a partir del libro [39].	17
2.6. Estiramiento dx de una película de un líquido con un alambre de longitud l mediante una fuerza de magnitud f . Esquema realizado a partir de los esquemas mostrados en el libro [41].	18
2.7. Esquema de una monocapa en la palangana de Langmuir.	22

2.8.	Ilustración de una isoterma para una monocapa de DPPC, así como una representación del ordenamiento de los lípidos en las diferentes fases de la monocapa: gaseosa (G), líquido expandido (LE), líquido condensado (LC) y sólido. Adaptación de [41].	23
2.9.	Diagrama de la determinación para la energía libre de solvatación. Este diagrama se realizó basándose en el esquema reportado en [49].	25
3.1.	Ilustración de la descomposición del dominio en celdas como parte del método de celda ligada, remarcando el radio de corte para una molécula y las celdas en las cuales se realizará la búsqueda de las moléculas más cercanas. Imagen obtenida del libro citado en [51].	29
3.2.	Esquema de la división del dominio de la simulación por medio de esferas de ancho $r + dr$ para el cálculo de la RDF.	32
3.3.	Esquema del empuje de una droga a través de una membrana por medio de una fuerza derivada del potencial armónico (Ec. 3.20) entre la droga y una partícula virtual (<i>dummy</i>), desde una configuración inicial (izquierda) hasta una final (derecha). Cada color en el esquema representa un tipo molécula: los lípidos son rojos, la droga es de color negro, el agua es azul y la partícula <i>dummy</i> es gris.	43
3.4.	Montaje de la palangana de Langmuir, donde se numeran los componentes para realizar los experimentos: (1) recipiente de teflón, (2) barreras de teflón, (3) rodillo de Du Noüy–Padday, (4) tensiómetro, (5) termopar y (6) conexión del recirculador.	45
3.5.	Arriba: Foto de una microjeringa de 5 μL de la marca Hamilton. Abajo: Representación esquemática de la deposición de los lípidos en la interfase aire-agua.	46
3.6.	Diagrama esquemático del método de la placa de Wilhelmy.	47
3.7.	Medición de la presión superficial del agua con y sin impurezas en la palangana de Langmuir.	51

3.8. Medición de la temperatura por medio del termopar para los sistemas de agua ultrapura con y sin impurezas en la palangana de Langmuir.	52
3.9. Esquema de la deposición del sevoflurano en la subfase.	53
4.1. Configuración inicial de las membranas monocapas de DPPC a un área promedio por molécula de 55 (izquierda) y 90 (derecha) Å ² /molécula.	57
4.2. Minimización de la energía potencial de un sistema bajo un algoritmo de descenso de gradiente; este proceso se repite para todos los sistemas, obteniendo el mismo comportamiento debido a los tamaños pequeños de los sistemas.	58
4.3. Resultado de los primeros 120 ps del proceso de equilibrio de temperatura bajo el ensamble NVT, N γ T y NPT.	59
4.4. Componente <i>zz</i> del tensor de presión en el último ns del proceso de equilibrio para los sistemas NVT, N γ T y NPT.	59
4.5. Gráficas de la minimización de energía para los sistemas libres de droga a diferentes área por molécula (imagen superior), así como la temperatura en el proceso de equilibrio (imagen inferior) donde la línea amarilla representa la 293.15 K.	63
4.6. Comparación entre los resultados de una membrana DPPC/DPPG presentado en el trabajo desarrollado por Hu en 2019 [36] y los resultados de los sistemas descritos en este trabajo.	64
4.7. Relación entre las energías de la membrana de DPPC/DPPG pura y con la presencia de las drogas en la interfase durante el proceso de minimización de energía.	66
4.8. Configuración final de los sistemas membrana-drogas.	67
4.9. Variaciones de la tensión superficial de la membrana DPPC/DPPG en relación a la concentración superficial (Γ) debido a la introducción de las drogas a la interfase.	68

- 4.10. Perfil de densidades para las drogas variando las áreas moleculares entre 55 (círculos negros), 63 (cuadrados verdes), 75 (triángulos azules) y 90 (triángulos invertidos rojos) \AA^2 /molécula, la línea color azul cielo es el perfil de densidad del agua. 70
- 4.11. Función de distribución radial del oxígeno de la morfina, lidocaína, CBD y THC en relación con el grupo fosfato de los lípidos en diferentes áreas moleculares medias: 55 (negro), 62,3 (verde), 75 (azul) y 90 (rojo) \AA^2 /molécula. Los recuadros muestran un corte lateral de la configuración final de los sistemas, en el que observamos la relación entre la RDF_{O-P} y el posicionamiento de las drogas en relación con la interfase lípido-agua. 71
- 4.12. Función de distribución radial de los átomos de oxígeno de la morfina, lidocaína, CBD y THC en relación con las drogas del mismo tipo en diferentes áreas moleculares: 55 (negro), 62,3 (verde), 75 (azul) y 90 (rojo) \AA^2 /molécula). Los recuadros muestran la configuración de equilibrio de los sistemas, visto desde la parte superior del cuadro de simulación, estos cuadros muestran cómo se organizan las drogas, la estructura de las drogas en forma de *cluster* corresponde a una fase lipídica compacta en áreas moleculares bajas. 72
- 4.13. Parámetro de orden para los lípidos DPPC (a) y DPPG (b), en relación al número de átomo de carbono en la cadena de los lípidos donde 1 corresponde al átomo de carbono más próximo a la cabeza; se muestran los sistemas con un área molecular de 90\AA^2 /molécula (superior) y 55\AA^2 /molécula (inferior). 74
- 4.14. Potencial de fuerza media de una sola molécula de morfina, lidocaína, CBD y THC a través de la monocapa de DPPC/DPPG en un área de por molécula de 55\AA^2 /molécula. El vacío está representado en el área blanca, la región ocupada por lípidos con la cola apuntando hacia el vacío en color gris, y el agua es el área en azul. 75

5.1. Isoterma de dos monocapas de DPPC: (negro) subfase agua ultrapura y (rojo) subfase de agua ultrapura con 10 μL de alcohol etílico de alta pureza.	81
5.2. Módulo de compresibilidad para las monocapas de DPPC derivado numéricamente de la Fig. 5.1 mediante la ec. 2.17: (negro) subfase agua ultrapura y (rojo) subfase de agua ultrapura con 10 μL de alcohol etílico de alta pureza.	81
5.3. Imagen del experimento montado para la introducción de las moléculas de droga en la subfase. En comparación con la Fig. 2.7, se añade una microjeringa de 10 μL (1) para depositar las diferentes concentraciones mencionadas en la tabla 5.1.	82
5.4. Isotermas para monocapas de DPPC bajo las diferentes concentraciones mencionadas en la tabla 5.1, clasificadas por la cantidad de volumen depositado de las disoluciones de SF: 5 μL (arriba) y 10 μL (abajo).	84
5.5. Módulos de compresibilidad para los sistemas descritos en la tabla 5.1, clasificadas por la cantidad de volumen depositado de las disoluciones de SF: 5 μL (arriba) y 10 μL (abajo).	85
5.6. Isotermas y módulos de compresibilidad para diferentes concentraciones de SF sin diluir en alcohol etílico en la subfase.	86
5.7. Módulos de compresibilidad en relación a la concentración en la subfase de SF manteniendo una presión superficial como referencia; la imagen superior son los resultados correspondientes a SF disuelto con alcohol etílico y la inferior es SF puro depositado en la subfase.	87
5.8. Valores de la tensión superficial obtenido de la DM bajo condiciones NVT para una monocapa de DPPC (negro) y DPPC con sevoflurano (rojo), al variar el área por molécula.	89
5.9. Configuración final de los sistemas a un área por molécula de 90 (arriba), 70 (en medio) y 60 (abajo) Å^2 /molécula vistos desde una perspectiva lateral (izquierda) y desde arriba (derecha).	91

5.10. Valores del parámetro de orden de los átomos de carbón en las colas de los lípidos para la monocapa de DPPC pura (superior) y en presencia de SF (inferior).	92
5.11. Valores de la RDF entre los átomos de oxígeno del SF en relación con ellos mismos a diferentes áreas por molécula.	93
5.12. Valores de la RDF entre los átomos de oxígeno del SF en relación con los átomos de fósforo del DPPC a diferentes áreas por molécula.	94
5.13. Valores del PMF obtenidos del método US para una molécula de SF a través de una monocapa de DPPC.	95
A.1. Función de distribución radial entre los átomos de nitrógeno de DPPC respecto a ellos mismos en una membrana pura de DPPC a diferentes áreas por molécula.	119
A.2. Función de distribución radial entre los átomos de fósforo de DPPC respecto a ellos mismos en una membrana pura de DPPC a diferentes áreas por molécula.	119
A.3. Parámetro de orden entre los átomos de carbonos en la cola del DPPC para la membrana pura de DPPC a diferentes áreas por molécula.	120

Apéndice A

Anexo

A.1. Anexo A: Discretización de las ecuaciones DM

En un dominio Ω donde se desarrollará la dinámica descrita por las ecuaciones de Hamilton clásicas:

$$H(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{p}_N) = \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} + V(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N) \quad (\text{A.1})$$
$$\dot{\mathbf{x}}_i = \nabla_{\mathbf{p}_i} H, \quad \dot{\mathbf{p}}_i = -\nabla_{\mathbf{x}_i} H, \quad i = 1, \dots, N,$$

dentro de un intervalo temporal $[0, t_f] \subset T$ y considerando un potencial conservativo ($V = V(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots)$), podemos derivar directamente las ecuaciones de Newton, con $\mathbf{p}_i = m\mathbf{v}_i$:

$$\dot{\mathbf{x}}_i = \mathbf{v}_i, \quad m_i \dot{\mathbf{v}}_i = \mathbf{F}_i, \quad (\text{A.2})$$

o equivalentemente:

$$m_i \ddot{\mathbf{x}}_i = \mathbf{F}_i, \quad (\text{A.3})$$

donde \mathbf{F}_i depende únicamente de las coordenadas de i , así se obtiene la siguiente ecuación:

$$m_i \ddot{\mathbf{x}}_i = -\nabla_{\mathbf{x}_i} V(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots), \quad (\text{A.4})$$

por lo tanto, si son proporcionadas las posiciones y velocidades iniciales de las partículas involucradas en cada sistema, la evolución temporal del mismo será únicamente dependiente del potencial de interacción entre las partículas.

Considérese ahora la energía cinética del sistema como:

$$E_{kin} = \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} = \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2}{2}, \quad (\text{A.5})$$

entonces la energía total del sistema ($E = E_{kin} + V$), se conserva por completitud de un sistema conservativo, por lo que la energía total del sistema es una constante de movimiento.

Definase ahora δt como una división del intervalo temporal $[0, t_f]$ en l partes iguales, $\delta t := t_{fin}/l$, así mismo se propone $t_n = n * \delta t$, $n = 1, \dots, l$. De acuerdo con la definición de la derivada

$$\frac{dx}{dt} := \lim_{\delta t \rightarrow 0} \frac{x(t + \delta t) - x(t)}{\delta t} \quad (\text{A.6})$$

para una función $x : \Re \rightarrow \Re$, el operador diferencial puede aproximarse para un punto temporal discreto t_n como el operador:

$$\left[\frac{dx}{dt} \right]_n^d := \frac{x(t_{n+1}) - x(t_n)}{\delta t} \quad (\text{A.7})$$

donde se omite el límite. Aquí el t_{n+1} es el vecino en la malla temporal de t_n , de acuerdo a la expansión en Taylor tenemos que:

$$x(t + \delta t) := x(t) + \delta t \frac{dx}{dt}(t_n) + O(\delta t^2) \quad (\text{A.8})$$

véase que el orden de error corresponde a $O(\delta t^2)$. Alternativamente, se puede aproximar el operador derivada en un punto t_n por el operador derivada central:

$$\left[\frac{dx}{dt} \right]_n^c := \frac{x(t_{n+1}) - x(t_{n-1})}{2\delta t} \quad (\text{A.9})$$

utilizando esta segunda definición de la derivada obtenemos un orden cuadrático en el error de la aproximación de la derivada de primer orden.

Para calcular la derivada de segundo orden se utiliza el operador:

$$\left[\frac{d^2 x}{dt^2} \right]_n := \frac{1}{\delta t^2} (x(t_n + \delta t) - 2x(t_n) + x(t_n - \delta t)) \quad (\text{A.10})$$

desarrollando en serie de Taylor alrededor de $t_n + \delta t$ y $t_n - \delta t$ se obtiene:

$$\begin{aligned} x(t_n + \delta t) &= x(t_n) + \delta t \frac{dx(t_n)}{dt} + \frac{1}{2} \delta t^2 \frac{d^2 x(t_n)}{dt^2} + \frac{1}{6} \delta t^3 \frac{d^3 x(t_n)}{dt^3} + O(\delta t^4) \\ x(t_n - \delta t) &= x(t_n) - \delta t \frac{dx(t_n)}{dt} + \frac{1}{2} \delta t^2 \frac{d^2 x(t_n)}{dt^2} - \frac{1}{6} \delta t^3 \frac{d^3 x(t_n)}{dt^3} + O(\delta t^4) \end{aligned} \quad (\text{A.11})$$

sustituyendo la ec. A.11 en ec. A.10 resulta:

$$\left[\frac{d^2 x}{dt^2} \right]_n = \frac{d^2 x}{dt^2} + O(\delta t^2) \quad (\text{A.12})$$

con un orden cuadrático en el error.

De esta manera, se puede discretizar las ecuaciones de movimiento derivadas de la segunda Ley de Newton como:

$$m_i \mathbf{a}_i^n = m_i \frac{1}{\delta t^2} (\mathbf{x}_i^{n+1} - 2\mathbf{x}_i^n + \mathbf{x}_i^{n-1}) = \mathbf{F}_i^n \quad (\text{A.13})$$

despejando \mathbf{x}_i^{n+1} se llega al cálculo de la posición en el paso $n + 1$ en relación a sus dos posiciones previas (n y $n - 1$) y a la fuerza neta actuando sobre una partícula i :

$$\mathbf{x}_i^{n+1} = 2\mathbf{x}_i^n - \mathbf{x}_i^{n-1} + \frac{\delta t^2}{m_i} \mathbf{F}_i^n, \quad (\text{A.14})$$

este método es conocido como integrador de Störmer-Verlet. Una ligera variación de este método deriva en el algoritmo conocido como leapfrog, para el cual tómesese la velocidad definida mediante el teorema de la derivada central como:

$$\mathbf{v}_i^n = \frac{\mathbf{x}_i^{n+1} - \mathbf{x}_i^{n-1}}{2\delta t}. \quad (\text{A.15})$$

Si se evalúa la velocidad en lapsos de tiempo de $\delta t/2$, se puede calcular la velocidad $\mathbf{v}^{n+1/2}$ respecto a las velocidades al tiempo $t - \delta t/2$ mediante la ecuación:

$$\mathbf{v}_i^{n+1/2} = \mathbf{v}_i^{n-1/2} + \frac{\delta t}{m_i} \mathbf{F}_i^n. \quad (\text{A.16})$$

De esta manera, la evolución temporal para la discretización de la posición de una partícula i es mediante la ecuación:

$$\mathbf{x}_i^{n+1} = \mathbf{x}_i^n + \delta t \mathbf{v}_i^{n+1/2}, \quad (\text{A.17})$$

donde la principal diferencia entre el modelo de Störmer-Verlet y el de leapfrog es que en este último la velocidad está involucrada directamente en la ecuación que gobierna la dinámica; por ello, la implementación de los termostatos y barostatos es más simple, considerando que estos algoritmos dan una razón de cambio en la velocidad para mantener la temperatura o presión constante.

A.2. Anexo B: Resultados numéricos de la membrana de DPPC

En este anexo se muestran los resultados del análisis de propiedades estructurales para una membrana de DPPC pura que son útiles como referencia para validar las simulaciones comparándose con trabajos anteriores [31, 85, 89, 106]. Se muestran los resultados de la función de distribución radial para los átomos de nitrógeno y fósforo en relación con ellos mismos en las figuras A.1 y A.2, respectivamente; los comportamientos de las RDF son consistentes con los reportados en las simulaciones citadas.

La Fig. A.3 ilustra el comportamiento del parámetro de orden para los carbonos de la cola del DPPC a medida que se varía el área disponible por moléculas, este comportamiento es característico cuando hay distintas fases en estudio. Se tiene la fase de líquido expandido para áreas por molécula iguales o mayores a $70 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$

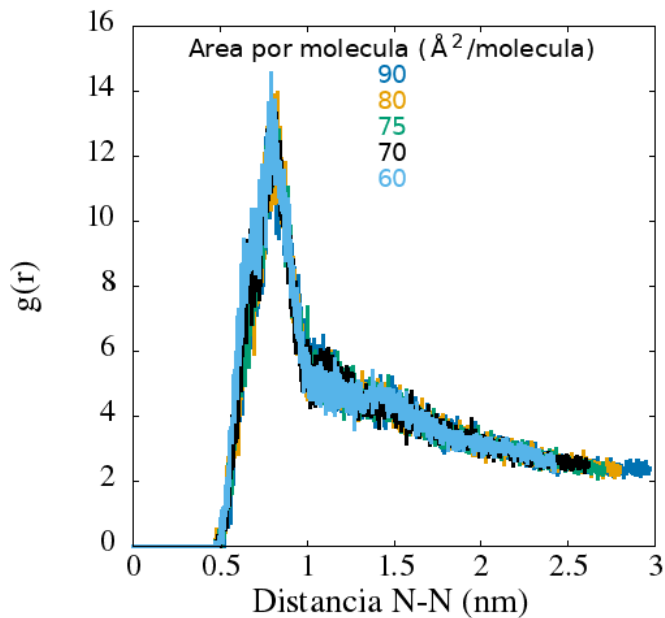


Figura A.1: Función de distribución radial entre los átomos de nitrógeno de DPPC respecto a ellos mismos en una membrana pura de DPPC a diferentes áreas por molécula.

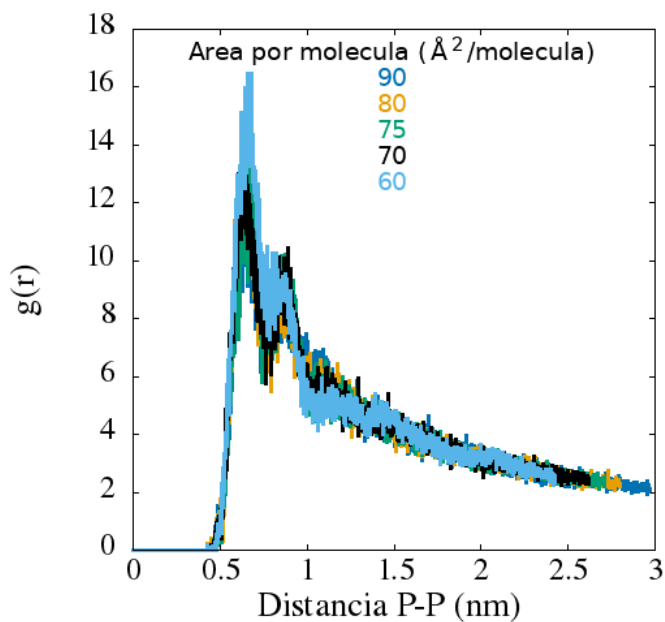


Figura A.2: Función de distribución radial entre los átomos de fósforo de DPPC respecto a ellos mismos en una membrana pura de DPPC a diferentes áreas por molécula.

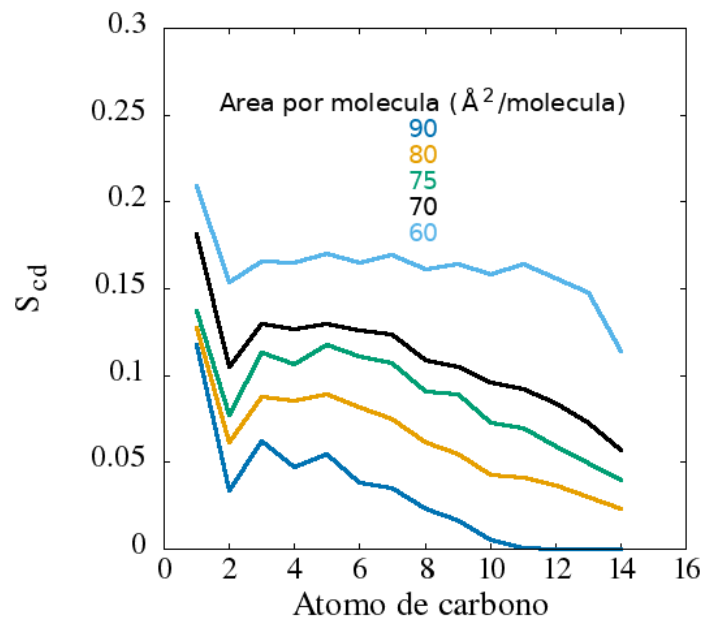


Figura A.3: Parámetro de orden entre los átomos de carbonos en la cola del DPPC para la membrana pura de DPPC a diferentes áreas por molécula.

y líquido condensado para $60 \text{\AA}^2/\text{molécula}$.