



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

*Estudio Computacional de la Asociación de
Ácido Ferúlico con Ciclodextrinas*

Tesis que presenta

I.B.I. José Luis Prado Arroyo

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Química

Asesor

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Co-Asesor

Dr. José Antonio Moreno Razo

J Antonio Moreno

Jurado calificador :

Presidente:

Dr. Gerardo Pérez Hernández

Secretaria:

Dra. Alberta Jaqueline Padilla Zúñiga

Vocal:

Dr. Eduardo Villarreal Ramírez

México, Mayo de 2018



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00080

Matrícula: 2161801272

ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA ASOCIACIÓN DE ÁCIDO FERÚLICO CON CICLODEXTRINAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 8 del mes de mayo del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GERARDO PEREZ HERNANDEZ
DR. EDUARDO VILLARREAL RAMIREZ
DRA. ALBERTA JAQUELINE PADILLA ZUÑIGA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: JOSE LUIS PRADO ARROYO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JOSE LUIS PRADO ARROYO
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. GERARDO PEREZ HERNANDEZ

VOCAL

DR. EDUARDO VILLARREAL RAMIREZ

SECRETARIA

DRA. ALBERTA JAQUELINE PADILLA ZUÑIGA

Agradecimientos

A dios por la familia que se encuentra a mi lado, porque sin su cariño y sus matices de personalidad, yo no sería la persona que soy ahora.

A mis padres por darme la vida. Por todos esos años de desvelos que hasta el día de hoy siguen. Por preocuparse porque siempre me encuentre bien, así como su cariño infinito en todo momento. Porqué hemos sido primero nosotros (sus hijos) antes que ellos y de manera involuntaria me han inculcado valores que siempre me acompañaran el resto de mi vida, ya que no existe mejor herencia.

A mis hermanas Araceli y Perla, por su cariño incondicional y comprensión; en particular a tí Araceli, ya que en muchos momentos de mi vida haz tomado el papel de madre.

A mis sobrinos Edson y Jorge, por el cariño y respeto que me tienen, y espero poder trasmitirles algo.

A mis amigos (Ana, Aurora, Lizet, Natalia, entre otros.), ya que durante ésta etapa de mi vida nunca me dejaron desistir y en cada oportunidad que se presentaba me recordaban lo que estaba realizando y logrando.

Al Dr. José Antonio Moreno Razo por abrirme las puertas del área de física de líquidos hace casi 7 años, por guiarme en todo este tiempo que llevamos trabajando, donde a parte de transmitir en alguna medida parte de sus conocimientos se han compartido vivencias tanto profesionales como personales, así como también un ambiente de tolerancia, comprensión y respeto; y más que un asesor es un amigo.

Al Dr. Rafael A. Zubillaga Luna, porque sin conocerme me acepto en este proyecto, así como su tolerancia, paciencia, comprensión y apoyo, ya que la versión que conocio de mi al principio, no era la que hubiera querido que conociera.

Al Dr. J. Enrique Díaz Herrera, porque durante todo este tiempo de conocerlo me ha brindado su apoyo, paciencia, amistad y siempre ha tenido un tiempo para

discutir y compartir experiencias tanto personales como profesionales.

A CONACyT por el apoyo económico otorgado para poder realizar mis estudios.

A LSyVP de la UAM-I por el apoyo otorgado de su infraestructura para realizar parte de este trabajo, así como también a Miztli de la UNAM por medio del proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-344 para poder realizar la otra parte de este trabajo.

Finalmente a todas esas personas que en ésta etapa de mi vida conocí y se quedaron como amigos; algunas que solo estuvieron de paso y otras que se alejaron al inicio de este viaje, ya que me hicieron recordar que este proyecto era uno de mis sueños.

Mil gracias a todos y cada uno de ustedes.

Índice general

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Ciclodextrinas	4
2.2. Aplicaciones de las CDs	7
2.3. Ácido Ferúlico	9
2.4. Aplicaciones del Ác. Ferúlico	14
2.5. Complejo CDs-Ácido Ferúlico	17
3. Objetivo General	19
4. Metodología	21
4.1. Dinámica Molecular	21
4.1.1. Integrador de Verlet	23
4.1.2. Contribuciones de Largo Alcance	25
4.1.3. Campo de Fuerzas	29
4.1.4. Condiciones Periódicas de Frontera	32
4.1.5. Sumas de Ewald	33
4.1.6. Ensamble NVT	37
4.1.7. Ensamble NPT	39
4.2. Modelo de Agua (TIP4P/ ϵ)	40
4.3. Cálculo de Energía Libre	42
4.3.1. Energía Libre	42
4.3.2. Potencial de Fuerza Media	43
4.3.3. Muestreo por Sombrillas (<i>Umbrella Sampling</i>)	47
4.3.4. Método de Análisis de Histograma Ponderado (<i>WHAM</i>)	49
5. Resultados	51
5.1. α -Ciclodextrina	52

5.2. β -Ciclodextrina	57
6. Discusión	63
7. Conclusiones	67
8. Perspectivas	69
Bibliografía	78
A. Ensamble NVT	79
B. Ensamble NPT	81
C. Dinámica Molecular	83
D. Ensamble NPT (<i>Pulling</i>)	85
E. Generación de Ventanas “ <i>Pulling</i> ”	87
F. Dinámica Molecular c/ventana “ <i>Umbrella Sampling</i> ”	89

Índice de figuras

2.1. Estructura básica (izquierda) y forma geométrica con las dimensiones de la β -ciclodextrina.	4
2.2. Estructura de las CDs naturales, conocidas como α , β , y γ	5
2.3. Estructuras base de los diferentes compuestos fenólicos	10
2.4. Biosíntesis del ácido ferúlico	11
2.5. Estructura química (izq.) y características fisicoquímicas (der.)	13
2.6. Resonancia electrónica del ión fenolato	13
2.7. Complejos formados por la molécula ferulato con α -CD (A), β -CD (B) y γ -CD (C). Los mosaicos superiores muestran una vista lateral de los complejos, y los mosaicos inferiores una vista superior de los aductos correspondientes [1].	17
4.1. Representación de condiciones periódicas de frontera.	33
4.2. Representación de condiciones periódicas de frontera, con un grupos y celdas finitas de simulación replicadas. Los cationes se presentan como círculos sombreados; aniones como círculos abiertos.	35
4.3. (a)Representación de la suma de las cargas puntuales por líneas verticales, más la densidad de contraión (ρ_1). (b)Representacion de la densidad de co-ión (ρ_2).	36
4.4. Representación esquemática de los diferentes modelos de agua	41
4.5. Representación esquemática del proceso para calcular la energía libre usando umbrella sampling.	47
5.1. Configuración espacial de la molécula de Ácido Ferúlico (<i>obtenidas por el paquete UCSF Chimera</i>)	51
5.2. Configuración espacial de α -ciclodextrina (<i>obtenidas por el paquete UCSF Chimera</i>)	53
5.3. Complejo α -CD-huésped con mayor frecuencia durante el tiempo de simulación, a una temperatura de 270K.	53
5.4. Complejo α -CD-huésped con mayor frecuencia durante el tiempo de simulación, a una temperatura de 300K.	54

5.5. Complejo α -CD-huésped a la temperatura de 270K.	54
5.6. Complejo α -CD-huésped a una temperatura de 300K.	55
5.7. Complejo α -CD-huésped obtenida de manera artificial para la temperatura de 300K.	55
5.8. Representación de la realización del <i>pulling</i> de α -ciclodextrina-huésped.	56
5.9. α -ciclodextrina-huésped	56
5.10. Configuración espacial de β -ciclodextrina (<i>obtenidas por el paquete UCSF Chimera</i>).	57
5.11. Configuración espacial del complejo β -CD-huésped a una temperatura de 270K	58
5.12. Configuración espacial del complejo β -CD-huésped a una temperatura de 300K	58
5.13. Complejo β -CD-huésped a una temperatura de 270K.	59
5.14. Complejo β -CD-huésped a una temperatura de 300K.	59
5.15. Representación de la realización del <i>pulling</i> de β -ciclodextrina-huésped.	60
5.16. β -ciclodextrina-huésped.	60
6.1. Potenciales de fuerza media de los dos sistemas realizados.	65

Índice de tablas

2.1. Características fisicoquímicas de las tres ciclodextrinas naturales [2].	5
2.2. Parámetros termodinámicos del proceso de formación de complejo de la molécula ferulato con α -, β - y γ -CD [1].	18
4.1. Parámetros generales considerados para la realización del muestreo por medio del software GROMACS.	50
6.1. Comparación de las energías libres de Gibbs extraídas de la literatura contra las obtenidas <i>in silico</i>	65

Capítulo 1

Resumen

En el año 2011, Li *et al.* [3] proponen que la formación de complejos de inclusión con la molécula de β -ciclodextrina, es el método clave para aumentar la solubilidad y absorción de fármacos poco solubles en la etapa inicial de desarrollo, por lo tanto, es esencial predecir la constante de unión entre las moléculas que conforman este fármaco, ya que las propiedades presentes, tanto fisicoquímicas (estabilidad, solubilidad, biodisponibilidad, etc.) como sensoriales (sabor, olor, irritabilidad, etc.) en estas moléculas hacen que sean idóneas para ocuparlas como moléculas de transporte de estos fármacos que suelen ser insolubles en soluciones acuosas, y por ende suelen ser ocupados otros tipos de compuestos para lograr el objetivo, ocasionando que estos fármacos lleguen a tener deficiencia en la parte de la farmacocinética y farmacodinamia de los medicamentos. Las ciclodextrinas no solo son ocupadas en el área farmacéutica, sino también en otras áreas tales como cosmética, alimenticia, análisis químico, entre otras.

Por otro lado el ácido *trans*-ferúlico fué la molécula huésped en este trabajo, esta molécula es de la familia de los compuestos fenólicos, a la que pertenecen los compuestos antioxidantes más conocidos y utilizados. Este fue uno de los puntos principales para decidir enfocarnos en esta familia de compuestos y más específico en esta molécula. Otro aspecto importante fué, la comparación con las energías libres de Gibbs de unión (ΔG_u) reportadas en el trabajo de González-Mondragón *et al.* [1], donde presentan un análisis calorimétrico de la asociación de las tres ciclodextrinas naturales (α , β y γ) con la misma molécula huésped. También presentan resultados de una simulación del acoplamiento molecular (*docking*) de los tres sistemas.

En este trabajo se determinaron las energías libres de unión (ΔG_u) de los complejos de ferulato con la α - y β -ciclodextrina por medio de simulaciones de dinámica molecular en solvente explícito, usando el software libre GROMACS (versión 5.0.7) [4], y la técnica de muestreo por sombrillas (*Umbrella Sampling*). Los valores obtenidos de ΔG_u en este trabajo son parecidos en magnitud a los obtenidos anteriormente por calorimetría y en el mismo orden de afinidad. Donde reportan para el primer

complejo (α -CD-huésped) un $\Delta G_u = -9.9 \pm 0.2 \text{ kJ/mol}$ y en este trabajo se obtuvo un $\Delta G_u = -9.28 \pm 0.28 \text{ kJ/mol}$, teniendo una diferencia de -0.62 kJ/mol ; para el segundo sistema (β -CD-huésped) reportan una $\Delta G_u = -12.8 \pm 0.1 \text{ kJ/mol}$ y en este trabajo se obtuvo un $\Delta G_u = -33.4 \pm 0.3 \text{ kJ/mol}$, teniendo una diferencia de 20.6 kJ/mol .

Capítulo 2

Introducción

En el año 2011, Li, Sun, *et al.* [3] proponen en su trabajo que la formación de complejos de inclusión de β -ciclodextrina es el método clave para aumentar la solubilidad y absorción de fármacos poco solubles en la etapa inicial de su desarrollo, por lo tanto, es esencial predecir la constante de unión entre las moléculas del fármaco y en este caso con β -ciclodextrina. Para ello se construyó un modelo *in silico* basado en la estructura de un conjunto de aproximadamente 90 fármacos poco solubles y estos datos también se utilizaron para perfilar la constante de unión del complejo de inclusión de fármaco- β -ciclodextrina. En ese trabajo sugieren que el comportamiento de unión de las moléculas del fármaco con β -CD debería ser diferente con respecto a los compuestos orgánicos comunes. Centrándose en fármacos estructuralmente diversos, se propuso esa técnica para ser utilizada como una herramienta eficaz para rastrear rápidamente la estabilidad del complejo de inclusión de fármaco- β -ciclodextrina y para diseñar racionalmente un nuevo sistema de suministro de fármacos, sobre todo de fármacos poco solubles [3].

En el mismo año, Merzlikine *et al.* [5] utilizaron un nuevo conjunto de más de 100 constantes de formación de complejos determinadas experimentalmente. En ese trabajo se ocupó sulfobutiléter- β -ciclodextrina y diversas moléculas orgánicas, en esta investigación se desarrollaron dos modelos, los cuales fueron los dos métodos de regresión de aprendizaje computacional: *mecánico-cubista* y *búsqueda al azar*. Modelos similares fueron realizados para β -ciclodextrina usando un conjunto de datos de más de 200 compuestos disponibles en la literatura. Los resultados demostraron que los métodos de regresión de aprendizaje mecánico pueden describir con éxito la formación de complejos entre moléculas orgánicas y β -ciclodextrina ó sulfobutiléter- β -ciclodextrina. También demostraron que los modelos desarrollados pueden usarse para predecir el efecto solubilizante de las ciclodextrinas y ayudar a priorizar el trabajo experimental en el descubrimiento de fármacos.

Finalmente Sancho *et al.* [6], forman complejos de inclusión de chalcona y 2', 4'-dihidroalcalona con β -ciclodextrina, estos compuestos fueron estudiados mediante

múltiples técnicas experimentales (diagramas de solubilidad de fase, espectroscopía infrarroja de transformación de Fourier) y modelado molecular (dinámica molecular, mecánica cuántica\mecánica molecular). Asimismo las constantes de formación de los complejos fueron determinadas a diferentes temperaturas y se obtuvieron los parámetros termodinámicos del proceso. Ellos observaron que la inclusión de chalcona en β -ciclodextrina es un proceso exotérmico, mientras que la inclusión de 2',4'-dihidroxicalcona fue endotérmica.

2.1. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son de la familia de los oligosacáridos y contienen al menos 6 unidades D-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ (ver figura (2.1)). Son producidas de manera natural por la enzima cicloglicosiltransferasa que degrada el almidón; ésta enzima es producida por varios bacilos, entre ellos *Bacillus macerans* y *B. circulans*.

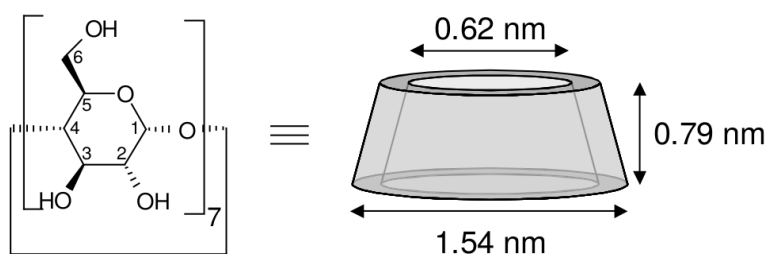


Figura 2.1: Estructura básica (izquierda) y forma geométrica con las dimensiones de la β -ciclodextrina.

Existen tres CDs naturales y dependiendo de las condiciones de reacción se pueden obtener éstas en particular, las cuales se conocen como: α , β , y γ , constituidas de 6, 7 y 8 unidades de glucosa respectivamente (ver figura (2.2)) [7]. Éstas presentan una estructura en forma de trapecioide circular o de cono truncado (ver figura (2.1)), ello es debido a la falta de rotación libre al nivel de los enlaces entre las unidades de glucopiranosas [8]; la parte exterior es hidrófila, mientras que la parte interna de la cavidad es hidrófoba y gracias a esa característica facilita la inclusión de compuestos orgánicos y diversos polímeros en solución acuosa [9]. La solubilidad de las CDs es mucho mayor que la de los sacáridos acíclicos similares, y ello se debe a la fuerte unión de las moléculas de las CDs dentro de la red cristalina. Además, para β -CD, con su número impar de unidades de glucopiranosas, aparecen enlaces de hidrógeno intramoleculares entre grupos hidroxilo, previniendo la formación de

enlaces de hidrógeno con moléculas de agua circundantes y resultando en una baja solubilidad en agua, lo que permite una mejor estabilidad y rigidez de la molécula, y posiblemente una mejor inclusión de compuestos dentro de la misma. Por lo mismo, en solución acuosa, las moléculas de agua dentro de la cavidad de las CDs pueden ser fácilmente reemplazadas por moléculas apolares o partes apolares de las moléculas de inclusión, llevando a un huésped libre a huésped de inclusión [10] que puede aislarse y al compararse con su molécula libre se observa una mayor solubilidad en soluciones acuosa. Este aumento en la solubilidad se debe a la ciclodextrina, por lo que se ha optado por modificar a las ciclodextrinas para potencializar esa virtud, tales como: metiladas, hidroxipropiladas (ambos lados neutros) y sulfobutiladas (cargada negativamente); pero sin perder la capacidad de incluir moléculas en la cavidad [10]. En la figura (2.2) se muestran las estructuras de las tres CDs y en la tabla (2.1) se presentan algunas propiedades físicas de ellas.

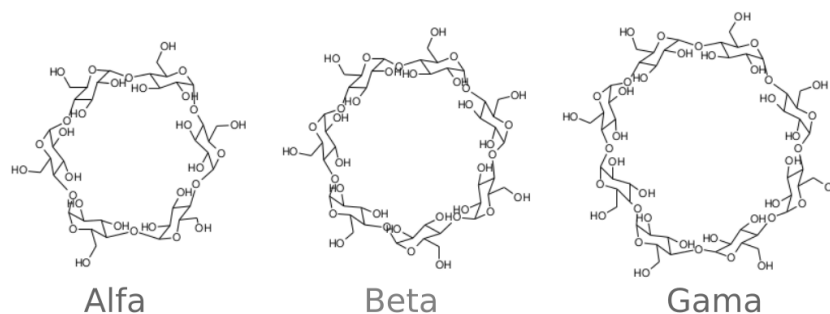


Figura 2.2: Estructura de las CDs naturales, conocidas como α , β , y γ .

	α -CD	β -CD	γ -CD
Núm. de Unid. de Gluc.	6	7	8
Masa Mol. (g/mol)	972	1135	1297
Solub. en Agua (g/L)	145	18.5	232
Diám. Inter. (nm)	0.47 - 0.52	0.60 - 0.64	0.75 - 0.83
Ancho (nm)	0.79	0.79	0.79

Tabla 2.1: Características fisicoquímicas de las tres ciclodextrinas naturales [2].

Las CDs fueron descubiertas en 1891 por *Villiers* [11], quien las denominó primero como celulosinas, estas no mostraban propiedades reductoras y resistencia a la hidrólisis ácida [12]. Entre los años de 1903 y 1904 Schardinger estudió y estableció los fundamentos químicos para una mezcla binaria de moléculas que obtuvo, a éstas

las nombró cristalizados de dextrina- α y dextrina- β , las pudo diferenciar por una inclusión de solución de yodo y yoduro, en las cuales para el complejo cristalizado dextrina- α con yodo en su forma húmeda era de color azul mientras que cuando se encuentra de forma seca (anhidra) es de una tonalidad verde grisácea, por lo contrario para el complejo cristalizado dextrina- β con yodo, tanto en su forma húmeda como anhidra, el color fue marrón.

Después, entre los años de 1930 y 1940 Freudenberg *et al.* determinaron la conformación espacial por medio de cristalografía de rayos X y cómo se encontraban constituidas las dextrinas de Schardinger. Para estas mismas décadas Freudenberg *et al.* pudieron aislar γ -ciclodextrina (γ -CD) y de igual manera se determinó su estructura y reconocieron que estas moléculas pueden formar complejos de inclusión. Los siguientes datos reportados fueron hasta la década de los 60's por French *et al.*, donde se describe la evidencia de ciclodextrinas naturales de anillo ancho y con grado de polimerización de más de 8 unidades de glucosa denominadas δ -, ϵ -, ζ - y η -CD de 9 a 12 unidades respectivamente; Para finales de esta década ya se habían descubierto los métodos de preparación a nivel laboratorio, así como su estructura, propiedades físicas y químicas, etc. [12–16].

Se ha generado una controversia sobre su nomenclatura ya que existen tres formas, una de ellas es empezar a nombrarlas con una letra del alfabeto griego seguidas de la palabra ciclodextrina (por ejemplo α -CD para ciclodextrina de 6 unidades de glucosa y terminado con ω -CD para ciclodextrinas de 29 unidades de glucosa), otra manera que implementaron ya que el alfabeto griego es finito y no puede darle nombre a todas las ciclodextrinas que estaban siendo sintetizadas, fue la nomenclatura propuesta por la Comisión Conjunta de Nomenclatura Bioquímica en 1996 proponiendo la siguiente manera: empezar con el prefijo "ciclo", seguido por el subfijo "malto" que indica el tipo de enlace intersacarídico (para unidades de glucosa unidas α 1 \rightarrow 4), posteriormente con la abreviatura "hexa-, hepta-, octa-, etc." dependiendo de el número de unidades de glucosa que la componen y finalmente con la terminación "-osa", pero ésta terminación lo que significa es que tiene un centro anomérico libre, la disyuntiva es que la molécula no lo tiene. Ésta nomenclatura muestra dos versiones, una donde en general las llama "cicloamilosa", la diferencia entre las demás es su abreviatura "CAn", donde n es el número de glucosas que contiene, la peculiaridad de la otra versión y por ende la última manera de nombrarlas, es la diferenciación de moléculas más grandes con los derivados de las principales o de las primeras ciclodextrinas naturales descubiertas como α , β , y γ -CD, a las cuales se le asignaron la abreviación "LR-CD" [13].

Debido a factores estéricos y tensiones en el anillo, las CDs con menos de 6 unidades de glucopiranososa no pueden existir. Por otra parte, aunque se han descrito ciclodextrinas con 9, 10, 11, 12 ó 13 unidades de glucopiranososa (δ -, ϵ -, ζ -, η - o θ -CD, respectivamente), sólo se ha caracterizado de mejor manera a β -CD [12]. Las CDs más grandes (> 8 unidades), aquellas con una conformación helicoidal, se reducen

rápidamente a productos más pequeños [10].

De manera macroscópica, las CDs se encuentran en forma de polvos cristalinos blancos, prácticamente inodoros, con un sabor ligeramente dulce y algunos derivados de la ciclodextrina se presentan como polvos amorfos [2].

2.2. Aplicaciones de las CDs

Las CDs han demostrado ser moléculas muy versátiles, ya que modificando las propiedades fisicoquímicas (es decir, estado físico, estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad) de las moléculas o polímeros agregados, se ha encontrado un amplio rango de aplicaciones en diferentes áreas de investigación, tales como: alimentos, cosméticos, análisis químico, industria agroquímica, farmacéutica y textil.

En el área de los alimentos, se emplean para evitar el efecto de retrogradación¹ a corto plazo del almidón de arroz [17,18], en este caso se han observado mejores resultados con las CDs modificadas, estas variantes de CDs fueron las hidroxipropiladas (HP), en ese estudio sólo fue probada la β -CD contra HP- β -CD, sobre esta misma línea se realizaron estudios con amilosa- β -CD y la inhibición de retrogradación a largo plazo del almidón de arroz de la β -CD [19], por medio de modelado computacional ocupando el software HYPERCHEM 7.5 [17], así como también calorimetría de barrido diferencial (DSC), técnicas de difracción de rayos X (DRX) y microscopía de fuerza atómica (AFM) [20].

En la incorporación de nuevos aditivos y técnicas para retardar el proceso de envejecimiento del pan. En esos estudios se ha demostrado que la β -CD reduce la dureza y su tasa de cambio, así como también las tasas de cambio de cohesividad y elasticidad del pan durante el almacenamiento [21].

Otra aplicación común de las CDs es el encapsulamiento de ciertos compuestos orgánicos para evitar su degradación ante el oxígeno, luz y altas temperaturas, así como el enmascaramiento de algunos compuestos que podrían dar una mala percepción de ciertos productos o simplemente evitar malos olores y sabores. En particular, por solo hacer mención en algunos trabajos de investigación sobre este tema, se ha reportado la utilización de las CDs en la inhibición de reacciones de pardeamiento de los jugos de frutas y hortalizas, ya que la enzima polifenoloxidasas es eliminada por la formación de complejo con la CD. Otros estudios realizados en los últimos años han indicado que el color de la manzana, la pera, el durazno y el plátano se conservaban en presencia de las CDs naturales [22]. Por otro lado, los carotenoides han sido encapsulados por CDs para mejorar sus habilidades contra el oxígeno y la luz. Se ha reportado el utilizar a la metil- β -CD en la formación de complejos con carotenoides, como la zeaxantina, luteína, licopeno y β -caroteno, y estos se puede utilizar con el fin de suplementos de nutrición celular [23]. También se han ocupado CDs modificadas

¹Insolubilización y precipitación espontánea.

(metiladas e hidroxipropiladas), en estos casos se han utilizado para carotenoides que son muy sensibles a la luz como la astaxantina (ASX), con lo cual se busca mejorar la solubilidad y estabilidad del antioxidante en comparación significativa con su forma libre y con la formación de complejos con las CDs naturales [23].

En la búsqueda de nuevas técnicas para preservar los sabores tanto naturales como artificiales, y así prolongarlos durante el proceso de elaboración del producto, han hecho que las CDs se incorporen en éstas técnicas y los resultados publicados demuestran que son una buena alternativa en comparación de las que ya están implementadas. También son consideradas las CDs, en especial la β -CD como estabilizante y/o agente espesante de estos productos. Debido a que son ocupadas para eliminar o enmascarar sabores, aromas desagradables y compuestos que no se requieren, han sido ocupadas como una etapa de filtración o purificación; se han publicado resultados donde en particular describen una reducción significativa del amargor de zumos de pomelo y mandarina, consecutivamente es reportado una reducción de un 10% del amargor del hidrolizado de la caseína de leche en presencia de β -CD, por último se han utilizado a las β -CDs en forma de perlas de vidrio e inmovilizadas para la reducción de colesterol de productos de origen animal, alcanzando un 41% de dicha reducción y una eficiencia de $\approx 100\%$ de recuperación de las CDs. Por lo tanto se muestran como una nueva opción para preservar sabores y aromas por un largo tiempo [22].

En el área farmacéutica, son utilizadas para la solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad del fármaco y seguridad de los medicamentos. La mayoría de los fármacos no tienen suficiente solubilidad en agua y el sistema de formulación convencional para este tipo de drogas insolubles implica la utilización de una combinación de tensoactivos, disolventes orgánicos y condiciones extremas de pH y temperatura, dicho tratamiento generalmente provoca irritación y otras reacciones adversas. Las CDs no son irritantes y ofrecen ventajas distintas para solubilizar diversas moléculas, entre ellas péptidos biomédicos, proteínas incluyendo interleucina-2, hormonas, aspartamo y albúmina. Por ejemplo, la solubilidad de la ciclosporina A, un fármaco inmunosupresor, se incrementa significativamente en una forma farmacéutica de colirio² por α -CD. El aumento ayuda a penetrar en la córnea por la formación de complejo o dispersión sólida. Además, las CDs metiladas (es decir 2,6-di-*O*-metil- β -CD) parece ser el solubilizante más potente con respecto a las CDs no modificadas, ya que también al ser utilizada con este mismo fármaco solo que en su presentación oral, aumenta alrededor de 5 veces su biodisponibilidad y no se ve afectada en su transferencia linfática. Otro enfoque de reducir la cristalinidad del fármaco en la formación de complejo con CD también contribuye a un aumento de la solubilidad aparente del fármaco y la velocidad de disolución. Este aumento se le atribuye principalmente a la capacidad de las CDs para formar un complejo de inclusión con fármacos en medios

²forma farmacéutica que consiste en disoluciones o suspensiones estériles que se aplica en forma de gotas a la conjuntiva del ojo.

de disolución [24].

Después de la solubilidad, se encuentra la estabilidad y la biodisponibilidad del fármaco, en este caso las CDs han demostrado cambios significativos con respecto a otros vehículos utilizados en el transporte de fármacos, mejorando la resistencia a la oxidación, la hidrólisis, el calor, la luz, las sales metálicas, la humedad relativa y la temperatura durante el almacenamiento, proporcionando una especie de escudos moleculares. La formación de complejos de inclusión de las CDs con drogas irritantes también puede proteger la mucosa gástrica para la vía oral, reducir el daño de la piel para la vía dérmica y enmascarar el sabor amargo o irritante y el mal olor [25]. Uno de los factores importantes o principales para la formación de estos complejos es la constante de estabilidad, ya que esta constante si es de un valor bajo quiere decir que la CD no podrá proteger eficazmente al fármaco huésped y esta asociación o formación de complejo CD-huésped será más inestable.

2.3. Ácido Ferúlico

En 1866 Hlasiwetz y Barth en Innsbruck, Austria, aislaron al ácido 3-4 dihidro-xibenzoico y resorcinol de la resina comercial de la planta *Ferula foetida* [26]. Al mismo tiempo, obtuvieron un precipitado de color amarillo por la adición de plomo divalente a una solución de resina alcohólica. Lavaron la sal precipitada con alcohol, reconstituyendo el ácido libre y determinaron su composición como $C_{10}H_{10}O_4$, nombraron a este compuesto ácido ferúlico y caracterizaron sus diversas sales metálicas, así como sus productos de reacción catalizados por bases, también lo denominaron ácido dibásico, que ha sido consistente con su estructura que actualmente se conoce.

Durante los siguientes años, no hubo alguna otra investigación adicional sobre este componente, hasta 1891 que surgió un informe sobre el aislamiento del ácido ferúlico de la especie arbórea *Pinus nigra*. Después en 1925, Knoevenagel la sintetizó químicamente por medio de una condensación catalizada por amina de vainillina con ácido malónico [27–29].

El primer estudio analítico sistemático de los factores que influyen en la síntesis del ácido ferúlico se publicó en 1932, cuando Dalal y Dutt mostraron que el ácido malónico se condensaba muy fácilmente con aldehídos aromáticos y alifáticos en presencia de pequeñas cantidades de piridina y piperidina [30]. La reacción tuvo lugar sólo en la piridina, pero pequeñas cantidades de piperidina u otras aminas secundarias y/o terciarias aceleraron la reacción de manera significativa, produciendo ácidos monocarboxílicos insaturados con pérdida rápida de dióxido de carbono; Vorsatz mejoró el rendimiento hasta el 73 % llevando a cabo la condensación a temperatura ambiente durante 3 semanas [31]. Se publicaron modificaciones menores adicionales de la condensación del ácido malónico con vainillina; una segunda ruta para sintetizar ácido ferúlico es la condensación de Perkin de vainillina con anhídrido acético.

Los isómeros *cis* y *trans* se separaron en 1957 y la estereoquímica del ácido ferúlico fue determinada por la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de carbono 13 en 1976 y confirmada por análisis cristalográfico por rayos X en 1988 [32].

El ácido ferúlico es el nombre común para el ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico. Otros nombres son ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico, ácido 3-metiléter de ácido cafeico y ácido coniférico, es de la familia de los compuestos fenólicos, éstas son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo [33], como se muestra en la figura (2.3). Ellos se sintetizan como metabolitos secundarios para funciones de defensa y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia, el sabor y el aroma; gracias a que gran parte de este compuesto en el tejido vegetal se conjuga con otras moléculas (por ejemplo, se forman ésteres o amidas a través de un intermedio tioéster de ácido ferúlico-Coenzima A). Estos compuestos se pueden clasificar de acuerdo con su estructura química en:

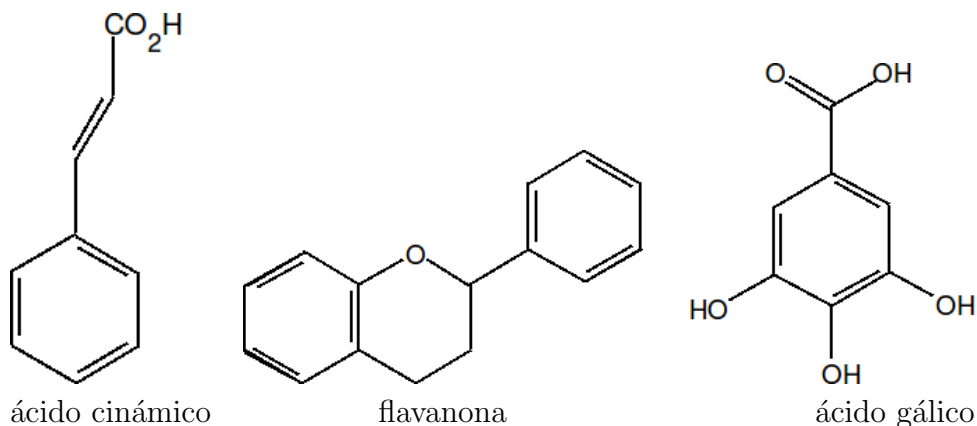


Figura 2.3: Estructuras base de los diferentes compuestos fenólicos

1. **Ácidos fenólicos:** Este grupo de compuestos se caracterizan por poseer en su estructura química un anillo aromático hidroxilado y un grupo carboxilo. Algunos de los ácidos fenólicos tienen interés terapéutico.
2. **Flavonoides:** Son metabolitos secundarios polifenólicos, ampliamente distribuidos en el reino vegetal en altas concentraciones.
3. **Taninos:** Compuestos fenólicos hidrosolubles, que presentan junto a las reacciones clásicas de los fenoles, la de precipitar los alcaloides y otras proteínas (Bate-Smith y Swain, 1962).

En la figura (2.4) se muestra la vía principal para la biosíntesis de ácido ferúlico en plantas. Las reacciones son iniciadas por fenilalanina y tirosina amonioliasas,

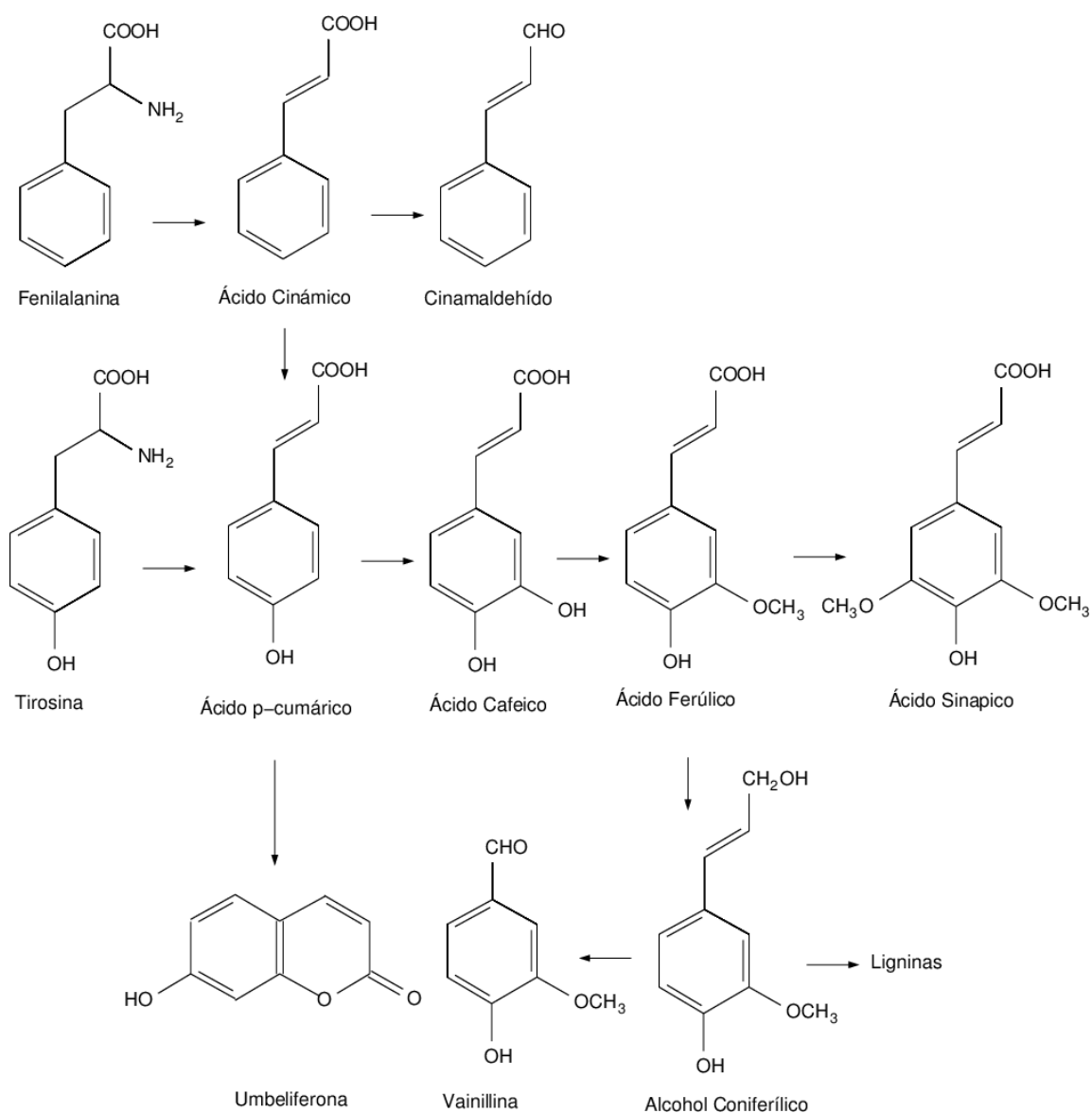


Figura 2.4: Biosíntesis del ácido ferúlico

dos enzimas vegetales que convierten fenilalanina y tirosina en *trans*-cinamato y *p*-cumarato, respectivamente. El ácido ferúlico se deriva del ácido p-cumárico mediante hidroxilación seguida de una metilación con metionina actuando como donador de metilo, es catalizada por s-adenosil metionina: ácido cafeico 3-*o*-metiltransferasa, las reacciones subsiguientes de oxidación y metilación dan lugar a derivados adicionales de di- y trihidroxicinamato que se convierten en los materiales de partida para la formación de lignina [34].

La degradación oxidativa del ácido ferúlico conduce a la vainillina y al guaiacol. Otras alteraciones de la cadena lateral del ácido propanoico pueden producir clases adicionales de estructuras de fenilpropanoides, como los flavonoides. También se han descrito unos pocos metabolitos de ácido ferúlico, tales como metil ferulado en aceite de salvado de arroz y ácido 5-hidroxiferúlico en maíz y cebada [35].

En las semillas, el ácido ferúlico generalmente se localiza en la fracción de salvado donde se explica la autofluorescencia intensa de tejidos, tales como en el trigo y cebada, en las capas de aleurona [36] y el escutelo [37], en el trigo es el de mayor concentración [38].

Se han propuesto varias funciones fisiológicas del ácido ferúlico, una de ellas es el entrelazamiento de las cadenas de pentosas vecinales, arabinoxilanos y hemicelulosas en las paredes celulares, hace que aumente la extensibilidad de la pared durante el alargamiento celular, en la reticulación mediada por ferulato, hace que estos componentes celulares sean insolubles [39] y disminuye su susceptibilidad a la degradación hidrolítica por las enzimas endospermicas durante la germinación [36]. Entonces, se ha sugerido que el ácido ferúlico actúa como un inhibidor de la germinación [40], presumiblemente limitando la disponibilidad del sustrato. Un estudio describió las propiedades repelentes hacia las aves [41], lo que puede implicar un papel defensivo de los derivados del ácido cinámico contra los depredadores naturales, además aumentó la resistencia del huésped a la infestación del gorgojo en el maíz [42] y áfidos en el frijol chino o frijol de carita [43].

Las plantas también producen ácido isoferúlico o ácido 3-hidroxi-4-metoxi-cinámico, el ácido que se aísla de las plantas usualmente existe como el isómero trans, varios fenoles de las plantas, incluido este compuesto, promueven la liberación reductora de hierro de ferritina³. Esta reactividad química del hierro liberador de la fitoferritina puede representar un importante proceso en el metabolismo mineral de las plantas y otra posible función fisiológica de este ácido orgánico en las células vegetales. También se ha demostrado que este ácido en el suelo y el mantillo exhiben una función alelopática⁴ en las plantas regulando el crecimiento de las plantas a través de la interacción de las raíces [44]. Esta transferencia aleloquímica del suelo a la planta huésped puede jugar un papel importante durante la rotación de los cultivos de trigo y también durante la autopreservación de plantas en regiones áridas. Sin embargo, es probable que el papel fisiológico principal del ácido ferúlico sea su potente función antioxidante. Su estructura química permite secuestrar radicales libres, debido a su facilidad para donar el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático [45].

³La ferritina es la principal proteína almacenadora de hierro en los vertebrados y en pastos, estos últimos la retienen en los orgánulos, principalmente en los cloroplastos, que la liberan de acuerdo con las necesidades metabólicas de la planta (Sechbach, 1982).

⁴La alelopatía es un fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos bioquímicos llamados aleloquímicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos(FAO).

La estructura base de la molécula del ácido ferúlico corresponde al ácido cinámico, donde el anillo bencénico está hidroxilado en la posición *para* y oxigenado en la posición *meta*, con respecto al enlace vinílico está unido un grupo carboxílico. Esta disposición de los sustituyentes en el benceno ocasiona que la molécula sea altamente conjugable [46]. El ácido ferúlico, se muestra en la Figura (2.5), es fotosensible, termoestable, posee un sabor muy astringente y amargo [46]. Es un ácido dibásico debido a que en solución acuosa tiene la capacidad de desprender dos protones; la primera desprotonación produce un anión carboxilato y la segunda genera el anión fenolato, con valores de pKa de 4.56 y 8.65, respectivamente [47]. El alto grado de estabilización por resonancia (ver figura(2.6)) del anión fenolato a través de toda la molécula conjugada aumenta notablemente su acidez con respecto a ácidos fenólicos similares. El ácido *trans*-ferúlico absorbe fuertemente en el rango UV con una absorción a 284 nm ($\log \epsilon = 4.18$) y 307 nm ($\log \epsilon = 4.19$) en solución acuosa, pH 6.0 [48], también muestra una fuerte fluorescencia [49].

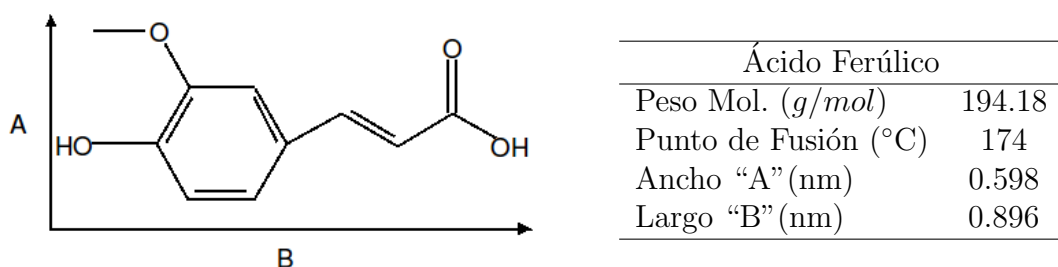


Figura 2.5: Estructura química (izq.) y características fisicoquímicas (der.)

Las agujas ortorrómbicas incoloras del ácido *trans*-ferúlico se pueden cristalizar en agua caliente [50]. Es soluble en etanol, acetato de etilo y agua caliente, moderadamente soluble en éter, y sólo escasamente soluble en benceno y éter de petróleo.

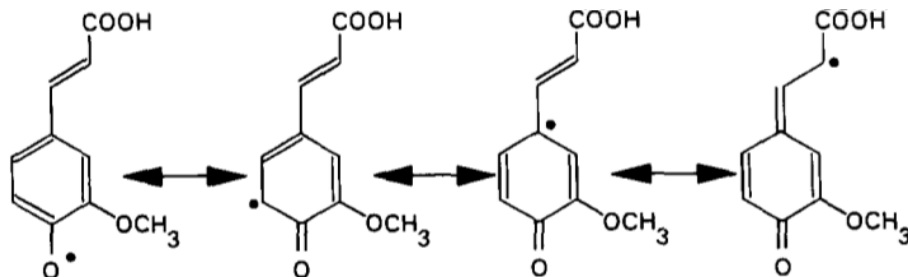


Figura 2.6: Resonancia electrónica del ión fenolato

2.4. Aplicaciones del Ác. Ferúlico

Aunque los compuestos fenólicos pueden ser consumidos en forma natural al ingerir los alimentos que los contienen, existe una tendencia de extraerlos de fuentes naturales, después de entender y tener definida las reacciones de síntesis del ácido ferúlico, entonces ahora no solo la única forma de obtenerlo sea por medio de la extracción. Con base en lo ya mencionado anteriormente este compuesto es utilizado como aditivos en el fortalecimiento de alimentos procesados, en cremas corporales para protección solar, inhibidor microbiano y principalmente en cualquier presentación en la que se pueda aprovechar su alta capacidad como antioxidante [51].

Un antioxidante es una sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas, en comparación con la de la sustancia oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicha sustancia. Los antioxidantes son importantes en la prevención de enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, debido a que neutralizan las especies reactivas de oxígeno (*ROS*) como el anión radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, generando estructuras estables que evitan el deterioro de otras sustancias indispensables para el normal funcionamiento celular [51].

El estudio de esta actividad, ha permitido asociar a los compuestos fenólicos en la protección contra sustancias oxidantes principalmente los metales de transición, particularmente el hierro desempeña un papel crucial en las reacciones del oxígeno radical y posterior daño oxidativo a los materiales biológicos. Estas reacciones a menudo implican la activación de oxígeno, catalizada por hierro para formar radicales de aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo altamente reactivo a través de la reacción de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss, ya que por sí sola es lenta. Esta reacción requiere estrictamente la disponibilidad de al menos un sitio de coordinación de hierro libre a través del cual puede ocurrir el transporte redox. Algunos agentes quelantes tienen la capacidad de bloquear completamente la actividad catalítica del hierro [52].

Una vez revisado la capacidad antioxidante que ofrece el ácido ferúlico por ser un ácido dibásico y por que ha presentado formación de complejos con lantánidos pesados; a partir de esto, el ácido ferúlico exhibe dos diferentes tipos de actividad antioxidante; principalmente la afinidad por el barrido radical y la segunda pero no menos importante, es su capacidad de mitigar los efectos nocivos de la radiación UV [53].

Estudios anteriores han demostraron la actividad de los compuestos fenólicos con respecto a la peroxidación lipídica, actuando sobre la generación de malondialdehído, donde su grado de afinidad se debe a la cantidad de sustituyentes en el anillo aromático, en ese trabajo compararon la actividad de tres diferentes ácidos: cinámico, ferúlico y caféico, observando que el ácido caféico es 1000 veces más efectivo que el ácido ferúlico y por ende el mejor, y sin actividad antioxidante el ácido cinámico

co [54]. La diferencia entre los ácidos caféico y ferúlico, no es sólo que tenga una mejor capacidad antioxidante ante la peroxidación lipídica a nivel de la generación de malondialdehído, sino que el ácido ferúlico aparte de inhibir la formación de dicha molécula en menor proporción que el ácido caféico, eliminó el radical anión superóxido y también inhibió la peroxidación lipídica inducida por el superóxido; éste efecto fue similar en magnitud a la observada con la superóxido dismutasa [55]. El motivo de este efecto se debe a que la resonancia electrónica del ácido ferúlico cuando dona un átomo de hidrógeno para la formación de la molécula fenoxi es muy estable, ya que este compuesto no puede iniciar o propagar una reacción en cadena para formar radicales libres, sino por lo contrario lo más probable es colisionar o reaccionar con un radical u otro similar ferulado produciendo un dímero de curcumina, como todavía exhibe otro grupo hidroxilo es capaz de inmediato donar el siguiente hidrógeno con lo cual se elimina el radical libre [55].

Otra aplicación que se observó en los anteriores trabajos fue la absorción de UV, sabiendo que dicho efecto provoca la formación de radicales libres fenoxi y por ende ácidos ferúlicos *cis* y *trans*, para determinar la eficacia con la que puede actuar ante otros radicales; se realizó una prueba en la cual se compararon los grados de inhibición de derivados del ácido cinámico y la tasa de formación de sus isómeros, el derivado que reaccionara con los radicales de los otros, demostraría la rapidez con la que se forma y la efectividad de los otros radicales en cuestión de provocar dicha interacción e inhibir la reacción en cadena de éstos. Los derivados fueron los ácidos ferúlico, sinápico y caféico, el que terminó inhibiendo a las demás moléculas fue el ácido sinápico, con estos resultados se comprobó la actividad antioxidante de los derivados del ácido cinámico y con otros experimentos donde se ocupó ferulato de campesterilo en la formación de dieno durante la peroxidación del ácido linoléico por irradiación UV, este lo redujo un 22 y 30 % en 15 y 30 hrs., respectivamente [56].

Con esto se podía decir que a concentraciones mayores el ácido ferúlico puede proteger a otros compuestos sensibles a la luz contra el daño oxidativo, atenuando la radiación UV. Entonces, surge la idea de relacionar el potencial antioxidante biológico con la absorción UV y al medir la generación de radicales estables de ácido ferúlico ésta es consistente con lo ya observado, de que los niveles más altos de ácido ferúlico y derivados similares del cinamato, se producen notoriamente en hojas, semillas y otros órganos vegetales de gran superficie. Es probable que el ácido ferúlico brinde una inmensa protección antioxidante a varias capas celulares situadas inmediatamente debajo de la superficie que están expuestas a la penetración UV, ante esto, la aplicación tópica de ácido ferúlico a la piel humana se espera que proporcione alguna fotoprotección. De hecho, este ácido constituye el ingrediente activo en muchas lociones cosméticas y protectores solares para la piel [57].

Una composición de crema para el cabello también incluyó ácido ferúlico para prevenir la alopecia, la seborrea y el prurito. Un cosmético que contiene pigmentos de los tipos de antocianinas de flores de tulipán, utilizó este ácido para estabilizar el

colorante contra la decoloración oxidativa [58]. Algunos fabricantes textiles japoneses la utilizaron para la fabricación de ropa de golf con propiedades de absorción de UV [59], también ha demostrado disminuir los efectos secundarios de la quimioterapia y la radioterapia de los carcinomas aumentando la defensa inmunológica natural [59]. Por otro lado, este ácido exhibió fuertes propiedades antiinflamatorias en un modelo de edema de pata de rata inducido por carragenano y otros sistemas [60], estas mismas propiedades antioxidantes también explican la inhibición de la carcinogénesis inducida químicamente en ratas [61] y la promoción de tumores en la piel de ratón y se cree que explican su mecanismo antidiarréico [62].

En una revisión de herbolaria china antigua, se observó al ácido ferúlico como uno de los principios activos para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Esta molécula y sus ésteres de esterilo, γ -orizanol, presentan fuertes propiedades hipocolesterolémicas y antiaterogénicas. Un estudio de alimentación en la Universidad de Lowell en Massachusetts con monos *cynomolgous* reportó la capacidad única de aceite de salvado de arroz para causar una reducción del 40 % en el colesterol total y para disminuir el LDL, o lipoproteína de baja densidad, en un 30 % con que afecta al HDL, o lipoproteína de alta densidad [63].

Se ha demostrado que el ácido ferúlico natural en el trigo afecta la reología de la masa y causa la ruptura de ésta durante la fabricación del pan interactuando con los grupos sulfhidrilo del gluten a través de un mecanismo de radicales libres [64,65]. Una combinación de ácido ferúlico y tetrametilpirazina tuvo un efecto inhibitor sinérgico sobre el movimiento espontáneo del útero de rata in situ [66].

Una aplicación más del ácido ferúlico ha sido la preservación de alimentos, en la que su primera incorporación fue en Japón en 1975 para preservar las naranjas e inhibir la autooxidación del aceite de linaza. Los compuestos fenólicos también estabilizaron la manteca de cerdo y el aceite de soja, principalmente en presencia de cobre o hierro añadidos. Las mezclas de ácido ferúlico con aminoácidos o dipéptidos, tales como glicilglicina o alanilalanina, ejercían un efecto inhibitor sinérgico sobre la peroxidación del ácido linoleico; también, una mezcla de ácido ferúlico con glicina inhibió completamente la oxidación de las galletas almacenadas a 30°C durante 40 días [67]. Un derivado sintético del ácido ferúlico, tocoferol férulado, demostró ser un antioxidante muy superior para las grasas y aceites evaluado por el grado de peróxido.

El aceite de oliva virgen también contiene grandes cantidades de compuestos fenólicos y un alto grado de potencial antioxidante que se destruye durante el proceso de refinado [68], quizás debido a la pérdida de efectos antioxidantes sinérgicos de otros componentes [69]. Durante la cocción de alimentos, la descarboxilación térmica del ácido ferúlico puede producir 4-vinilguaiacol [70], el principal contribuyente de los aromas fuera de sabor en muchos productos cocidos. Por ejemplo, esta generación ocurre durante la fabricación de la cerveza y puede explicar el desarrollo de aromas fuera de sabor en zumo de naranja almacenado [71].

2.5. Complejo CDs-Ácido Ferúlico

En el trabajo publicado por González-Mondragón *et al.* [1] en el año 2016, presentan un estudio de las tres ciclodextrinas naturales (α , β y γ) tanto de manera experimental como por simulación. En el cual calculan parámetros termodinámicos a partir de calorimetría de titulación isotérmica (ITC); ya que ésta técnica se utiliza en estudios cuantitativos de una amplia variedad de interacciones biomoleculares, en ella se mide de manera directa el calor que se libera o absorbe durante un enlace biomolecular. Por otro lado, la parte de simulación de acoplamiento molecular (*docking*) se realizó por medio del software llamado MOE⁵ (versión 2013.08), implementando el protocolo de acoplamiento MOE-Dock_Induced.Fit para las moléculas de ciclodextrina (CD) y ácido ferúlico (AF), ocupando un método llamado *Triangle Matcher* el cual se encarga de colocar los conformeros del ligando dentro de la cavidad de las CDs, fue ocupado como campo de fuerzas el MMFF94x y la función de reescalamiento *GBVI/WSA* dG. En la figura (2.7) se presentan los resultados obtenidos de la parte de simulación de este trabajo [1].

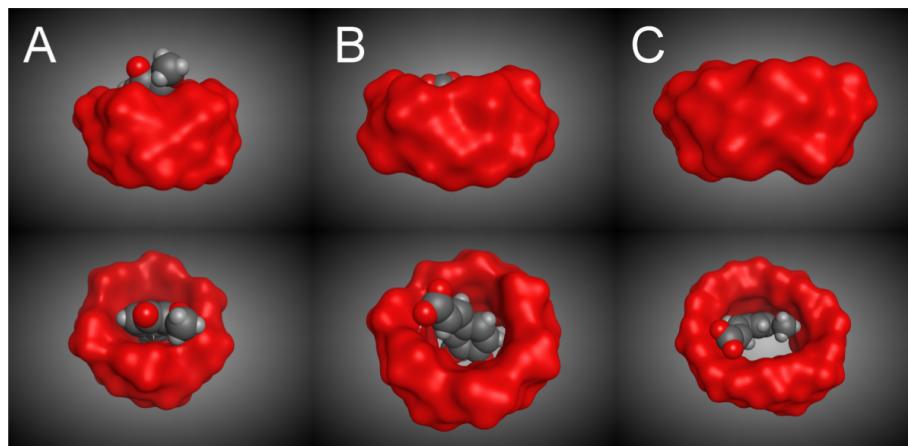


Figura 2.7: Complejos formados por la molécula ferulato con α -CD (A), β -CD (B) y γ -CD (C). Los mosaicos superiores muestran una vista lateral de los complejos, y los mosaicos inferiores una vista superior de los aductos correspondientes [1].

El muestreo por medio de ITC se elaboró, ocupando soluciones de ácido ferúlico y ciclodextrinas disueltas en una solución de borato de sodio a una concentración de 0.05 mol dm^{-3} a pH 9.0. La celda de muestra contenía la solución de AF con borato de sodio a una concentración de $0.0035 \text{ mol dm}^{-3}$ y en la pipeta colocaron una solución activa de CD, bajo las concentraciones de 0.197, 0.130 y 0.0165 mol

⁵www.chemcomp.com

2.5. COMPLEJO CDS-ÁCIDO FERÚLICO CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN

dm^{-3} para γ -CD, α -CD y β -CD, respectivamente. Las valoraciones consistieron en una primera inyección de $0.4 \mu\text{L}$ seguida de 19 inyecciones de $2.0 \mu\text{L}$, con un intervalo de 3 min., a una temperatura de 298.1 K [1].

Los resultados obtenidos por medio de esta técnica arrojan unas isoterms de unión, en las cuales ellos describen que bajo esas condiciones la forma más abundante de AF también es la más soluble en solución acuosa: la completamente ionizada con una carga neta de -2, presentando los parámetros termodinámicos (K_c , ΔH_c , ΔS_c y ΔG_c) obtenidos para el proceso de formación de complejo (denotados por el subfijo "c"), los cuales se muestran en la tabla (2.2), mencionando que en los tres muestreos fueron exotérmicos y concluyendo que bajos esas condiciones la CD con mayor afinidad con el AF es la β -CD, seguida de la α -CD y por último la γ -CD; y aunque la reacción menos exotérmica fue con β -CD, ésta presentó el único valor entrópico favorable [1].

CD de alojamiento	$K_c(\text{dm}^{-3}/\text{mol})$	$\Delta H_c(\text{kJ}/\text{mol})$	$T\Delta S_c(\text{kJ}/\text{mol})$	$\Delta G_c(\text{kJ}/\text{mol})$
α -CD	53.2 ± 3.4	-18.0 ± 0.8	-8.2 ± 0.9	-9.9 ± 0.2
β -CD	176.5 ± 5.0	-6.4 ± 0.5	6.5 ± 0.6	-12.8 ± 0.1
γ -CD	19.4 ± 0.4	-11.3 ± 0.4	-4.0 ± 0.6	-7.4 ± 0.1

Tabla 2.2: Parámetros termodinámicos del proceso de formación de complejo de la molécula ferulato con α -, β - y γ -CD [1].

Capítulo 3

Objetivo General

- Determinar las energías libres de unión del ácido ferúlico con α - y β -ciclodextrinas en medio acuoso a 270 y 300 K, con un pH 9.0 mediante simulaciones de dinámica molecular.

CAPÍTULO 3. OBJETIVO GENERAL

Capítulo 4

Metodología

4.1. Dinámica Molecular

Uno de los métodos alternativos para la realización de simulación computacional fué denominado *Dinámica Molecular* (DM), el cual fue presentado en el año 1959 [72]; en este método lo que se pretende es resolver de manera numérica la ecuación newtoniana de movimiento (ver ecuación (4.1)) para un sistema de partículas en un ensamble dado y así obtener la trayectoria de dichas partículas en un espacio fase. El éxito de este método en la predicción de propiedades termodinámicas de modelos representados por discos duros [73], partículas tipo Lennard-Jones [74] y muchos otros líquidos y sólidos, ha sido principalmente debido a dos puntos: en primer lugar, los sistemas modelo-teórico se pueden desarrollar probando y comparando sus propiedades con los resultados experimentales y en segundo lugar, las simulaciones dan una idea de los procesos que no son accesibles para el experimento, por ejemplo, la observación de la traza de una partícula. Desafortunadamente, estos métodos también tienen limitaciones, una de ellas es que el número de partículas es finito ($N \approx 10^6$), esto dada la capacidad de procesamiento de las computadoras, por lo cual la idea principal de la simulación en un sistema real homogéneo, es el representarlo por una celda unitaria y suponer que el comportamiento de las partículas de ese subsistema será idéntico para los subsistemas adyacentes, y al final extrapolar el resultado de este subsistema al sistema real.

$$F = ma \tag{4.1}$$

En la implementación de la ecuación de movimiento, ésta se da por el movimiento traslacional de una partícula esférica i con una masa m_i , y este movimiento es expresado por la segunda derivada con respecto al tiempo de \vec{a}_i , siendo \vec{r}_i , el cual es causado por una fuerza \vec{F}_i producida por algún agente externo. la ecuación queda de la siguiente manera:

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = \vec{F}_i = m_i \ddot{\vec{r}}_i \quad (4.2)$$

Para integrar las ecuaciones de movimiento se necesita una manera de optimizar los cálculos; para lo cual, existen algunos métodos de integración. Uno de los métodos estandar utilizados para resolver ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs) como ésta ecuación (4.2), es el enfoque de diferencia finita. En el cual, las posiciones (r) y las velocidades (v) moleculares a un momento ($t + \Delta t$) son obtenidas a partir de ellas mismas en un momento anterior (t). Las ecuaciones se resuelven paso a paso y el valor de Δt tiene que ser significativamente menor al tiempo que se requiere estudiar, para poder realizar un muestreo estadístico aceptable. Para esta implementación se ocupa una expansión de Taylor,

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{\vec{F}(t)}{2m}\Delta t^2 + \dots \quad (4.3)$$

donde $\vec{v}(t)$ es el vector de velocidad y $\vec{r}(t)$ es el vector de posición a un tiempo (t). Debido a que la integración avanza paso a paso, tendríamos que sustituir los parámetros de posición (r), velocidad (v) y fuerza (F) por r_n , v_n y F_n , las cuales indican la posición, velocidad y fuerza al paso n en un tiempo (t), respectivamente; y r_{n+1} para la posición del siguiente paso ($n + 1$) en el tiempo ($t + \delta t$), por lo tanto, la ecuación se reescribiría de la siguiente manera,

$$\vec{r}_{n+1} = \vec{r}_n + \vec{v}_n \Delta t + \frac{\vec{F}_n}{2m} \Delta t^2 + O(\Delta t^3) \quad (4.4)$$

donde $O(\Delta t^n)$ son términos de orden Δt^n y son muy pequeños, que pueden ser despreciados. Con esto, podremos estimar que el vector velocidad (v_{n+1}) al tiempo ($n + 1$) sería,

$$\vec{v}_{n+1} = \frac{(\vec{r}_{n+1} - \vec{r}_n)}{2} \quad (4.5)$$

finalmente si juntamos las ecuaciones (4.4) y (4.5), tendríamos de manera general un algoritmo de integración. Dados los vectores de: posición \vec{r}_n , velocidad \vec{v}_n y de fuerza \vec{F}_n al paso n , y con estos vectores podemos estimar los vectores de posición \vec{r}_{n+1} y de velocidad \vec{v}_{n+1} al paso $n + 1$. Este algoritmo de integración presenta errores de precisión y un mayor consumo de almacenamiento; por lo cual, existen algoritmos de integración más precisos y por ende más utilizados, como el integrador de *Verlet* y mas aún, su modificación al integrador *Velocity Verlet*.

4.1.1. Integrador de Verlet

Este integrador se basa en dos expansiones de Taylor, una expansión hacia adelante ($t + \Delta t$) y una expansión hacia atrás ($t - \Delta t$),

$$\vec{r}_{n+1} = \vec{r}_n + \vec{v}_n \Delta t + \frac{\vec{F}_n}{2m} \Delta t^2 + O(\Delta t^3) \quad (4.6)$$

$$\vec{r}_{n-1} = \vec{r}_n + \vec{v}_n \Delta t + \frac{\vec{F}_n}{2m} \Delta t^2 - O(\Delta t^3) \quad (4.7)$$

La suma de estas dos expresiones produce un algoritmo para la propagación de la posición, y quedaría de la siguiente forma:

$$\vec{r}_{n+1} = 2\vec{r}_n - \vec{r}_{n-1} + \frac{\vec{F}_n}{m} \Delta t^2 + O(\Delta t^4) \quad (4.8)$$

Este algoritmo se ejecuta en dos pasos, los cuales son:

- Primero se usa el vector de posición \vec{r}_n para calcular el vector de fuerza \vec{F}_n .
- Después son usados los vectores de posición actual (\vec{r}_n) y el anterior (\vec{r}_{n-1}), y el vector de fuerza \vec{F}_n (calculado en el paso anterior) para finalmente calcular el siguiente paso (\vec{r}_{n+1})

Ahora bien, si restamos las ecuaciones (4.7) y (4.6) se obtiene la propagación de velocidades al paso n ,

$$\vec{v}_n = \frac{\vec{r}_{n+1} - \vec{r}_{n-1}}{2\Delta t} + O(\Delta t^2) \quad (4.9)$$

La incorporación de las ecuaciones (4.8) y (4.9) al algoritmo, proporciona un método numérico estable para resolver la ecuación de movimiento de Newton para sistemas que van desde fluidos simples hasta biopolímeros.

Integrador *Velocity Verlet*

Una mejor manipulación de las velocidades para la solución de la ecuación de movimiento, es la variante del integrador de Verlet, llamado “*Velocity Verlet*”. Este es un algoritmo tipo Verlet que almacena posiciones, velocidades y aceleraciones, todo al mismo tiempo, y minimiza los errores de redondeo. El cual se representa de la siguiente manera:

$$\vec{r}_{n+1} = \vec{r}_n - \vec{v}_n \Delta t + \frac{\vec{F}_n}{2m} \Delta t^2 \quad (4.10)$$

$$\vec{v}_{n+1} = \vec{v}_n + \frac{1}{2} \left[\frac{\vec{F}_n}{m} + \frac{\vec{F}_{n+1}}{m} \right] \Delta t \quad (4.11)$$

De igual manera, si eliminamos las velocidades de este algoritmo llegamos a la representación del integrador de Verlet. En su implementación, este algoritmo consta de los siguientes pasos:

- Primero se calculan las posiciones \vec{r}_{n+1} a un tiempo $t + \Delta t$ a partir de la ecuación (4.10)
- Enseguida, se calculan las velocidades a un paso intermedio $\vec{v}_{n+1/2}$ usando la siguiente ecuación,

$$\vec{v}_{n+1/2} = \vec{v}_n + \frac{1}{2} \left(\frac{\vec{F}_n}{m} \right) \Delta t \quad (4.12)$$

- Después, se calcula la fuerza \vec{F}_{n+1} a un tiempo $t + \Delta t$
- Finalmente se completa el algoritmo, calculando las velocidades \vec{v}_n usando la siguiente ecuación,

$$\vec{v}_{n+1} = \vec{v}_{n+1/2} + \frac{1}{2} \left(\frac{\vec{F}_{n+1}}{m} \right) \Delta t \quad (4.13)$$

Para este paso la energía cinética a un tiempo $t + \Delta t$, ya se encuentra disponible. Nótemos que si sumamos las ecuaciones (4.12) y (4.13), podemos obtener la ecuación (4.11), con esto, no es necesario conocer las fuerzas a los tiempos t y $t + \Delta t$ para poder calcular las nuevas velocidades, por lo tanto, logramos una mejor eficiencia computacional ya que disponemos de menos memoria de almacenamiento tanto volátil (RAM) como no volátil (ROM).

4.1.2. Contribuciones de Largo Alcance

Por fuerzas de largo alcance nos referimos a fuerzas originadas por la electrostática, a estas se incluyen sistemas tales como: el solvente e iones por medio de las condiciones de frontera, estos sistemas se vuelven una parte fundamental del problema de la evaluación de las interacciones electrostáticas, por lo que también es necesario analizar las condiciones de frontera. Ya que se involucran interacciones electrostáticas, sería mejor comenzar por revisar la ley de Coulomb. Existen dos tipos de cargas las cuales están definidas como positivas y negativas, y la carga total en un sistema aislado se debe de conservar durante procesos físicos o químicos.

Coulomb cuantificó la atracción (cargas diferentes) y la repulsión (cargas iguales) de estas cargas de la siguiente manera, en donde: la fuerza entre dos cuerpos cargados en reposo es proporcional al producto de sus cargas e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia entre ellos:

$$\vec{F} = k \frac{q_1 q_2}{r^2} \hat{\mathbf{r}} \quad (4.14)$$

donde q_1 y q_2 representan las cargas de la primera y segunda partícula respectivamente, $r = (x^2 + y^2 + z^2)^{1/2}$ y representa la distancia entre las dos cargas, la variable $\hat{\mathbf{r}} = \vec{r}/r$ es el vector unitario en la dirección de q_1 a q_2 y k es la constante de fuerza de Coulomb, las unidades y el valor que toma esta constante depende de las demás variables, en algunos casos es igual a $1/4\pi\epsilon_0$ y ϵ_0 es la permitividad del vacío. Si q_1 y q_2 tienen unidades de cargas elementales, las unidades de distancia son angstroms y la energía se encuentra en calorías por moléculas (kcal/mol), la constante de fuerza de Coulomb (k) es aproximadamente 332.

La energía electrostática entre las cargas de los dos átomos se considera como el trabajo realizado para trasladar a q_2 desde lo más alejado del sistema donde prácticamente no existe una interacción con q_1 a lo largo de un camino tal que llegue a un punto r . Este trabajo no es más que la integral del producto punto de $\vec{F} \cdot d\vec{r}$, donde la fuerza $\vec{F} = -\nabla U$, y $d\vec{r}$ es el desplazamiento a lo largo de la trayectoria para r , el gradiente de la energía se considera como un vector en el caso de que se trabaje con coordenadas cartesianas (x, y, z) , para poder calcular el gradiente de la energía se realiza la derivación parcial con respecto a las coordenadas de referencia, lo cual quedaría, $\nabla U = (\partial U/\partial x, \partial U/\partial y, \partial U/\partial z)$, donde la energía se representa:

$$U = \frac{q_1 q_2}{r} \quad (4.15)$$

también se puede apreciar el campo eléctrico, el cual es:

$$\vec{E} = \frac{q_1}{r^2} \hat{\mathbf{r}} \quad (4.16)$$

con esta expresión se puede resumir a la fuerza de Coulomb como $\vec{F} = q_2 \vec{E}$, por otro lado también se puede resolver sin que exista una carga en un punto r , tomando como consideraciones posiciones arbitrarias en $r \neq 0$.

Si a partir del potencial de energía, tomamos a $q_2 = 1$, con esta expresión obtendremos el potencial electrostático ($\phi(r)$) el cual quedaría:

$$\phi(r) = \frac{q_1}{r} \quad (4.17)$$

este potencial se considera como el trabajo requerido para mover una partícula con carga unitaria (q_2), que se encuentra en algún punto del sistema hasta una longitud de distancia r , situando en el origen a una partícula con carga (q_1). La relación entre el campo eléctrico y el potencial electrostático, es que el campo es igual al inverso del gradiente del potencial electrostático ó $\vec{E} = -\nabla\phi$.

Por otro lado si la partícula con carga q_1 no se considera que se encuentra en el origen y se encuentra en un punto que sea r_0 o que sus componentes sean diferentes de cero, el potencial electrostático tiene una pequeña variante, en la cual, la distancia que existe entre q_1 y q_2 se considerará cómo el valor absoluto de la diferencia de la localización de las mismas, esto es $|r - r_0|$ y el potencial queda de la siguiente forma:

$$\phi(r) = \frac{q_1}{|r - r_0|} \quad (4.18)$$

donde la diferencia no es mas que:

$$|r - r_0| = [(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 + (z - z_0)^2]^{1/2} \quad (4.19)$$

otro fundamento de la electrostatica es el principio de superposición, en la cual la interacción electrostática entre dos partículas no se ve afectada por la presencia de otras cargas. En la mayoría de los campos de fuerza, los átomos de un sistema macromolecular son parametrizados utilizando cargas parciales en los núcleos simulando una distribución de cargas en el sistema. En estos sistemas las cargas y las posiciones estarían comprendidas desde q_1, q_2, \dots, q_N y r_1, r_2, \dots, r_N , respectivamente. Las ecuaciones quedarían de la siguiente manera,

$$U = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{r_{ij}} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N \frac{q_i q_j}{r_{ij}} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N q_i \phi(r_i) \quad (4.20)$$

donde el potencial electrostático, ahora toma la forma:

$$\phi(r_i) = \sum_{j \neq i} \frac{q_j}{r_{ij}} \quad (4.21)$$

de esta manera llegamos a la *ley de Gauss* y la ecuación de *Poisson*. Ahora si sabemos que la integral del campo \vec{E} sobre una superficie $S(2D)$, es la suma de la cantidad infinitesimal de $(\vec{E} \cdot \vec{n}) da$ sobre todos los puntos en S , donde n es el vector unitario normal a la superficie y da es el elemento infinitesimal del área de la superficie del campo, quedando de la siguiente manera:

$$\int_S (\vec{E} \cdot \vec{n}) da \quad (4.22)$$

Si ocupamos la ecuación (4.16), la dirección del campo eléctrico es paralela al vector desde el origen hasta \vec{r} , en este caso la fuerza del campo se mantiene y es perpendicular a la superficie o paralelo al vector n , y si ocupamos una superficie cerrada este sería ocupado por un volumen $V(3D)$. Entonces al resolver la integral nos daría una intensidad constante del campo q_1/r^2 veces para la suma de da o para la superficie total que en este caso se considera una esfera, por lo tanto, nos quedaría $4\pi r^2$ o $4\pi q_1$. Para este caso la *ley de Gauss* la generaliza, proponiendo que la carga q_1 sea generalizada a un conjunto arbitrario de cargas que tuvieran una carga total Q contenida en un volumen V , quedando que esta recolección de cargas en $4\pi Q$.

Si ahora en lugar de tomar las cargas como cargas discretas, se describen como una densidad de cargas suaves $\rho(\vec{r})$, la carga Q y el volumen V vendría dada por la integral ρ , llegando al mismo resultado que el campo eléctrico, el cual es el inverso del gradiente del potencial electrostático, por lo tanto, se puede escribir la *ley de Gauss* de la siguiente manera:

$$\int_{\delta V} \nabla \phi(\vec{r}) \cdot \vec{n} da = -4\pi Q = -4\pi \int_V \rho(\vec{r}) d\vec{r} \quad (4.23)$$

si ocupamos el teorema de divergencia del cálculo, se podría reescribir de la siguiente manera:

$$\int_V \nabla \cdot \nabla \phi(\vec{r}) d(\vec{r}) = -4\pi \int_V \rho(\vec{r}) d\vec{r} \quad (4.24)$$

como nos podemos dar cuenta esta ecuación es de manera puntual la ecuación de *Poisson*,

$$\nabla \cdot \nabla \phi(\vec{r}) = -4\pi \rho(\vec{r}) \quad (4.25)$$

Si ahora consideramos la electrostática en medios dieléctricos en lugar que en el vacío, ya que esto es necesario para la parte de solvatación del medio y en este caso tendremos que generalizar la ley de *Gauss* y la ecuación de *Poisson*. En este tipo de sistemas la ley de Gauss cambia un poco, ya que ahora en lugar del campo eléctrico \vec{E} pasaría a considerarse el desplazamiento eléctrico \vec{D} . Si suponemos este medio de solvatación de la forma de un medio isotropo lineal, donde sería $\vec{D} = \epsilon \vec{E}$ y ϵ es la permitividad del medio, la ley de Gauss establece que en este medio la integral de superficie sobre una superficie cerrada, el resultado sería 4π veces la carga total contenida en ella.

Para el caso en el que se adicionan iones al medio, la ley de Gauss se emplea modelando el ión como una carga puntual q con un radio a que se encuentra inmersa en un continuo dieléctrico, esta carga puntual tiene una constante dieléctrica de 1, mientras el sistema tiene una constante mayor a ϵ . Para este sistema en el caso de que en cualquier punto de una distancia r que cumpla $r > a$, el campo eléctrico tomaría la siguiente forma:

$$\vec{E}(r) = \frac{q}{\epsilon r^2} \hat{\mathbf{r}} \quad (4.26)$$

donde el potencial electrostático se representaría de la siguiente manera,

$$\phi(\vec{r}) = \frac{q}{\epsilon r} \quad (4.27)$$

cuando ahora se propone el campo dentro del radio de la esfera éste se mantiene, solo con las diferencias de que $\epsilon = 1$ y que esta dado para $r \neq 0$. Por lo tanto, cuando se considera el potencial electrostático para la superficie de la esfera, a éste se le adiciona el trabajo que se requiere para mover la carga dentro del campo y a su vez encontra de él, el cual quedaría de la siguiente manera:

$$\phi(\vec{r}) = \frac{q}{\epsilon a} + \frac{q}{r} - \frac{q}{a} \quad (4.28)$$

con este tipo de tratamientos o propuestas se obtienen resultados, que nos dicen que se pueden usar para calcular el trabajo de carga de un ión en un medio dieléctrico, y así llegando a la energía libre de solvatación de Born:

$$\Delta G = - \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \frac{q^2}{2a} \quad (4.29)$$

Aunque este tipo de modelos continuos se pueden analizarse mediante la ley de Gauss, ocupando la simetría esférica, para modelos continuos más generales de electrostática, como proteínas solvatadas, también se debe de considerar los medios

que tienen una permitividad de posición específica $\varepsilon(r)$. Para estos, se ocupa una variante más general de la ecuación de Poisson (ecuación 4.25):

$$\nabla \cdot \varepsilon(\vec{r}') \nabla \phi(\vec{r}') = -4\pi \rho_{libre}(\vec{r}') \quad (4.30)$$

La diferencia entre la ecuación (4.25) y esta, es que en la ecuación (4.30) considera una densidad de carga libre, en la cual la densidad de carga de una proteína es sometida en un tratamiento continuo, y en la ecuación (4.25) la densidad de carga es inducida en el continuo o en los límites dieléctricos.

Por último, si pudieramos considerar a los núcleos y a los electrones que componen a una molécula con sus cargas positivas y negativas, respectivamente; con un comportamiento clásico, la resolución de estos problemas sería de una manera sencilla. Como las fuerzas no electrostáticas que se encuentran en estos sistemas son muy pequeñas, al grado de considerarse insignificantes debido a la escala molecular, la evaluación de la energía potencial de la ecuación (4.20) sería de manera directa para una conformación del sistema, y esto se debería a que suponemos que los núcleos y electrones son partículas cargadas y por ende se conocen sus cargas con precisión. Por lo tanto, no habría necesidad de parámetros empíricos, y nuestro único problema sería generar un número considerable de conformaciones de núcleos y electrones para promediar. Desafortunadamente, los electrones no pueden describirse de manera clásica en términos de configuraciones como a diferencia de las configuraciones nucleares; la densidad electrónica es el observable físico relevante. Sin embargo, se puede decir que todas las interacciones moleculares se pueden derivar de la ley de Coulomb y los principios de la mecánica cuántica, expresados conjuntamente en la ecuación de Schrödinger.

El único problema con el enfoque anterior con respecto a las interacciones moleculares, es que la solución precisa de la ecuación de Schrödinger es posible solo para sistemas muy pequeños, debido a las limitaciones en los algoritmos y la capacidad de procesamiento de la computadora. Para sistemas de interés biológico, las interacciones moleculares deben aproximarse mediante el uso de campos de fuerza empíricos formados por términos parametrizados, la mayoría de los cuales no tienen relación con la ley de Coulomb.

4.1.3. Campo de Fuerzas

Existen varios campos de fuerzas y versiones ó conjunto de parametros a los cuales se les han ido agregando grupos de moléculas que anteriormente no se encontraban, así como reparametrizaciones de ángulos, enlaces, puentes de hidrógeno, entre otros, de las que ya contenían. Algunos de los primeros campos de fuerzas fueron: AMBER (Weiner y Kollman 1981, Pearlman *et al.* 1995, Cornell *et al.* 1995), CHARMM (Brooks *et al.* 1983, MacKerell *et al.* 1995, 1998), OPLS-AA (Jorgensen

y Tirado-Rives 1988, Jorgensen *et al.* 1996) y GROMOS (van Gunsteren *et al.* 1996), estos primeros conjuntos de parametros de cada campo de fuerzas fueron implementados para representaciones espectroscópicas y cristalográficas, a medida como fue evolucionando el poder computacional hizo posible la realización de simulaciones de líquidos y la inclusión de datos termodinámicos de fases condensadas [75].

Por ejemplo, la simulación de moléculas muy grandes como las proteínas es computacionalmente caro. Estas moléculas son representadas explícitamente y sus interacciones se modelan por medios clásicos, es decir, se basan en la aplicación de potenciales analíticos sencillos aplicados a las leyes de la mecánica clásica. Básicamente, los átomos se tratan como masas puntuales y la energía potencial del sistema se divide en varias contribuciones:

$$E = E_r + E_\theta + E_\phi + E_q + E_{vdW} + E_{acop} \quad (4.31)$$

Algunas fórmulas sencillas para los distintos términos son las siguientes:

- E_r es la energía de tensión de los enlaces. Se considera cada enlace como un resorte con una distancia de equilibrio r^0 y una constante de elasticidad κ^r , cuyos valores dependen del tipo de enlace del que se trate. La energía de cada enlace es proporcional a la desviación de su longitud respecto a la distancia de equilibrio:

$$E_r = \sum_i^{enl.} \kappa_i^r (r_i - r_i^0)^2 \quad (4.32)$$

- E_θ es la energía de flexión. Dos enlaces con un átomo en común forman un ángulo, que tiene el valor de equilibrio θ^0 y una constante de rigidez κ^θ . De manera similar a la tensión de los enlaces, la energía de flexión viene dada por:

$$E_\theta = \sum_i^{ang.} \kappa_i^\theta (\theta_i - \theta_i^0)^2 \quad (4.33)$$

- E_ϕ es la energía de torsión. Cada ángulo define un plano, los planos formados por dos ángulos que comparten un enlace forman un ángulo de torsión ϕ . La energía correspondiente a estas torsiones tiene la forma (n determina la simetría de cada torsión):

$$E_\phi = \sum_i^{tor.} \kappa_i^\phi [1 + \cos(n_i \phi_i)] \quad (4.34)$$

- E_q es la energía de la interacción electrostática. A cada átomo se le asigna una carga q y la interacción total se obtiene como:

$$E_q = \frac{1}{2} \sum_i^N \sum_j^N \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (4.35)$$

- E_{vdW} es la energía de van der Waals, que incluye la repulsión electrostática y las interacciones de dispersión entre los distintos átomos. Generalmente se modela mediante un potencial de Lennard-Jones, para cada pareja de átomos existen dos parámetros, σ_{ij} y ϵ_{ij} , la energía total es:

$$E_{vdW} = \sum_i^{i \neq j} \sum_j 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (4.36)$$

σ_{ij} es el diámetro de colisión entre dos partículas y ϵ_{ij} es la profundidad del pozo de potencial. Para sitios diferentes en la molécula, estos parámetros se calculan con las reglas de combinación de Lorentz-Berthelot:

$$\begin{aligned} \sigma_{ij} &= \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2} \\ \epsilon_{ij} &= \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \end{aligned} \quad (4.37)$$

- E_{acop} es la energía de acoplamiento entre los términos anteriores, que viene dada por términos cruzados que implican distintas distancias o ángulos. La introducción de estos términos cruzados -y de la consiguiente energía de acoplamiento- es muchas veces necesaria para obtener buenos resultados en las simulación. Algunos de los términos cruzados más empleados son los siguientes:

- Términos tensión-tensión:

$$E_{rr}^{ij} = \frac{1}{2} \kappa_{ij}^r \left[(r_i - r_i^0)(r_j - r_j^0) \right] \quad (4.38)$$

- Términos tensión-flexión:

$$E_{r\theta}^{ij} = \frac{1}{2} \kappa_{ij}^{r\theta} \left[(r_i - r_i^0) + (r_j - r_j^0) \right] (\theta_{ij} - \theta_{ij}^0) \quad (4.39)$$

- Términos tensión-torsión:

$$E_{r\phi}^{ij} = \kappa_{ij}^{r\phi} (r_i - r_i^0) \left[1 + \cos(n_j \phi_j) \right] \quad (4.40)$$

Naturalmente, estas fórmulas pueden complicarse introduciendo términos anarmónicos, otros términos de acoplamiento, términos adicionales que representen, por ejemplo, los enlaces de hidrógeno, etc. La forma concreta de los potenciales empleados, junto con el conjunto de valores asignados a los distintos parámetros, recibe el nombre de *campo de fuerzas*. En el presente trabajo se utilizó como campo de fuerzas GROMOS 54A7 [75], ya que las moléculas que se utilizaron fueron parametrizadas por un repositorio y creador de topologías automatizadas “ATB¹ (por sus siglas en inglés)” para ese campo de fuerzas.

Para el primer conjunto de parámetros de GROMOS, 45A4 (Daura *et al.* 1998; Schuler *et al.* 2001) estos fueron parametrizados frente a propiedades termodinámicas de cadenas alifáticas. En la siguiente generación, del campo de fuerzas de GROMOS, fueron reparametrizadas tanto las cadenas laterales de aminoácidos polares como el resto de la cadena principal o esqueleto del péptido, esto dio como resultado el conjunto de parámetros GROMOS 53A6 (Oostenbrink *et al.* 2004, 2005). Sin embargo, este nuevo campo de fuerzas, en el que las propiedades de hidratación de moléculas semejantes de aminoácidos eran similares al experimento, pero no mejoró la estabilidad de los pliegues dominantes de los péptidos (Oostenbrink *et al.* 2005), también se descubrió que las hélices cortas son menos estables de lo esperado. Por lo que los parámetros de los ángulos diedros de la red troncal o cadena principal que venían desde la versión anterior, ya no eran apropiados. Posteriormente, (Cao *et al.* 2009) propusieron una corrección en los términos del ángulo de torsión ϕ/ψ y se agregó un término cruzado de torsión que depende de la suma de los ángulos anteriormente mencionados [76].

4.1.4. Condiciones Periódicas de Frontera

El método de condiciones periódicas de frontera surge por los problemas de los efectos de superficie y por los tamaños de los sistemas en aquellos años, en el cual no se tenía una representación muy parecida a la real. Cuando se implementó este método se trabajaban sistemas con solo interacciones de corto alcance y con un potencial de esferas duras (*Lennard-Jones*). Las condiciones periódicas de frontera son representadas en dos dimensiones (2D), en el cual nuestro sistema se encuentra en una celda central y esta celda es replicada de manera infinita hacia esas dos dimensiones (ver figura (4.1)).

En este caso sabemos que cada átomo ocupa una posición $r_i = (x_i, y_i, z_i)$ en la celda original, por lo tanto en lo que respecta a sus replicas, las posiciones de estas imágenes de átomos serían $\vec{r}_i + \vec{n}L = (x_i + n_1L, y_i + n_2L, z_i + n_3L)$ donde $\vec{n} = (n_1, n_2, n_3)$, para todos los posibles triples enteros. Para este método la distancia $r_{ij} = \min_n |\vec{r}_j + \vec{n}L - \vec{r}_i|$, entre los átomos i y j , esto quiere decir que se toma como

¹<https://atb.uq.edu.au>

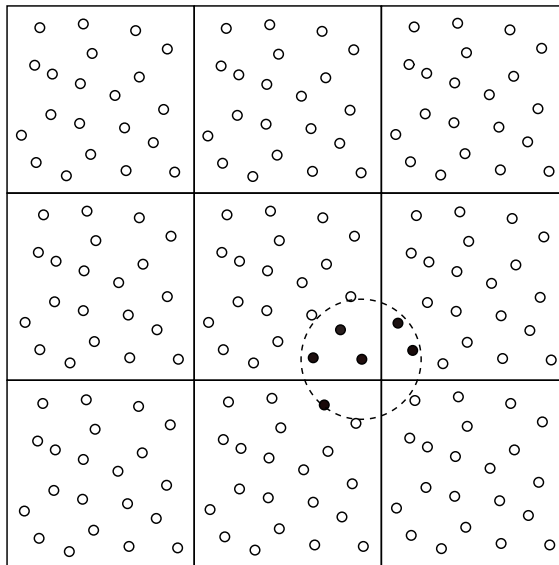


Figura 4.1: Representación de condiciones periódicas de frontera.

la distancia mínima entre el átomo i y la imagen más cercana del átomo j .

Ahora bien, si se consideran interacciones de corto alcance (LJ) como en los inicios de su implementación, las distancias entre los átomos se restringirían aún más, en las cuales solo se ocuparían las que se encuentran dentro del potencial de interacción (ver figura (4.1)), esto aplica para sistemas donde no se toma en cuenta las interacciones electrostáticas. En sistemas biológicos donde si se toman en cuenta estas interacciones, no se pueden truncar de manera arbitraria, por lo que se han desarrollado varias propuestas de truncamiento modificados, algunos modificando el potencial de Coulomb; pero en general todas estas propuestas muestran problemas en diferentes puntos: algunos en la conservación de la energía, en inestabilidades en las interacciones, otros no eran claras la similitud de la modificación con respecto a la electrostática básica, unos más solo son apropiados para simulaciones de líquidos y tienen que tomar diferentes valores de la constante dieléctrica, por último la propuesta de sumas de Ewald se han aplicado en sistemas de líquidos de manera satisfactoria durante muchos años, y a su vez en sistemas macromoleculares se ha considerado como un estándar en las simulaciones.

4.1.5. Sumas de Ewald

Las técnicas de simulación han requerido una suma eficiente de las interacciones electrostáticas de largo alcance. Para ello este método es uno de los más utilizados en el cual, el potencial electrostático de un punto r en la celda central que no coincide con ninguna posición atómica \vec{r}_i para $i = 1, \dots, N$, se obtiene sumando directamente

el potencial de Coulomb sobre todo los átomos y todas sus imágenes:

$$\phi(r) = \frac{1}{2} \sum_n' \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{|\vec{r}_{ij} + \vec{n}L|} \quad (4.41)$$

donde la suma externa está sobre todos los triples enteros $\vec{n} = (n_1, n_2, n_3)$, la suma es prima porque se omite \vec{n} cuando $i = j$, y $\vec{n}L = (n_1L, n_2L, n_3L)$, donde L es la longitud de la caja de simulación, y esta puede ser sustituida por V considerando el volumen de la caja. Este potencial $\phi(r)$ es infinito sí la celda central no es neutra, es decir, la suma de las cargas q_i no es cero, por lo contrario, es un ejemplo de una serie infinita convergente, por lo que sería necesario tratarlo cuidadosamente. El potencial depende del orden en que se calculan las sumas parciales sobre n , y esta suma converge lentamente debido al largo alcance de las fuerzas electrostáticas y es condicionalmente convergente. Por ejemplo, para enteros positivos k , definida $\phi_k(r)$ como:

$$\phi_k(r) = \frac{1}{2} \sum_{|n| \leq k}' \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{|\vec{r}_{ij} + \vec{n}L|} \quad (4.42)$$

y si se considera el límite de $\phi_k(r)$ cuando $k \rightarrow \infty$. Este proceso limitante se representa en la siguiente figura (4.2), en el cual, el límite en general depende de la forma asintótica de los grupos. Para una k mayor, el potencial $\phi_k(r)$ será el potencial en un punto r en la celda central, en este caso se considera un cristal esférico macroscópico [77], y este cristal se encuentra inmerso en un continuo dieléctrico, si el continuo tiene una constante dieléctrica infinita, el potencial es independiente de la forma del cristal y este es igual al potencial de Ewald [78], de lo contrario, el potencial no solo contemplaría el potencial de Ewald sino se le agregaría un término más, el cual dependerá, de la constante dieléctrica del continuo, la forma macroscópica del cristal y el momento dipolar de la celda unitaria replicada.

La idea principal, es suponer que cada carga (q) en el cristal está rodeada por un par de densidades de cargas continuas. Estas densidades tienen la forma de gaussianas centradas en (r_i) , la diferencia es que una tiene una carga total $(-q_i)$ y se define como densidad de contraión (ρ_1), y la otra densidad tiene una carga total (q_i) y esta se define densidad de co-ión (ρ_2); con esto obtenemos el potencial de la suma recíproca de largo alcance.

donde la anchura de la distribución es igual a $\sqrt{2/\beta}$ y ρ_i esta definida de la siguiente forma:

$$\rho_i = -q_i \left(\frac{\beta}{\pi}\right)^{3/2} \exp[-\beta r^2] \quad (4.43)$$

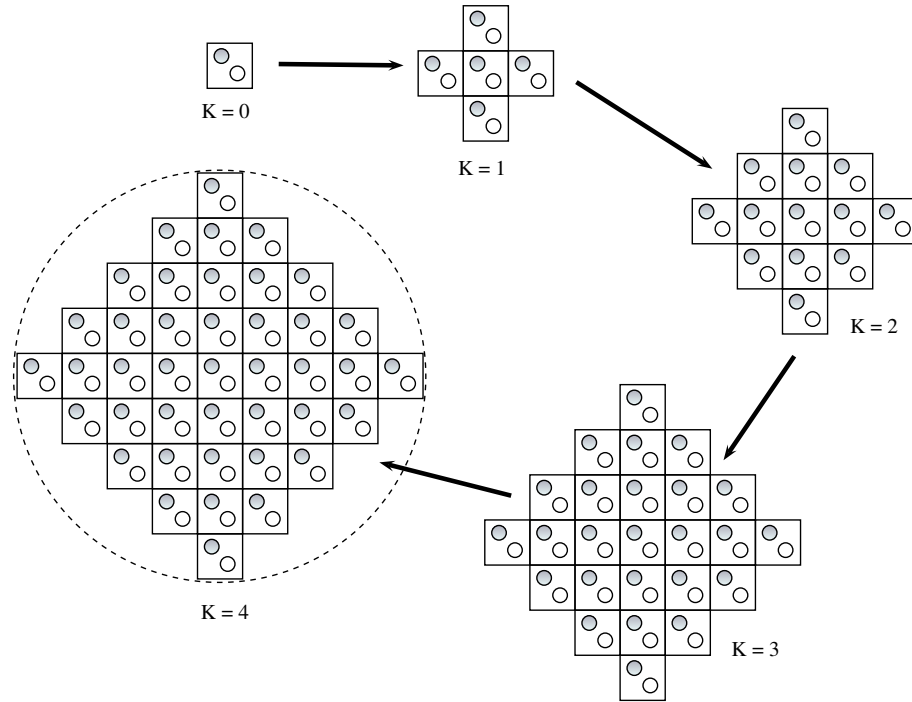


Figura 4.2: Representación de condiciones periódicas de frontera, con un grupo y celdas finitas de simulación replicadas. Los cationes se presentan como círculos sombreados; aniones como círculos abiertos.

En este caso, el potencial electrostático para el átomo i es debido exclusivamente a la fracción de la carga q_i que no está apantallada y a grandes distancias, esta fracción decae rápidamente a cero y entonces dependerá de la distribución de carga apantallante. Si este potencial es igual a él mismo junto con las densidades de contraión y de co-ión; entonces, esto sería cierto para todos los átomos i y todas sus respectivas imágenes periódicas. Por lo tanto, podríamos separar el potencial total en tres potenciales, todos con cargas (q_i): el primer potencial ϕ_1 debido a la densidad ρ_1 , el segundo potencial ϕ_2 debido a la densidad ρ_2 y por último el tercer potencial ϕ_0 que correspondería a la carga puntual o término propio.

$$\phi_{tot} = \phi_0 + \phi_1(\vec{r}_{ij}) + \phi_2(\vec{r}_{ij}) \quad (4.44)$$

La finalidad de esta distribución no es solo que sea una función que varíe suavemente sino que además es periódica. Si esta función se expresa de forma de la ecuación de Poisson (ver ecuación 4.25) en coordenadas polares esféricas (r, θ, ϕ) y enseguida ser representada en una serie de Fourier, quedando de la siguiente manera el potencial $\phi_1(\vec{r}_{ij})$:

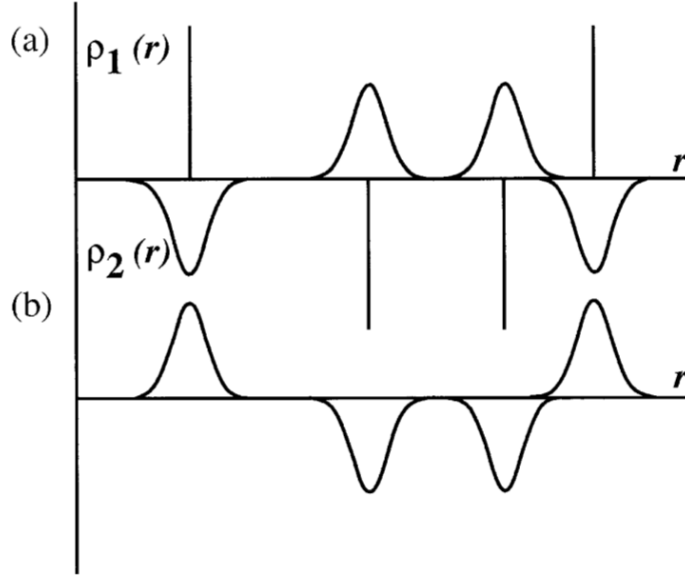


Figura 4.3: (a) Representación de la suma de las cargas puntuales por líneas verticales, más la densidad de contraíón (ρ_1). (b) Representación de la densidad de co-ión (ρ_2).

$$\phi_1(\vec{r}_{ij}) = \frac{1}{2} \sum_n' \sum_{ij} q_i q_j \frac{\text{erfc}(\beta |\vec{r}_{ij} + \vec{n}|)}{|\vec{r}_{ij} + \vec{n}|} \quad (4.45)$$

Para el potencial ϕ_2 la finalidad sería la misma, solo notemos que $\phi_2(\vec{r}_{ij}) = \phi_2(\vec{r}_{ij} + \vec{m}L)$ para cualquier entero triple de m , donde $\vec{m} = (m_x, m_y, m_z)$, de igual manera que \vec{n} se omite cuando $i = j$, y L es el largo de la caja, que también puede ser sustituida por V cuando se considera el volumen de la misma. Por lo tanto, esto es simplemente una suma desplazada sobre las imágenes, la cual quedaría:

$$\phi_2(\vec{r}_{ij}) = \frac{1}{2\pi L} \sum_{ij} q_i q_j \sum_m' \frac{\exp[-(\pi \vec{m}/\beta)^2 + 2\pi i \vec{m} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j)]}{\vec{m}^2} \quad (4.46)$$

Por último el potencial ϕ_0 queda de la siguiente forma,

$$\phi_0 = \frac{\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_i q_i^2 \quad (4.47)$$

Finalmente, el parámetro β determina la anchura de las gaussianas de las densidades de contraíón y de co-ión, la asignación de su valor se da por conveniencia

computacional. Por ejemplo, dado que la función error complementaria ($erfc$), para $(\beta r)/r$ decae exponencialmente, β puede elegirse de tal modo que $erfc(\beta r)/r$ sea insignificante para $r > L/2$, y el potencial ϕ_1 se puede restringir a pares de imágenes mínimos. Por otro lado, el orden de la suma para \vec{m} tendría que ser el necesario para que converja el potencial ϕ_2 , en el cual no crece con el tamaño del sistema, y dado a que esta suma es un cálculo de orden N , su potencial también sería de orden N . Sin embargo, el costo computacional para el potencial ϕ_1 aumentaría a N^2 .

Por lo contrario, si β se elige de manera que el potencial ϕ_1 se pueda truncar a un valor de corte fijo, por ejemplo, $1nm$. En este caso, el potencial ϕ_1 se convierte en un cálculo de orden N . Desafortunadamente, el orden de la suma de \vec{m} para que converja el potencial ϕ_2 aumentaría linealmente con el tamaño del sistema, logrando que el cálculo del potencial ϕ_2 sea del orden N^2 . La elección óptima para el valor del parámetro β debe de ser tal que, los cálculos para los potenciales ϕ_1 y ϕ_2 sean del orden de $N^{3/2}$ [77].

4.1.6. Ensamble NVT

Mientras que el uso directo de la dinámica molecular da lugar al ensamble NVE (número constante de partículas, volumen constante, conjunto de energía constante), la mayoría de las cantidades que deseamos calcular son en realidad un ensamble a temperatura constante (NVT), también llamado ensamble canónico.

Los algoritmos de termostato tienen como propósito generar un ensamble termodinámico a temperatura constante, lo cual se logra con la modificación del esquema Newtoniano de dinámica molecular. Para estimar la temperatura en el ensamble canónico (NVT) debemos de considerar;

- Preservar correctamente la distribución de los microestados en el conjunto canónico.
- Preservar una dinámica realista en el sentido en que las ecuaciones de movimiento se pueden utilizar para calcular las cantidades de transporte con precisión.

con respecto a la termodinámica del sistema, queremos reproducir las probabilidades de conjunto del ensamble canónico,

$$P(p^{3N}, r^{3N}) \propto \frac{e^{-\beta H(p^{3N}, r^{3N})}}{Q(T, V, N)} \quad (4.48)$$

donde:

$$Q(T, V, N) = \frac{1}{h^{3N} N!} \int e^{-\beta H(p^{3N}, r^{3N})} dr^{3N} dp^{3N} \quad (4.49)$$

Usando el teorema de equiparticipación de la energía, podemos considerar la siguiente estimación de la temperatura,

$$T = \frac{2\langle K \rangle}{nK_B} \quad (4.50)$$

donde, n es el número de grados de libertad en el sistema, se debe conservar el impulso neto, entonces $n = 3N - 3$. Sin embargo, para sistemas suficientemente grandes la sustracción de los 3 grados de libertad de el centro de masa tiene poco efecto ya que es pequeña en relación con $3N$. La temperatura cinética instantánea $T = \langle T_{ins} \rangle$ se define como,

$$T_{ins} = \frac{2K}{nK_B} \quad (4.51)$$

Notemos que $\langle K \rangle$ fluctúa durante la simulación, entonces la temperatura instantánea también fluctuara.

Un termostato comunmente utilizado para la etapa de equilibración del sistema es el denominado reescalamiento de velocidades (*V-rescale*) [79], el cual consiste en multiplicar las velocidades de todas las partículas por un mismo factor (α), el cual es:

$$\alpha = \sqrt{\frac{K_t}{K}} \quad (4.52)$$

este factor es calculado mediante la energía cinética total (K) y la energía cinética con una distribución canónica a la temperatura deseada K_t , con la idea de que la siguiente K_t sera asignada por la anterior energía cinética total. Este factor al ser ocupado para todas las partículas, no genera problemas para las longitudes de enlace y centros de masa. También solo es ocupado cuando el sistema excede los limites de valores determinados de la energía cinética y cuando no son excedidos, es usado a una frecuencia predeterminada. Por otra parte, este termostato no se recomienda utilizar cuando el sistema es pequeño y los observables de interés dependen de las fluctuaciones y no de los promedios. Este termostato a parte de tender rápidamente al equilibrio como el termostato de Berendsen, también podemos muestrear realmente el ensamble canónico una vez que el sistema alcanza el equilibrio, a diferencia de el de Berendsen; ya que el termostato considera una distribución canónica.

Otro termostato para un ensamble NVT y que es el más comunmente utilizado, es el termostato de cadenas de *Nosé-Hoover* [80]. El fundamento del termostato original de Nosé-Hoover, trata la dinámica de un sistema en contacto con un depósito térmico, esto hace que se agregue un grado de libertad el cual representa al depósito y por ende, se modifican las ecuaciones de movimiento de Lagrange, haciendo que estas ecuaciones se extiendan; una extensión puede hacerse sobre el Lagrangiano o sobre el Hamiltoniano.

$$H_{Nosé} = \sum_{i=1}^N \frac{\vec{p}_i^2}{2m_i} + U(\vec{r}_i) + \frac{\xi 2Q}{2} + \frac{gs}{\beta} \quad (4.53)$$

Donde $\beta = 1/k_B T$, Q es la masa efectiva asociada a s , g es el parámetro relacionado con grados de libertad en el sistema, y $\xi = p_s/Q$ es el coeficiente de fricción termodinámico. Los valores de los demás parámetros dependen del valor asignado de Q . Por lo tanto, si el valor asignado de Q es demasiado alto daría como resultado un flujo de energía lento entre el sistema y el depósito. Por otro lado, si el valor de Q es demasiado bajo, la energía presenta oscilaciones de larga duración y débilmente amortiguadas, lo cual produce un equilibrio deficiente.

Por último, este termostato suele presentar en algunos casos problemas de ergodicidad y por lo mismo no se logra la distribución deseada, por lo que Martyna *et al.* [81], proponen que el termostato se acople a otro termostato y si es necesario a una cadena de termostatos, logrando que los problemas presentados de ergodicidad se eliminen y se mantenga la distribución canónica deseada; obteniendo el termostato de cadenas de Nosé-Hoover.

4.1.7. Ensamble NPT

Así como existen experimentos que se realizan a volumen constante, existen otros que se realizan a presión constante, por lo que se han desarrollado algoritmos en la parte de simulación para poder modelar ese tipo de experimentos, como en el ensamble NVT. Por lo tanto, se debe incluir al volumen como una variable dinámica, proponiendo un espacio fase extendido. Esto ocasiona que las ecuaciones de movimiento se han determinadas en un sistema tal que, las posiciones y los momentos de todas las partículas se escalen por un factor proporcional a la raíz cúbica del volumen del sistema.

Un barostato propuesto es el de Berendsen [82], en el cual propone un reescalamiento de las coordenadas de cada partícula en cada paso del tiempo, con una matriz μ , donde:

$$\mu = \left[1 - \frac{\beta \Delta t}{\tau_p} (P_0 - P) \right]^{1/3} \quad (4.54)$$

Aquí, Δt es el tamaño del paso de tiempo, τ_p es el tiempo de relajación característico, β es la compresibilidad isotérmica, P_0 es la presión constante externa y P es la presión instantánea, la cual se calcula de la siguiente manera:

$$P = \frac{2}{3V} \left[E_k + \frac{1}{2} \sum_{i < j} \vec{r}_{ij} \cdot \vec{F}_{ij} \right] \quad (4.55)$$

Donde V es el volumen, E_k es la energía cinética, \vec{r}_{ij} es el vector entre la partícula i y la partícula j , y \vec{F}_{ij} es el vector de fuerza entre la partícula i y la partícula j ; hay que tener en cuenta que aunque aparezca β en el cálculo del factor de escalamiento, no necesitamos conocerla siempre y cuando el paso del tiempo y la constante de acoplamiento se elijan de tal manera que $\tau_p > 100\Delta t$. Este barostato se implementa en su mayoría en la equilibración del sistema y muy poco en la obtención de parámetros termodinámicos.

Otro barostato es el propuesto por *Parrinello y Rahman* [83], donde extendieron el método de Andersen al caso de que la celda de simulación no sea cúbica y derivaron un nuevo Lagrangiano para el sistema extendido. Aunque sus ecuaciones de movimiento son diferentes de las ecuaciones originales de Andersen, estas producen un conjunto idéntico. Esta técnica es similar al termostato de Nosé-Hoover, los cuales se pueden acoplar tal que, pueden producir una dinámica molecular a temperatura y presión constante, y así poder obtener el ensamble NPT. Esto se logra ya que este barostato no solo puede llegar a modificar los ángulos de la celda de simulación, sino también las dimensiones de la misma, la cual se define por una matriz b .

$$\frac{d\vec{b}^2}{dt^2} = V \vec{W}^{-1} \vec{b}^{-1} (\vec{p} - \vec{p}_0) \quad (4.56)$$

$$(W^{-1})_{ij} = \frac{4\pi^2 \beta_{ij}}{3\tau_p^2 L} \quad (4.57)$$

donde V es el volumen, \vec{p} es la matriz de la presión instantánea, \vec{p}_0 es la matriz de la presión de referencia y W es la matriz de la fuerza de acoplamiento, la inversa (\vec{W}^{-1}) de esta matriz determina el grado de deformación de la celda de simulación, L es el largo de la celda, β es la compresibilidad isotérmica y τ_p es la constante de tiempo de presión.

4.2. Modelo de Agua (TIP4P/ε)

En la actualidad existen diferentes modelos de agua que pretenden representar las propiedades físicas y químicas de la molécula de agua real, entre los cuales están: 3

sitios, 4 sitios, 5 sitios y 6 sitios. En general, el campo de fuerzas intermolecular entre dos aguas es representado por interacciones coulómbicas e interacciones tipo *Lennard-Jones* (ver ecuación 4.58); cada modelo tiene su peculiaridad, para los modelos que consideran sólo 3 sitios, cada sitio es un átomo y su carga específica así como su masa (ver figura (4.4(a))); para los modelos que consideran 4 sitios, en estos modelos el cuarto sitio es la carga del átomo de oxígeno y ésta se encuentra a una pequeña distancia alejada hacia dentro de la molécula de agua (ver figura (4.4(b))), para los modelos de 5 sitios, es similar a los modelos de 3 sitios solo con la diferencia de que en estos modelos son considerados las cargas de los pares de electrones libres (ver figura (4.4(c))) y por último para el modelo de 6 sitios, toma en consideración el sitio virtual de los modelos de 4 sitios y los pares de electrones libres de los modelos de 5 sitios (ver figura (4.4(d))), en este trabajo sólo fue considerado el modelo de agua de 4 sitios, en específico el modelo $TIP4P/\epsilon$ [84].

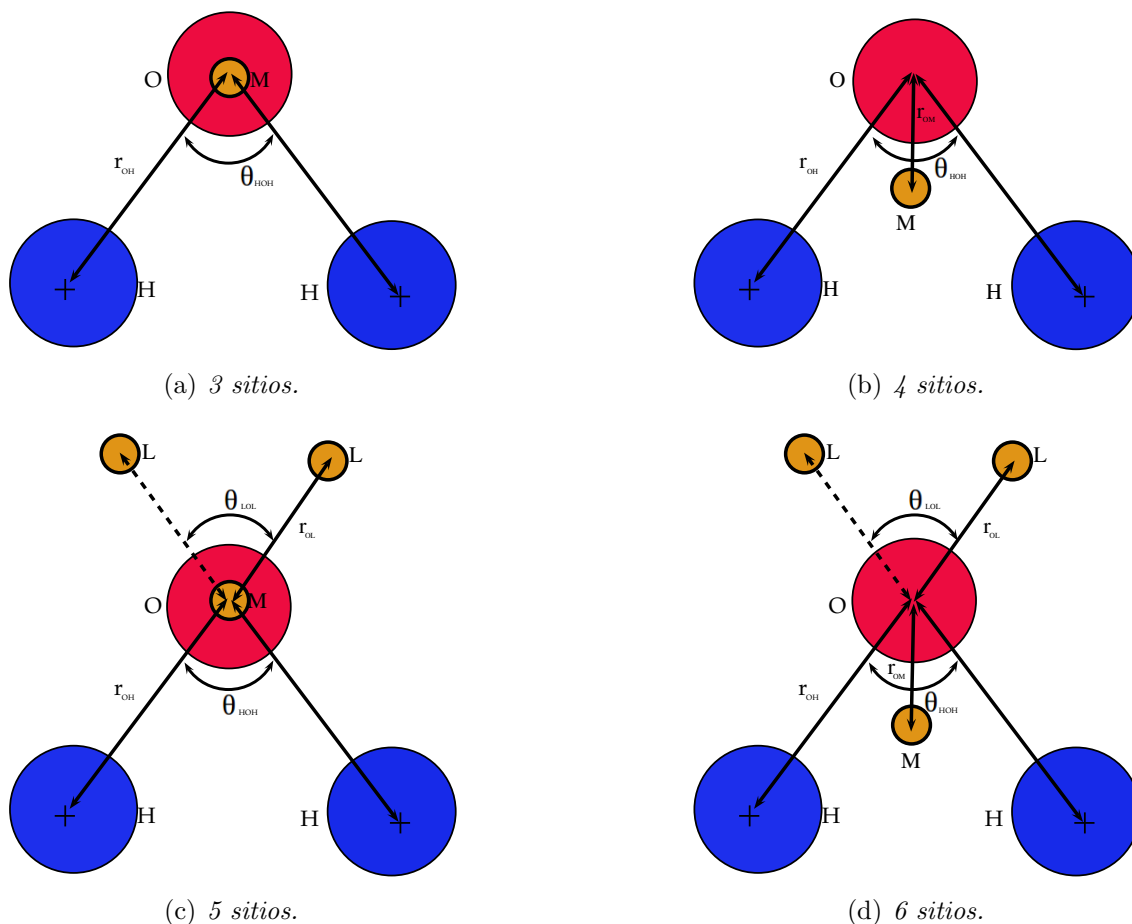


Figura 4.4: Representación esquemática de los diferentes modelos de agua

En general, los modelos de 4 sitios son representados por 2 átomos de hidrógeno

donde se encuentran localizadas sus cargas (q), un átomo de oxígeno y por la carga del átomo de oxígeno, la cual se encuentra localizada en el sitio virtual (M), y este sitio es localizado en la bisectriz del ángulo θ_{HOH} , por medio de este sitio se presenta un momento dipolar en estos modelos. El sitio donde se encuentra el átomo de oxígeno es considerado un potencial de interacción tipo *Lennard-Jones*, mientras que para los restantes sitios donde son localizadas las cargas, se tiene un potencial Coulómbico:

$$u(r_{ij}) = 4\epsilon_{OO} \left[\left(\frac{\sigma_{OO}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{OO}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (4.58)$$

donde las variables $\sigma_{OO} = 3.165 \text{ \AA}$ y $\epsilon_{OO}/k_B = 93 \text{ K}$ son, el diámetro de colisión entre dos oxígenos y la profundidad del pozo del potencial de interacción entre estos mismos átomos, respectivamente. La variable r_{ij} es la distancia entre los sitios i y j , donde se encuentran las cargas q_i y q_j . La constante ϵ_0 es la permitividad del vacío, el sitio M no tiene una masa, pero la fuerza que es ejercida sobre este sitio se distribuye entre los demás sitios. Los enlaces O-H tienen una longitud de $r_{OH} = 0.9572 \text{ \AA}$, las cargas $q_H = 0.527 e$ y estas se encuentran en los sitios de los hidrógenos, la longitud $r_{OM} = 0.105 \text{ \AA}$, y esta va desde el sitio donde se encuentra el átomo de oxígeno al sitio M , el ángulo que se forma entre los tres átomos es $\theta_{HOH} = 104.52^\circ$ y el momento dipolar es $\mu = 2.4345 D$. Por último, se ocupó este modelo de agua por varias razones, la primera es que el costo computacional es idéntico al del modelo TIP4P y las demás, es que reproduce de mejor manera algunas anomalías termodinámicas y de transporte del agua, así como también la constante dieléctrica, propiedades termodinámicas, dinámicas y estructurales a diferentes temperaturas y presiones.

4.3. Cálculo de Energía Libre

4.3.1. Energía Libre

La energía libre es una de las magnitudes más importantes de la termodinámica y juega un papel fundamental en todos los procesos químicos. Normalmente esta magnitud se expresa como la función de Helmholtz, (A), o la función de Gibbs, (G).

La energía libre de Helmholtz (ver ecuación 4.59) es apropiada para sistemas en los que se mantienen constantes el número de partículas, la temperatura y el volumen (NVT):

$$A = U - TS \quad (4.59)$$

$$\delta A = -p\delta V - S\delta T \quad (4.60)$$

la energía libre de Gibbs (ver ecuación 4.61), por su parte, se emplea cuando se mantienen constantes el número de partículas, la temperatura y la presión (NPT).

$$G = U + pV - TS \quad (4.61)$$

$$\delta G = V \delta p - S \delta T \quad (4.62)$$

La energía libre es una magnitud difícil de calcular en simulaciones computacionales, especialmente en sistemas como líquidos y macromoléculas flexibles, ya que tienen muchas configuraciones de energía parecidas y separadas por barreras energéticas de poca magnitud. La energía libre no puede determinarse de manera precisa a partir de una simple simulación (dinámica molecular o de Monte Carlo), debido a que estas simulaciones no muestrean de manera adecuada las regiones del espacio de configuraciones que contribuyen de forma importante a la energía libre; ya que dicho muestreo puede situarse en un mínimo local de energía y éste contener una barrera de máxima energía que provoque no poder muestrear de mejor manera todas las configuraciones posibles y así poder determinar cual sería la de mínima energía global.

Para dicho cálculo se puede aplicar la teoría canónica del estado de transición, la cual explica la velocidad de la reacción de reacciones químicas. Teniendo en consideración que los reactivos se encuentran en equilibrio térmico a una temperatura T y cuando existe una distribución Maxwell-Boltzmann [85].

Para nuestro trabajo se consideró la función de partición para el ensamble isotérmico-isobárico ($\rho(r)$) de un sistema, el cual se puede calcular a través de una integral sobre todo el espacio fase, es decir, el espacio de configuración y el espacio de momento. Si la energía potencial (U) es independiente del momento, la integral sobre este último es una constante que multiplica a ($\rho(r)$), la cual puede ser ignorada. Entonces ($\rho(r)$) quedaría [85]:

$$\rho(r) = \int \int e^{-\beta(pV+U(r))} dr dV \quad (4.63)$$

Con $\beta = 1/(k_B T)$, donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, p es la presión del sistema y V es el volumen del sistema. La energía libre de Gibbs (G) está relacionada con ρ a través de $G = -k_B T \ln \rho(r)$.

Para un perfil de energía libre con simulación molecular se utiliza alguna de las siguientes técnicas: perturbación de energía libre (*PEL*), integración termodinámica (*IT*) y potencial de fuerza media (*PFM*). En este trabajo se ocupó PFM por medio de *Umbrella Sampling* [86].

4.3.2. Potencial de Fuerza Media

La técnica de PFM (ver ecuación 4.64) se centra en obtener el cambio de la energía libre entre dos estados en función de uno o varios grados de libertad, ya que este es de

gran interés para determinar el mínimo de energía en la adsorción de una molécula en solución. Estos grados de libertad pueden llegar a ser coordenadas reales o una combinación de ellos, a estos grados de libertad se llaman coordenada de reacción (ξ). El PFM propuesto por Kirkwood [86] se basa en una distribución canónica (N,V,T), y este a su vez también proviene del teorema del trabajo reversible. Por lo tanto, el obtener la energía libre de Helmholtz ΔA (ver ecuación 4.65) por medio de PFM es lo más común. Un punto interesante es que el PFM se puede obtener a partir de dos maneras diferentes; una de ellas es obtenerlo a través de una integral de la trayectoria sobre la fuerza media o promedio (FM) en la molécula de interés. La otra forma es que el PFM está relacionado con el logaritmo de la función de correlación de pares, que en casos de adsorción se convierte en la densidad local [87].

$$w(\xi_2) - w(\xi_1) = \int_{\xi_1}^{\xi_2} d\xi \left\langle \frac{\delta H}{\delta \xi} \right\rangle \quad (4.64)$$

donde H es el Hamiltoniano y $w(\xi) = -k_B T \ln Q(\xi)$; k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y $Q(\xi)$ es la función de partición dependiente de ξ , de esta manera el PFM se conecta con la energía libre de Helmholtz.

$$A = -k_B T \ln Q(r) \quad (4.65)$$

Si la integral sobre el Hamiltoniano con respecto a la coordenada (ξ), sólo la energía potencial total ($U_{tot.}$) depende de ξ . Sabiendo que $U_{tot.}$ es la suma de todas las energías de interacción del sistema (ver ecuación (4.66)) con sus respectivas posiciones (r_1, \dots, r_N).

$$U_{tot.} = U_{c-w} + U_{h-w} + U_{w-w} + U_{c-cl} + U_{c-na} + U_{h-cl} + U_{h-na} + U_{w-cl} + U_{w-na} + U_{c-h} \quad (4.66)$$

Donde $U_{c-w} = U_{c-w}(r_1, \dots, r_N, r_c)$ define la interacción de la ciclodextrina con las moléculas de agua y r_c es la posición de la ciclodextrina, $U_{h-w} = U_{h-w}(r_1, \dots, r_N, r_h)$ denota la interacción de la molécula huésped con las moléculas de agua y ξ_h es la posición de la molécula huésped (ácido ferúlico), $U_{w-w} = U_{w-w}(r_1, \dots, r_N)$ significa la interacción entre las moléculas de agua, $U_{c-cl} = U_{c-cl}(r_1, \dots, r_N, r_c)$ sería la interacción entre la ciclodextrina y los iones de cloro, $U_{c-na} = U_{c-na}(r_1, \dots, r_N, r_c)$ determina la interacción entre la ciclodextrina y los iones de sodio, $U_{h-cl} = U_{h-cl}(r_1, \dots, r_N, r_h)$ define la interacción de la molécula huésped con los iones de cloro, $U_{h-na} = U_{h-na}(r_1, \dots, r_N, r_h)$ denota la interacción de la molécula huésped con los iones de sodio, $U_{w-cl} = U_{w-cl}(r_1, \dots, r_N)$ significa la interacción de las moléculas de agua con los iones de cloro, $U_{w-na} =$

$U_{w-na}(r_1, \dots, r_N)$ determina la interacción de las moléculas de agua con los iones de sodio y $U_{c-h} = U_{c-h}(r_c, r_h)$ define la interacción de la ciclodextrina con la molécula huésped. Entonces, ya que sólo la función de partición configuracional (Q_r) depende de la posición de la molécula huésped r_h y la posición de la ciclodextrina (r_c) es conocida, Q_r se podría escribir de la siguiente manera;

$$Q_{rh} = \int e^{-\beta(U(r_h))} dr \quad (4.67)$$

Si las posiciones de las moléculas de interés siguen una coordena de reacción podemos decir que; la posición de la ciclodextrina es el sitio de referencia de la coordenada de reacción ($r_c = \xi_c = \xi_1$), la posición de la molécula huésped la podemos denotar como ξ_h y la posición en el cual la molécula huésped está alejada de la ciclodextrina y no existe una interacción entre ellas la podemos definir como ξ_2 , el PFM quedaría de la siguiente manera:

$$\frac{\delta A}{\delta \xi_h} = \left(\frac{1}{Q_{rh}} \right) \int \left(\frac{\delta U}{\delta \xi_h} \right) e^{-\beta U} d\xi \quad (4.68)$$

Notemos que $\delta U / \delta \xi_h = -F_{\xi_c \xi_h}$, donde $F_{\xi_c \xi_h} = F_{\xi_c \xi_h}(|\xi_h - \xi_c|)$ es la fuerza entre las dos moléculas de interés y ahora podemos reescribir la anterior ecuación, como;

$$\frac{\delta A}{\delta \xi_h} = \left\langle \frac{\delta U}{\delta \xi_h} \right\rangle = -\langle F_{\xi_c \xi_h} \rangle \quad (4.69)$$

Entonces el cambio de la energía libre de Helmholtz con respecto a la posición de una de las moléculas de interés (ξ_2), en la cual siga una coordenada de reacción ξ para acercarse a la molécula de referencia (ξ_c) sería;

$$\Delta A = \int \frac{\delta A}{\delta \xi_h} d\xi = -\langle F_{\xi_c \xi_h} \rangle \quad (4.70)$$

Entonces, si ahora proponemos una distribución isotérmico-isobárico (N,P,T) la energía libre que obtendremos sería la de Gibbs. Si consideramos el cálculo de la energía libre a lo largo de una coordenada de reacción específica ξ , ya que es una pieza de información valiosa, y a este perfil se incluyen las características de cinética, energética y mecánica de la reacción. Ese perfil de energía libre se puede calcular a través de la siguiente relación:

$$G(\xi) = -k_B T \ln(\rho(\xi)) \quad (4.71)$$

Donde $G(\xi)$ representa la energía libre, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y la función $\rho(\xi)$ (ver ecuación 4.72) es la distribución de probabilidad, que puede evaluarse a partir de una dinámica molecular [88].

$$\rho(\xi) = \int \int e^{-\beta(pV+U(\xi))} d\xi dV \quad (4.72)$$

Si los límites de ξ son ξ_1 y ξ_2 , $\xi_1 = \xi_c$ que sería la coordenada de referencia (posición de la ciclodextrina), ξ_h es la coordenada de la molécula huésped y ξ_2 es la coordenada en la cual las moléculas se encuentran alejadas entre si. Para este sistema se propone una función de partición configuracional de la siguiente manera:

$$\rho_c = \int \int e^{-\beta(pV+U(\xi))} d\xi dV \quad (4.73)$$

Ahora si resolvemos la integral de la distribución configuracional que no depende de ξ , obtendríamos la siguiente representación,

$$\rho_c = -\frac{e^{-\beta pV}}{\beta p} \int e^{-\beta(U(\xi))} d\xi + cte. \quad (4.74)$$

Donde $\beta = k_B T$; k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta, p es la presión a la que se encuentra el sistema, V es el volumen del sistema. Recordemos que señalamos que la función de partición sólo depende de la coordenada ξ_h ya que se considera un medio diluido, en el cual interactúan nuestras moléculas de interés. Entonces, $\rho_c = \rho_{\xi_h}$ y podríamos reescribir la energía libre de Gibbs con la función de partición configuracional dependiente de ξ_h , como:

$$G(\xi_h) = -k_B T \ln(\rho(\xi_h)) \quad (4.75)$$

$$\frac{\delta G}{\delta \xi_h} = \left(\frac{e^{-\beta pV}}{\beta p \rho(\xi_h)} \right) \int \left(\frac{\delta U}{\delta \xi_h} \right) e^{-\beta U} d\xi \quad (4.76)$$

$$\frac{\delta G}{\delta \xi_h} = \left\langle \frac{\delta U}{\delta \xi_h} \right\rangle = -\langle F_{\xi_c \xi_h} \rangle \quad (4.77)$$

Sin embargo, para obtener una estimación razonable de $\rho(\xi_h)$ que garantice un muestreo estadístico exacto, el sistema debe visitar cada valor ξ un número considerable de veces. Esto será generalmente el caso sólo en superficies de energía potencial poco profundas. En cambio, las regiones inestables serán de difícil acceso, ya que las barreras de la energía de unos pocos $k_B T$, aún haciendo una larga dinámica molecular puede no ser suficiente para recuperar una función de distribución fiable, debido a un muestreo desequilibrado de los diferentes puntos (ξ) [88]; por lo tanto, una técnica comunmente utilizada es el muestreo por sombrillas (*Umbrella Sampling*).

4.3.3. Muestreo por Sombrillas (*Umbrella Sampling*)

La técnica de Umbrella Sampling propone agregar un potencial de *Hooke* (ver ecuación 4.79) a la energía libre total (ver ecuación 4.78), este potencial lo que hace es que el dominio de ξ debe ser particionado o sesgado en pequeñas ventanas que cubran todas las configuraciones accesibles (cada configuración está asociada a un valor de ξ) y en cada una de éstas se realiza una corta simulación molecular [88], como se muestra en la siguiente imagen.

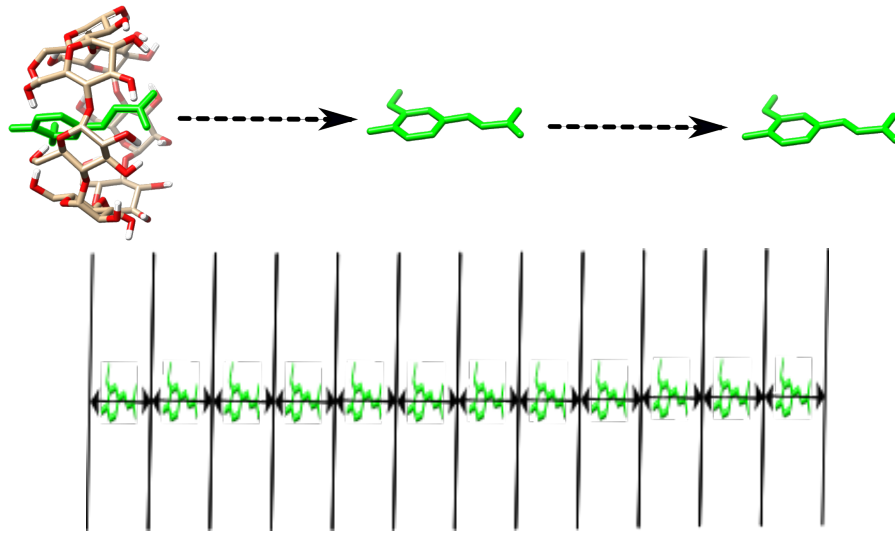


Figura 4.5: Representación esquemática del proceso para calcular la energía libre usando umbrell sampling.

$$E^b(r) = E^u(r) + \omega_i(\xi) \quad (4.78)$$

Donde el exponente “b” denota cantidades sesgadas, mientras que el exponente “u” denota cantidades no sesgadas y ω_i se define de la siguiente manera [88].

$$\omega_i(\xi) = K/2 (\xi - \xi_i^{ref})^2 \quad (4.79)$$

Para obtener la energía libre $G_i(\xi)$, necesitamos la distribución no sesgada, de acuerdo con la ecuación (4.73):

$$\rho_i^u(\xi) = \frac{\int e^{-\beta(pV+E(r))} \delta[\xi(r) - \xi] d^N r dV}{\int e^{-\beta(pV+E)} d^N r dV} \quad (4.80)$$

Por medio de la simulación de dinámica molecular podemos obtener la distribución sesgada como función de la coordenada de reacción.

$$\rho_i^b(\xi) = \frac{\int e^{\{-\beta[pV+E(r)+\omega_i(\xi'(r))]\}} \delta[\xi'(r) - \xi] d^N r dV}{\int e^{\{-\beta[pV+E(r)+\omega_i(\xi'(r))]\}} d^N r dV} \quad (4.81)$$

Debido a que la parte del sesgo o de cada ventana sólo depende de ξ y la integral del numerador depende de todos los grados de libertad, entonces la distribución quedaría:

$$\rho_i^b(\xi) = e^{-\beta\omega_i(\xi)} \left[\frac{\int e^{\{-\beta[pV+E(r)]\}} \delta[\xi'(r) - \xi] d^N r dV}{\int e^{\{-\beta[pV+E(r)+\omega_i(\xi'(r))]\}} d^N r dV} \right] \quad (4.82)$$

Si usamos la ecuación (4.80), nos daría el siguiente resultado.

$$\rho_i^u(\xi) = \rho_i^b(\xi) e^{\beta\omega_i(\xi)} \left[\frac{\int e^{\{-\beta[pV+E(r)+\omega_i(\xi'(r))]\}} d^N r dV}{\int e^{\{-\beta[pV+E(r)]\}} d^N r dV} \right] \quad (4.83)$$

Si reordenamos la ecuación quedaría:

$$\rho_i^u(\xi) = \rho_i^b(\xi) e^{\beta\omega_i(\xi)} \langle e^{-\beta\omega_i(\xi)} \rangle \quad (4.84)$$

Si $G_i(\xi) = -(1/\beta) \ln \rho_i^u(\xi)$, entonces la ecuación anterior quedaría;

$$G_i(\xi) = -(1/\beta) \ln \rho_i^b(\xi) - \omega_i(\xi) + F_i \quad (4.85)$$

De la ecuación anterior, $G_i(\xi)$ se puede evaluar, ya que $\rho_i^b(\xi)$ se obtiene de una simulación de dinámica molecular del sistema sesgado, $\omega_i(\xi)$ se da analíticamente, y $F_i = -(1/\beta) \ln \langle e^{-\beta\omega_i(\xi)} \rangle$, la cual representa la energía libre asociada al potencial agregado ($\omega_i(\xi)$); ésta derivación es exacta. Ninguna aproximación entra aparte del supuesto de que el muestreo en cada ventana es suficiente [88]. Si una ventana abarca todo el rango de ξ a estudiar, la ecuación (4.85) es suficiente para realizar la simulación. $G(\xi)$ en todo caso sólo se define hasta una constante aditiva; por lo que en este caso, F_i se puede elegir arbitrariamente. Si las curvas de energía libre $G_i(\xi)$ de más ventanas se combinan con una G global (ξ), el F_i tiene que ser calculado. Estos están asociados con la introducción del potencial de polarización y conectan las curvas de energía libre $G_i(\xi)$ obtenidas en las diferentes ventanas [88]:

$$e^{-\beta F_i} = \langle e^{-\beta \omega_i(\xi)} \rangle \quad (4.86)$$

$$= \int \rho^u(\xi) e^{-\beta \omega_i(\xi)} d\xi \quad (4.87)$$

$$= \int e^{\{-\beta[G(\xi)+\omega_i(\xi)]\}} d\xi \quad (4.88)$$

Siendo $\rho^u(\xi)$ la distribución global no sesgada. La F_i no se puede obtener directamente del muestreo. Esto da una estimación de la densidad de probabilidad en función de la coordenada de reacción, a partir de la cual se puede calcular el perfil de energía libre de acuerdo a la ecuación (4.75) [88].

Uno de los métodos que se pueden utilizar para este tipo de análisis es el método de análisis de histograma ponderado (WHAM), ya que éste permite obtener mejores estimaciones combinando los resultados de todas las simulaciones [88].

4.3.4. Método de Análisis de Histograma Ponderado (WHAM)

La idea primordial se basa en el método de la superposición máxima, ésta consiste en extraer los datos obtenidos en todas las simulaciones de cada punto de la coordenada de reacción y determinar la forma funcional del tamaño del peso de los factores que minimicen el error estadístico. Donde se proponen dos densidades, una densidad total ($\rho^u(\xi)$) y la otra por ventana o paso ($\rho_i(\xi)$) [88]:

$$\rho^u(\xi) = \sum_i^{N_w} \rho_i(\xi) \rho_i^u(\xi) \quad (4.89)$$

Los pesos de $\rho_i(\xi)$ son elegidos para minimizar el error estadístico de $\rho^u(\xi)$, bajo la condición de $\sum \rho_i(\xi) = 1$. Esto nos arroja que:

$$\rho_i(\xi) = \frac{a_i}{\sum_{j=1}^{N_w} a_j} \quad (4.90)$$

$$a_j(\xi) = N_j e^{[-\beta \omega_j(\xi) + \beta F_j]} \quad (4.91)$$

Donde N_j es el número total de pasos muestreados en el histograma a_j , N_w es el número de ventanas y la variable F_j se calcula mediante la ecuación (4.91), y ésta misma es ocupada en la ecuación (4.89), ρ^u se necesita en la ecuación (4.92) y con ésta y la ecuación (4.89), son evaluadas conjuntamente mediante iteraciones hasta

que estas converjan o minimicen el error estadístico a un valor de 1×10^{-6} , logrando formar el potencial deseado [88].

$$e^{-\beta F_j} = \int \rho^u(\xi) e^{-\beta \omega_j(\xi)} d\xi \quad (4.92)$$

En la siguiente tabla se presentan de manera general los parámetros de simulación que fueron utilizados para los ensambles NVT y NPT, así como para la dinámica molecular tanto para la formación del complejo como para la simulación de cada ventana.

Parámetro	Opción	Parámetro	Opción
integrator	md-vv	pme_order	4
constraint_algorithm	lincs	fourierspacing	0.16
constraints	all-bonds	tcoupl	V-rescale
lincs_iter	1	tc-grps	proteina_ligando Water_and_ions
lincs_order	4	tau_t	0.1 0.1
cutoff-scheme	Verlet	ref_t	270 270
ns_type	grid	pcoupl	Berendsen
nstlist	10	pcoupltype	isotropic
rcoulomb	1.4	tau_p	2.0
rvdw	1.4	ref_p	1.0
coulombtype	PME	compressibility	4.5e-5
pcbc	xyz	Dispcorr	EnerPres

Tabla 4.1: Parámetros generales considerados para la realización del muestreo por medio del software GROMACS.

Los archivos de entrada en particular de cada ensamble y dinámica molecular se encuentran reportados en los apéndices, cabe señalar que algunos parámetros varían con respecto a la implementación del termostato y barostato, así como otros parámetros que dependen de la unidad de procesamiento (cpu o gpu). Estas variaciones son consideradas para la optimización de la simulación y para evitar errores en los cálculos.

Capítulo 5

Resultados

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos de los cálculos de energía libre de unión con dos CDs estudiadas: α y β ; en cada sistema se utilizó la misma molécula huésped (ácido ferúlico), ver figura (5.1). Para obtener los perfiles de la energía libre de Gibbs como función de la coordenada de reacción (distancia de los centros de masa de la CDs y la molécula huésped) se realizaron simulaciones computacionales utilizando el software libre GROMACS (versión 5.0.7) [4]. Las simulaciones moleculares las llevamos a cabo en el ensamble NPT a una presión de 1bar y a dos diferentes temperaturas, las cuales fueron 270K y 300K. Se eligió una temperatura baja (270K) para verificar la hipótesis de que en un sistema frío el ácido ferúlico forma complejos de inclusión con diferente orientación dentro de las CDs. En todas nuestras simulaciones moleculares se utilizó el campo de fuerzas GROMOS54a7 y el modelo de agua TIP4P/ ϵ [84].

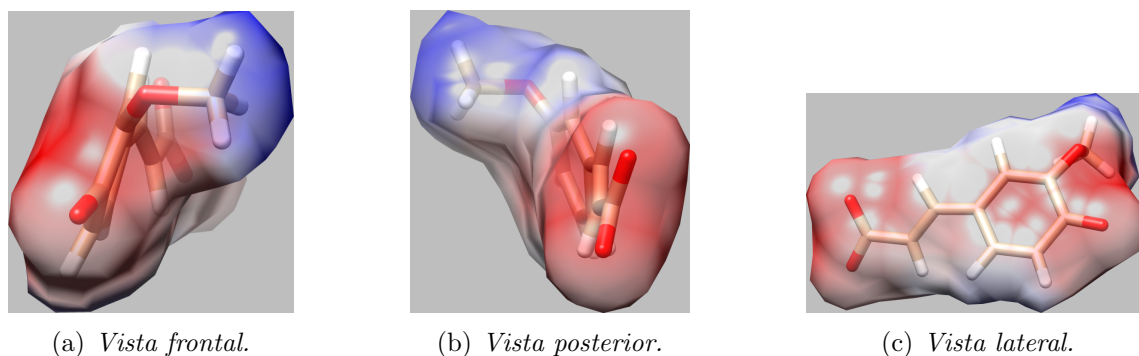


Figura 5.1: Configuración espacial de la molécula de Ácido Ferúlico (*obtenidas por el paquete UCSF Chimera*)

Para calcular los perfiles de energía libre utilizando la técnica de *muestreo con sombrillas* (umbrella sampling), es necesario tener configuraciones iniciales a distintos

valores de la coordenada de reacción (ver figura (4.5)), que para nuestros sistemas fué la distancia de separación entre los centros de masa de las CDs y la molécula huésped. En cada configuración, también llamada *ventana* es necesario equilibrar al sistema durante un intervalo de tiempo, en nuestros cálculos utilizamos un número de pasos de 10×10^6 y con un $\delta t = 0.002$ ps, que equivale a 20 ns, durante los cuales se observó que la energía potencial del sistema tiende a un valor de equilibrio; estas simulaciones las realizamos en el ensamble NPT. Posteriormente se muestrea la densidad de probabilidad para obtener los histogramas de la energía y el tiempo de simulación utilizado en estos cálculos fue de un número de pasos de 5×10^6 y con un $\delta t = 0.002$ ps, dándonos un tiempo de simulación por ventana de 10 ns. Finalmente se procede con el cálculo de la energía libre de Gibbs utilizando WHAM, (ver sección 4.3.4).

A continuación se describen y analizan los resultados obtenidos de los dos sistemas estudiados utilizando simulaciones moleculares.

5.1. α -Ciclodextrina

En la figura (5.2) se muestran imágenes de las isosuperficies del potencial electrostático obtenidas por el paquete UCSF Chimera (ocupando el software *APBS*¹) para la α -ciclodextrina, en ellas se pueden apreciar que existen zonas en la molécula con carga negativa dentro de la cavidad, se muestran en color rojo, también se puede observar que existen zonas de carga neutra, las cuales se observan en la parte frontal de la molécula hasta el borde de la misma y en el borde de la parte posterior, y se muestran en color blanco, además exhibe una zona con carga positiva en la parte central exterior en forma de anillo, la cual se muestra en color azul.

Con esta configuración se realizaron las simulaciones para la obtención de formación del complejo CD-huésped, en la que los datos para la dinámica molecular fueron los siguientes: con dimensiones de $L_x = L_y = L_z = 5$ nm, con un número de pasos de 50×10^6 y un $\delta t = 0.0015$ ps, lo cual nos da 75 ns de tiempo de simulación, con un número de átomos de 16,358 de los cuales 126 átomos son de la α -ciclodextrina, 22 átomos conforman a una molécula de ácido ferúlico de los cuales en este sistema están siendo consideradas 4 moléculas, 16 iones de sodio, 8 iones de cloro para dar una concentración de $0.1 \mu\text{mol}$ y para mantener el sistema neutro, ya que cada molécula de ácido ferúlico tiene una carga neta de -2 y la ciclodextrina a un pH 9.0 tiene una carga neta de 0 (neutra), y el resto de los átomos son comprendidos en la molécula de agua con el modelo tip4p/ ϵ [84]. La caracterización calorimétrica previamente reportada se hizo a un pH de 9.0 [1].

Cabe recordar que se realizaron dos muestreos a dos temperaturas, una a 270K

¹*Adaptive Poisson-Boltzman Solver* resuelve las ecuaciones de la electrostática continua para sistemas macromoleculares.

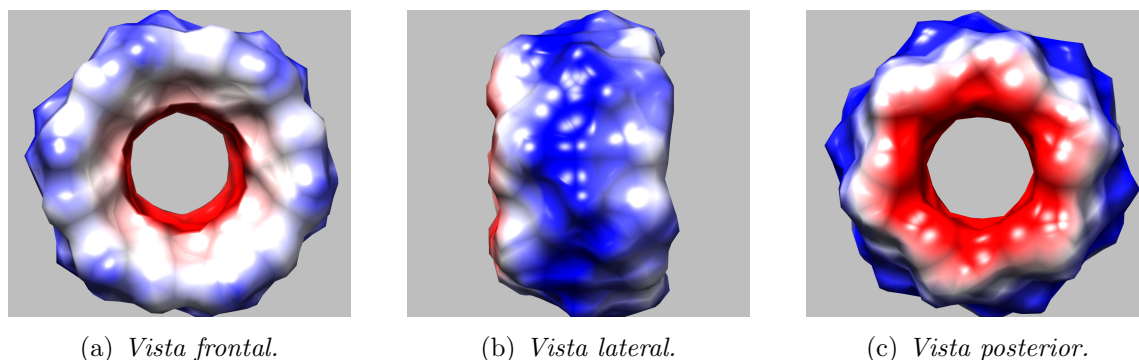


Figura 5.2: Configuración espacial de α -ciclodextrina (obtenidas por el paquete UCSF Chimera)

y la otra a 300K y se muestran las configuraciones finales en las siguientes imágenes (ver figuras (5.3) y (5.4)); se observa que para la temperatura de 270K sólo la parte que contiene el grupo metilo de la molécula huésped es la que se logra incorporar a la CD y así formar el complejo CD-huésped. Por otro lado, para la temperatura 300K, la molécula huésped durante el tiempo de simulación se mantuvo alrededor de la parte exterior de la CD. Para estas dos temperaturas los parámetros de simulación fueron los mismos.

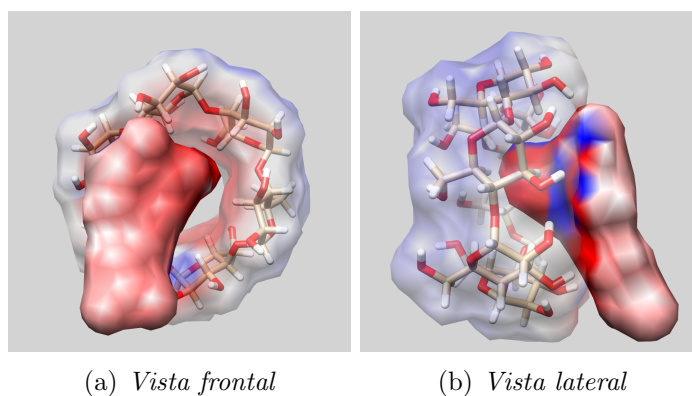


Figura 5.3: Complejo α -CD-huésped con mayor frecuencia durante el tiempo de simulación, a una temperatura de 270K.

En la figuras (5.5) y (5.6), se presentan la distancia relativa del centro de masas (COM) del anillo con la molécula huésped como función del tiempo de simulación de las dos temperaturas antes mencionadas; se puede apreciar que la molécula huésped para la temperatura de 270K no se introduce por completo en la cavidad, pero durante el tiempo de simulación se pasó la mayor parte en la entrada de la cavidad de

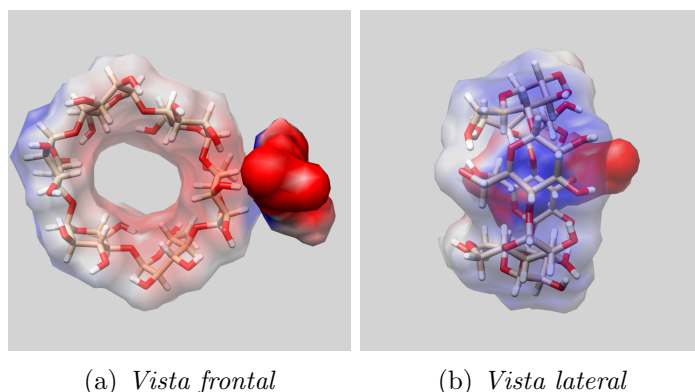


Figura 5.4: Complejo α -CD-huésped con mayor frecuencia durante el tiempo de simulación, a una temperatura de 300K.

radio mayor, para la temperatura de 300K durante el tiempo de simulación anteriormente mencionado, no logra introducirse a la cavidad, por lo contrario, se mantiene por un lapso de tiempo en el borde exterior del anillo. Esto se puede apreciar en los histogramas de la figura (5.6).

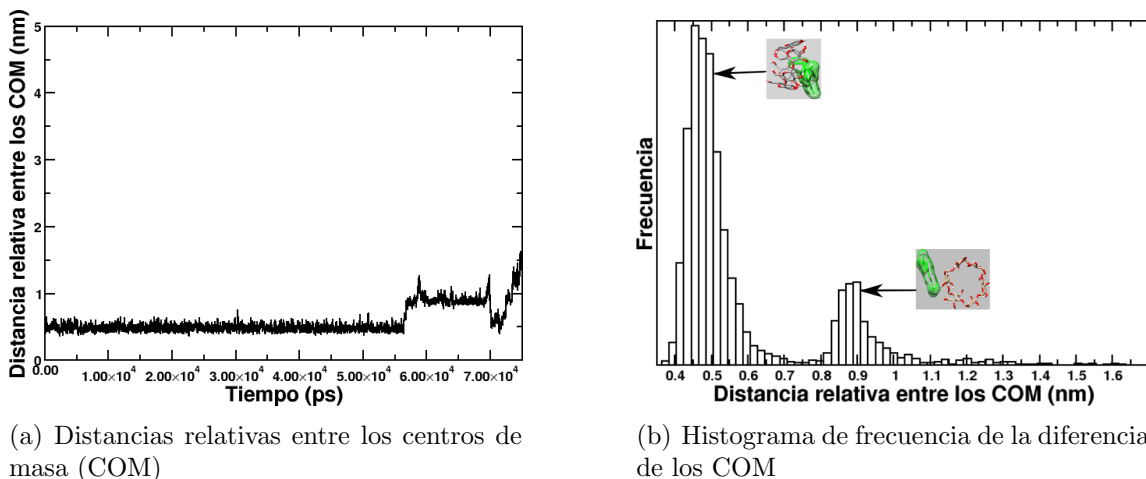


Figura 5.5: Complejo α -CD-huésped a la temperatura de 270K.

Durante el tiempo de simulación no se logró que la molécula huésped se introdujera en la cavidad de la CD, fue necesario colocarla de manera *artificial* (ver la figura (5.7)) y ya con la formación del complejo CD-huésped, se tomó esa configuración como partida inicial para la realización de la técnica de muestreo con sombrillas (*Umbrella Sampling*) a una temperatura de 300K, con los parámetros para la parte de generar las configuraciones iniciales de cada ventana se ocupó como integrador de movimiento *md-vv* (dinámica molecular con el integrador *velocity verlet*), con un

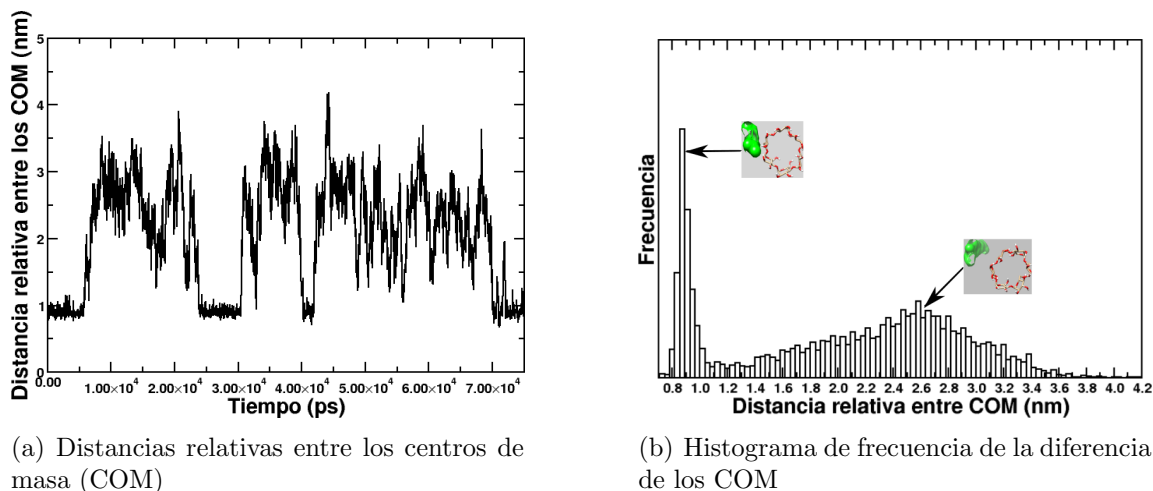


Figura 5.6: Complejo α -CD-huésped a una temperatura de 300K.

$\delta t = 0.0010$ ps, un número de pasos de 2×10^6 , como termostato *V-rescale* [79] y como barostato *Berendsen* [82], con un número total de átomos de 32880 y con esto nos dan un número de ventanas de 1334, de las cuales solo se ocuparon ≈ 100 configuraciones, con una constante de resorte $k = 10 \text{ MJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$ y con un intervalo de ventanas de 0.01 nm/ps.

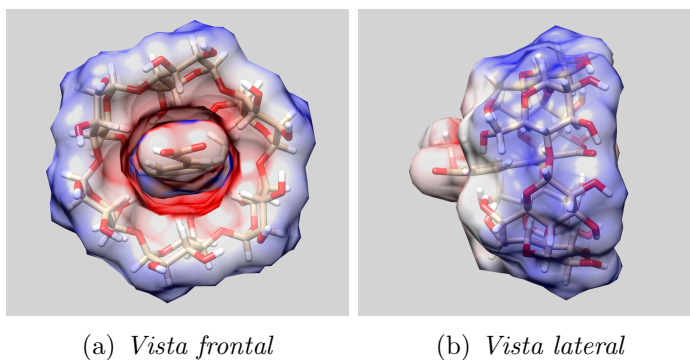


Figura 5.7: Complejo α -CD-huésped obtenida de manera artificial para la temperatura de 300K.

La figura (5.8) muestra solo tres imágenes del procedimiento para generar las configuraciones iniciales del muestreo con umbrela sampling (*pulling*) sobre la coordenada de reacción (ξ), que en nuestro caso es sobre la dirección \hat{r}_x en un plano cartesiano que se requieren para el método de PMF.

En la figura (5.9(a)) se muestra la densidad de probabilidad de encontrar a la

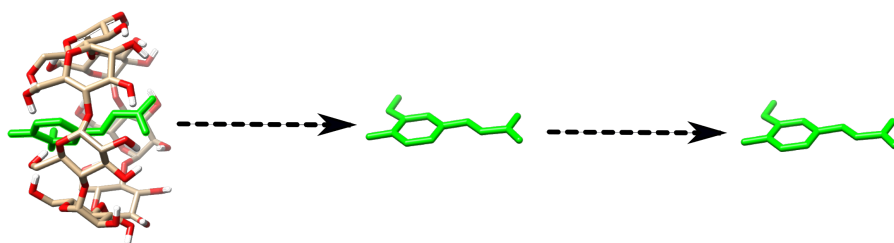


Figura 5.8: Representación de la realización del *pulling* de α -ciclodextrina-huésped.

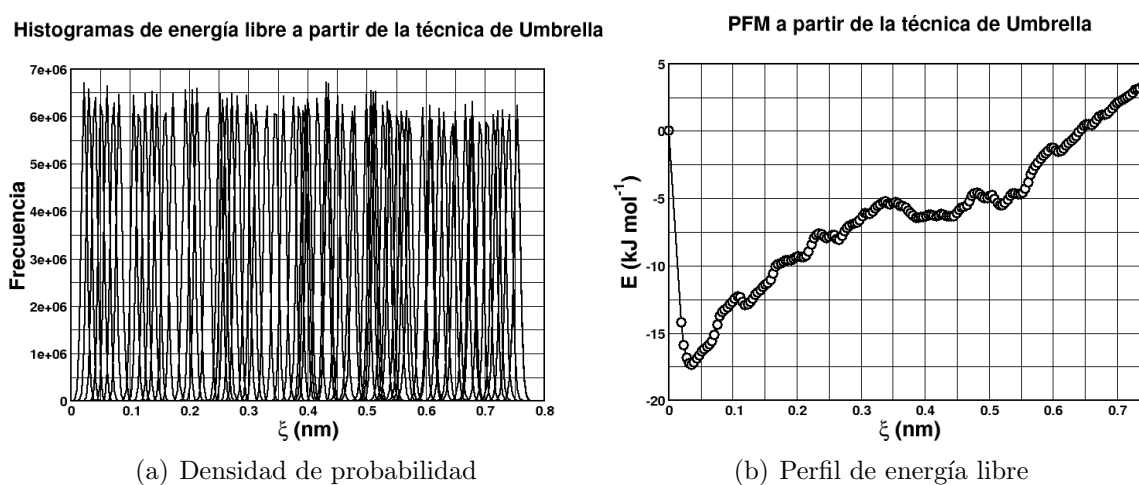


Figura 5.9: α -ciclodextrina-huésped

molécula de ácido ferúlico a lo largo de la coordenada de reacción en cada uno de los sistemas intermedios, donde los datos de simulación para cada ventana empezando por una equilibración del sistema (*ensemble NPT*) y enseguida la realización del muestreo de densidad de probabilidad, como integrador de ecuaciones de movimiento, se ocupó el integrador *md-vv* con un $\delta t = 0.0010$ ps, un número de pasos de 10×10^6 para el ensamble NPT y un número de pasos de 20×10^6 para el muestreo de densidad de probabilidad, para mantener la temperatura y la presión constante se ocuparon como termostato *Nosé-Hoover* [80] y como barostato *Parrinello-Rahman* [83], respectivamente. Solo se logró simular hasta la frontera de la CD, ya que cada configuración tarda poco más de 1 día. En la figura (5.9(b)) se muestra el perfil de energía libre, donde se puede apreciar un mínimo de energía dentro de la cavidad con un valor de -18.6 kJ/mol y con un máximo de 0.71 kJ/mol en el alcance máximo del potencial, donde la distancia relativa entre los centros de masa tiende a $+\infty$ y por lo cual, las fluctuaciones de la energía son mínimas y ésta se puede considerar como constante.

5.2. β -Ciclodextrina

En la figura (5.10) se muestran las imágenes de las isosuperficies del potencial electrostático obtenidas por el paquete UCSF Chimera (calculado con el software *APBS*) para la β -ciclodextrina; en ellas se pueden apreciar que existen zonas en la molécula con carga negativa dentro de la cavidad, se muestran en color rojo, también se pueden observar zonas con carga neutra en la parte anterior y posterior de la β -ciclodextrina que se muestran en color blanco; además hay una zona con carga positiva en color azul en la parte central exterior.

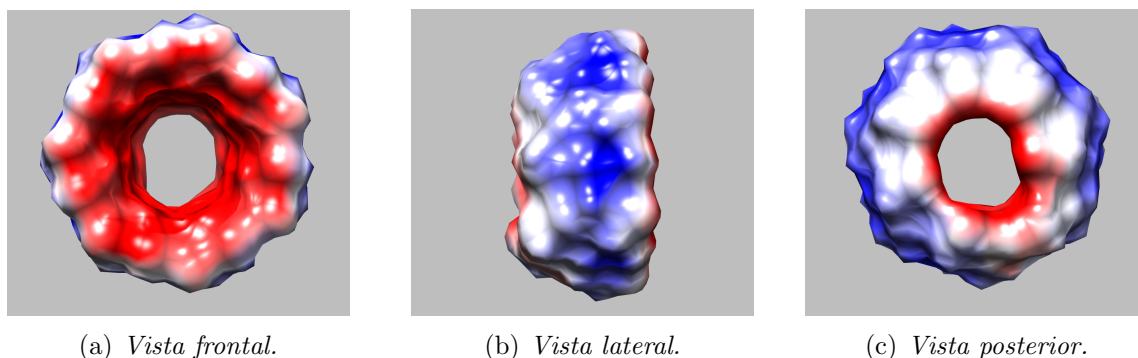


Figura 5.10: Configuración espacial de β -ciclodextrina (obtenidas por el paquete *UCSF Chimera*).

Las simulaciones se realizaron en las siguientes condiciones: dimensiones de la caja $L_x = L_y = L_z = 5$ nm, con un número de pasos de 50×10^6 y un $\delta t = 0.002$ ps, lo cual nos da 100 ns de tiempo de simulación, con un número de átomos de 16,299 de los cuales 147 átomos son de la β -ciclodextrina, 22 átomos de la molécula de ácido ferúlico, 10 iones de sodio, 8 iones de cloro para obtener una concentración de $0.1 \mu\text{mol}$, ya que la molécula de ácido ferúlico tiene una carga neta de -2 y la ciclodextrina a pH de 9.0 tiene una carga neta de 0 (neutra), y el resto de los átomos son comprendidos en la molécula de agua con el modelo *tip4p/ε* [84]; se observó que la molécula huésped se introdujo, por la parte metilada, libremente en la cavidad de la β -ciclodextrina (ver figuras (5.11) y (5.12)).

En la figura (5.13(a)) se presenta la distancia relativa del centro de masa (COM) del anillo con la molécula huésped como función del tiempo de simulación para la temperatura de 270K; se puede apreciar que la molécula huésped se introduce de manera espontánea en la cavidad durante intervalos de tiempo amplios, donde también se observa que la diferencia que existe entre los centros de masa es aproximadamente de 0.5 nm. En la figura (5.13(b)) se muestra un histograma de la posición y podemos observar claramente de acuerdo a los valores relativos de la frecuencia que, el tiempo de permanencia dentro de la cavidad es mayor que cualquier otra posición en la caja

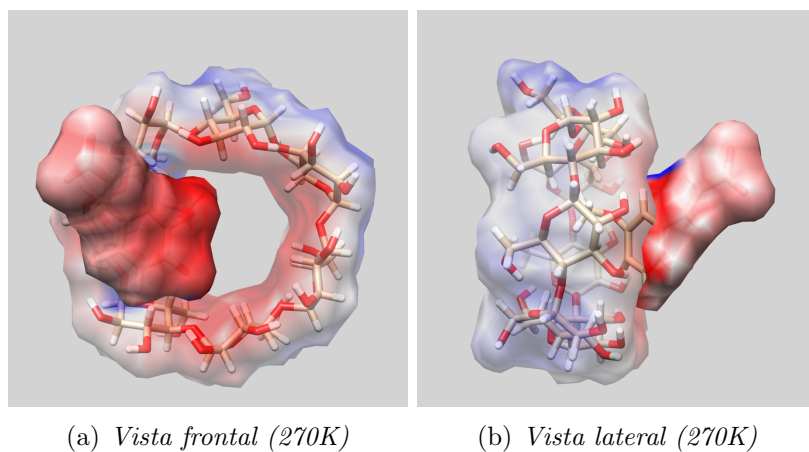


Figura 5.11: Configuración espacial del complejo β -CD-huésped a una temperatura de 270K

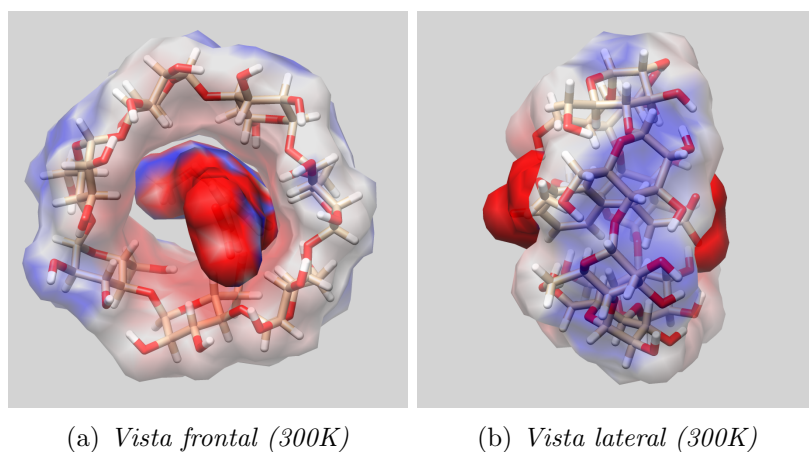


Figura 5.12: Configuración espacial del complejo β -CD-huésped a una temperatura de 300K

de simulación de la molécula huésped. En la figura (5.14(a)) se presenta de igual manera, la distancia relativa del centro de masa (COM) del anillo con la molécula huésped como función del tiempo de simulación para la temperatura de 300K; se puede apreciar que la molécula huésped se introduce de manera espontánea en la cavidad durante intervalos de tiempo, pero para esta temperatura la diferencia de los COM es mayor que en la temperatura anterior, para la figura (5.14(b)) se aprecia en el histograma de la posición, claramente de acuerdo a los valores relativos de la frecuencia que, el tiempo de permanencia dentro de la cavidad es mayor que cualquier otra posición en la caja de simulación de la molécula huésped, en comparación con la temperatura anterior la diferencia entre los COM se encuentra en aproximadamente

0.5 nm.

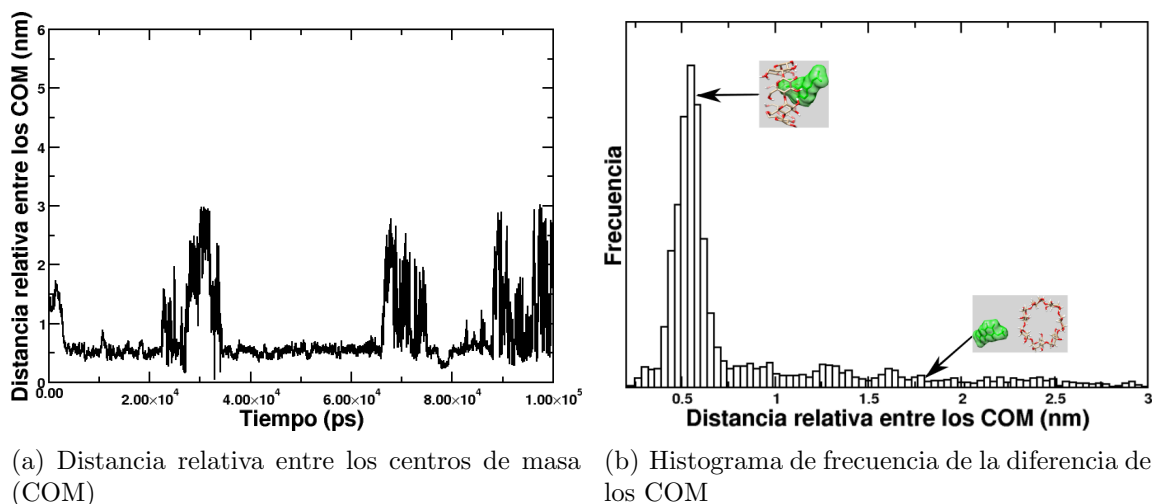


Figura 5.13: Complejo β -CD-huésped a una temperatura de 270K.

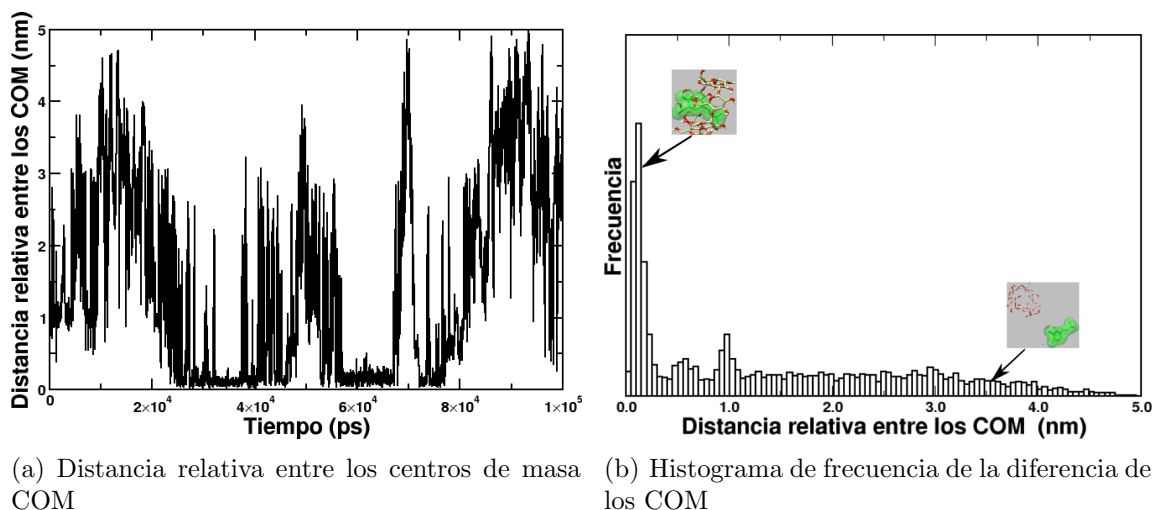


Figura 5.14: Complejo β -CD-huésped a una temperatura de 300K.

Para iniciar el procedimiento del cálculo de la energía libre por medio de la técnica de *umbrella sampling* es necesario poner el sistema en las distintas ventanas y ahí realizar el muestreo de la densidad de probabilidad. Para esto tomamos como punto de partida la configuración espontánea cuando la molécula huésped permanece dentro de la cavidad, esto se muestra en la figura (5.12). Al sistemas lo colocamos en una caja rectangular de dimensiones de $L_z = L_y = 5$ nm y $L_x = 4L_y$, donde el total de átomos en el sistema fue de 65615. Para generar las distintas configuraciones

o ventanas, se ocuparon los siguientes parámetros: como integrador de movimiento *md*, con un $\delta t = 0.002$ ps, un número de pasos de 1.4×10^6 , como termostato *Nose-Hoover* [80] y como barostato *Parrinello-Rahman* [83], con esto nos dan un número de ventanas de 933, de las cuales sólo se ocuparon 397 configuraciones. Las simulaciones las realizamos con un total de 5×10^6 pasos de simulación y con un $\delta t = 0.002$ ps, esto nos da un tiempo de simulación de 10 ns para cada ventana y con un total de 109 ventanas; para restringir al sistema en cada ventana se utilizó una constante de resorte $k = 10 \text{ MJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$ y con un intervalo entre ventanas de 0.010 nm/ps. Para integrar las ecuaciones de movimiento usamos el integrador *md-vv* y para mantener la temperatura y la presión constante se utilizó el termostato de *Nosé-Hoover* [80] y el barostato de *Parrinello-Rahman* [83].

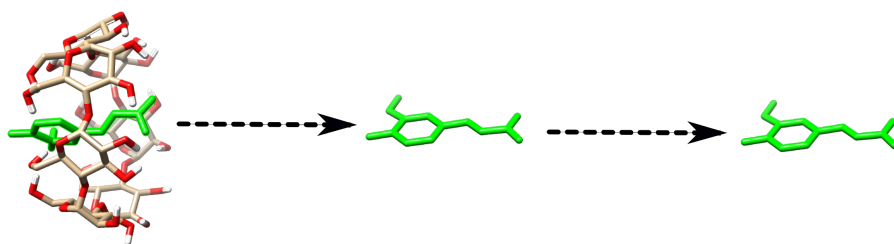


Figura 5.15: Representación de la realización del *pulling* de β -ciclodextrina-huésped.

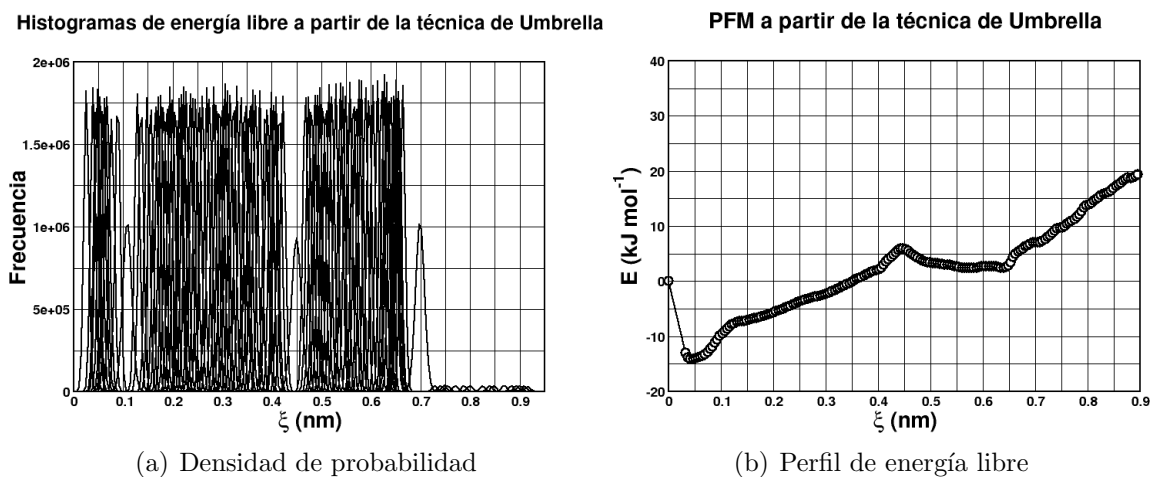


Figura 5.16: β -ciclodextrina-huésped.

En la figura (5.16(a)) se muestra la densidad de probabilidad del ácido ferúlico a lo largo de la coordenada de reacción en cada uno de los sistemas intermedios. En la figura (5.16(b)), se muestra el perfil de energía libre, donde se puede apreciar un

mínimo de energía con un valor de -14.7 kJ/mol y con un máximo de 19.4 kJ/mol ± 0.26 en el alcance máximo del potencial, donde la distancia relativa entre los centros de masa tiende a $+\infty$ y por lo cual, las fluctuaciones de la energía son mínimas y ésta se puede considerar como constante.

Capítulo 6

Discusión

Si comparamos la gráfica (5.5(a)) de la α -ciclodextrina y la gráfica (5.13(a)) de β -ciclodextrina, las cuales se encuentran en base a las distancias relativas entre los COM de la molécula huésped con respecto a la CD, y a una temperatura de 270K, podemos observar que los dos sistemas tienen una característica muy peculiar. En este caso la distancia relativa entre los COM es muy similar, ya que para α -ciclodextrina es ≈ 0.45 nm y para β -ciclodextrina es ≈ 0.50 nm y las imágenes obtenidas a diferentes tiempos muestran sistemas muy parecidos como se puede apreciar en las figuras (5.3) y (5.11) para los complejos α -ciclodextrina-huésped y β -ciclodextrina-huésped, respectivamente.

En las gráficas (5.6(a)) y (5.14(a)) para los sistemas α -CD-huésped y β -CD-huésped, respectivamente. Los cuales se encuentran a una temperatura de 300K, se puede apreciar que para el sistema α -CD-huésped durante el tiempo de simulación propuesto no se logra la formación del complejo, y sólo para el sistema β -CD-huésped durante el mismo tiempo de simulación sí se logra una diferencia menor de la distancia relativa de los COM, con esto podemos suponer de que existe una formación del complejo. Al obtener una imagen (ver figura (5.12)) en el paso del tiempo donde se aprecia una diferencia casi nula, nos percatamos de que el complejo β -CD-huésped interacciona de mejor forma que a la temperatura de 270K y también mejor que el complejo α -CD-huésped. Esto podría deberse al número impar de moléculas de D-glucopiranosas que tiene la β -ciclodextrina en el anillo, por lo que le da la propiedad de formación de puentes de hidrógeno en el interior del anillo, a comparación de la α -ciclodextrina que no los puede formar por el número par de D-glucopiranosas [10], y esta propiedad se puede ver reflejada en los mapas de potenciales electrostáticos entre la α -ciclodextrina y β -ciclodextrina, los cuales son mostrados en las figuras (5.2) y (5.10); ya que para la α -ciclodextrina la parte con la carga negativa se presenta en la parte posterior del anillo. Mientras que para la β -ciclodextrina la zona con mayor carga negativa se observa en la parte frontal del anillo.

Para el cálculo de la diferencia de la energía libre de Gibbs de unión (ΔG_u) el

cual es el objetivo de este trabajo, se considera el mínimo de energía del potencial (ΔG_c) y el alcance máximo del potencial (ΔG_{sc}), donde la distancia relativa entre los centros de masa tiende a $+\infty$ y por lo cual, las fluctuaciones de la energía son mínimas y ésta se puede considerar como constante.

$$\Delta G_u = \Delta G_c - \Delta G_{sc} \quad (6.1)$$

$$(6.2)$$

Para obtener el valor de la ΔG_u para el primer sistema (α -CD-huésped), se consideró la distancia mínima relativa de los COM a la temperatura de 270K, ya que no se logró la formación de dicho complejo a una temperatura de 300K y ha que las dimensiones tanto de la α -CD como las del ácido ferúlico no permiten una distancia relativa de los COM menor a la obtenida a la temperatura de 270K. Por lo tanto, se promediaron los datos que se obtuvieron de energía libre entre las distancia relativas de los COM entre 0.40 - 0.55 nm, obteniendo un valor de mínima energía libre = -5.23 kJ/mol \pm 0.28 y el valor máximo de energía libre se tomó de la gráfica del potencial de umbrela, siendo = 4.05 kJ/mol. Los cálculos fueron realizados de la siguiente manera:

$$\Delta G_u = -5.23 \text{ kJ/mol} - (4.05) \text{ kJ/mol} \quad (6.3)$$

$$\Delta G_u = -9.28 \text{ kJ/mol} \quad (6.4)$$

Para el segundo sistema (β -CD-huésped), si fué considerada la energía mínima obtenida en el PFM para el cálculo de la ΔG_u , el cual se muestra enseguida.

$$\Delta G_u = -14.1 \text{ kJ/mol} - (19.3) \text{ kJ/mol} \quad (6.5)$$

$$\Delta G_u = -33.4 \text{ kJ/mol} \quad (6.6)$$

En la Tabla (6.1), se comparan las energías libres de Gibbs obtenidas por González-Mondragón *et al.* [1] contra las obtenidas en este trabajo, donde podemos observar que existe una diferencia de -0.62 kJ/mol para el primer sistema (α -CD-huésped), mientras que para el segundo sistema (β -CD-huésped) la diferencia es de 20.6 kJ/mol. Con estos resultados podemos decir que la metodología propuesta para la obtención de la ΔG_u por medio de la simulación computacional resulta ser adecuada, considerando un margen de error. Cabe mencionar que los valores con los cuales se calcularon

	$\Delta G_u(kJ/mol)(exp.)$	$\Delta G_u(kJ/mol)$
α -CD-huésped	-9.9 ± 0.2	-9.28 ± 0.28
β -CD-huésped	-12.8 ± 0.1	-33.4 ± 0.3

Tabla 6.1: Comparación de las energías libres de Gibbs extraídas de la literatura contra las obtenidas *in silico*.

las ΔG_u fueron obtenidos a partir de los potenciales de muestreo por sombrillas (ver figuras (5.9(b)) y (5.16(b))) para el primer y el segundo sistema, respectivamente.

En la figura (6.1) se muestran los potenciales de fuerza media para los dos sistemas, en los cuales podemos observar que el sistema que tiene una mayor diferencia de energía es el segundo sistema (β -CD-huésped); por lo tanto, podemos decir que la β -ciclodextrina es más afín con el ácido ferúlico que la molécula de α -ciclodextrina, considerando que la mínima diferencia de los COM para el sistema α -CD-huésped fué de ≈ 0.5 nm.

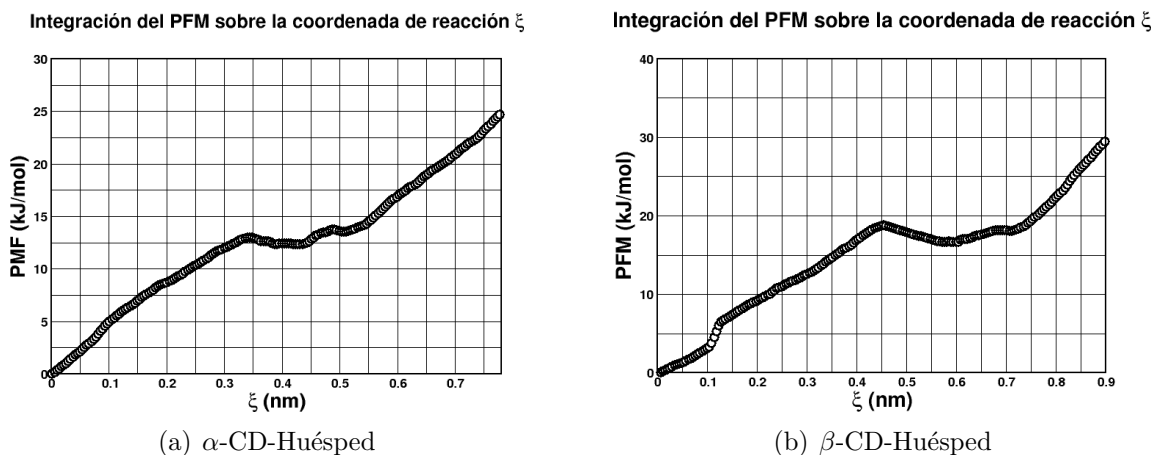


Figura 6.1: Potenciales de fuerza media de los dos sistemas realizados.

Capítulo 7

Conclusiones

- Para el sistema α -ciclodextrina con ácido ferúlico (AF) sólo se logra la formación de complejo a una temperatura de 270K.
- Se obtuvo la formación de complejo para β -ciclodextrina con ácido ferúlico, tanto para la temperatura de 270K como para temperatura de 300K con los modelos propuestos.
- El complejo más afín de AF fué con β -ciclodextrina.
- Esta metodología de simulación reproduce el orden de afinidad reportado en la literatura para la unión de AF con α - y β -ciclodextrina.
- Son reproducibles los resultados obtenidos por medio de la simulación a diferentes tamaños de celda unitaria.

Capítulo 8

Perspectivas

- Sería interesante realizar una simulación de dinámica molecular más larga del sistema α -CD-AF a una temperatura de 300K, para saber si existe la formación del complejo.
- Otro punto importante, sería el muestreo de los sistemas α -CD-AF y β -CD-AF bajo otras condiciones para entender aún más su comportamiento para la formación de complejos.

Bibliografía

- [1] Edith González-Mondragón, Armando Torralba-González, Ponciano García-Gutiérrez, Vania S. Robles-González, Alma Y. Salazar-Govea, and Rafael A. Zubillaga. Thermodynamic analysis of ferulate complexation with α -, β - and γ -cyclodextrins. *Thermochimica Acta*, 634:1 – 5, 2016.
- [2] M.R. de Jong. Cyclodextrins for sensing. solution, surface and single molecule chemistry, 9 2001.
- [3] Haiyan Li, Jin Sun, Yongjun Wang, Xiaofan Sui, Le Sun, Jiwen Zhang, and Zhonggui He. Structure-based in silico model profiles the binding constant of poorly soluble drugs with β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1):55 – 64, 2011.
- [4] Justin A. Lemkul and David R. Bevan. Assessing the stability of alzheimer’s amyloid protofibrils using molecular dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(4):1652–1660, 2010. PMID: 20055378.
- [5] Alexei Merzlikine, Yuriy A. Abramov, Stacy J. Kowsz, V. Hayden Thomas, and Takashi Mano. Development of machine learning models of β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin complexation free energies. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(2):207 – 216, 2011. A priori Performance Predictions.
- [6] Matias I. Sancho, Sebastian Andujar, Rodolfo D. Porasso, and Ricardo D. Enriz. Theoretical and experimental study of inclusion complexes of β -cyclodextrins with chalcone and 2,4-dihydroxychalcone. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(12):3000–3011, 2016. PMID: 26950264.
- [7] Frank C. J. M. van Veggel, Manon P. Oude Wolbers, and David N. Reinhoudt. Computational study of a terphenyl-based eu3+ complex: effect of small amounts of water. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(18):3060–3066, 1998.
- [8] Thorsteinn Loftsson and Marcus E. Brewster. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(10):1017 – 1025, 1996.

- [9] William L. Jorgensen. Free energy calculations: A breakthrough for modeling organic chemistry in solution. *Accounts Chem. Res.*, 22(5):184–189, 1989.
- [10] V. Zia, R. A. Rajewski, and V. J. Stella. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of (sbe)7m- β -cd to hp- β -cd. *Pharm. Res.*, 18(5):667–673, May 2001.
- [11] A. Villers. Sur la fermentation de la fécule par l’action du ferment butyrique. *Comptes Rendus*, 112:536, Jun 1891.
- [12] József Szejtli. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5):1743–1754, 1998. PMID: 11848947.
- [13] Kim Lambertsen Larsen. Large cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 43(1):1–13, Jun 2002.
- [14] E.M.Martin Del Valle. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9):1033 – 1046, 2004.
- [15] József Szejtli. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.*, 76(10):1825–1845, 2004.
- [16] Haruhisa Ueda. Physicochemical properties and complex formation abilities of large-ring cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 44(1):53–56, Dec 2002.
- [17] Wen J. Shieh and A. R. Hedges. Properties and applications of cyclodextrins. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 33(5):673–683, 1996.
- [18] Akiko Kubo, Naoko Fujita, Kyuya Harada, Toshiaki Matsuda, Hikaru Satoh, and Yasunori Nakamura. The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiology*, 121(2):399–410, 1999.
- [19] K. Wallenfels, O. P. Malhotra, P. D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrbäck. The enzymes. *New York, Academic Press.*, 4:409–430, 1960.
- [20] Reynaldo Villalonga, Roberto Cao, and Alex Fragoso. Supramolecular chemistry of cyclodextrins in enzyme technology. *Chemical Reviews*, 107(7):3088–3116, 2007. PMID: 17590054.
- [21] Steven D. Dong and Ronald Breslow. Bifunctional cyclodextrin metalloenzyme mimics. *Tetrahedron Letters*, 39(51):9343 – 9346, 1998.

- [22] Ronald Breslow and Biliang Zhang. Cleavage of phosphate esters by a cyclodextrin dimer catalyst that binds the substrates together with La^{3+} and hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society*, 116(17):7893–7894, 1994.
- [23] Ronald Breslow, Xiaojun Zhang, and Ying Huang. Selective catalytic hydroxylation of a steroid by an artificial cytochrome p-450 enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 119(19):4535–4536, 1997.
- [24] Govindasamy Mugesh, Arunashree Panda, Sangit Kumar, Sandeep D. Apte, Harkesh B. Singh, and Ray J. Butcher. Intramolecularly coordinated diorganyl ditellurides: thiol peroxidase-like antioxidants. *Organometallics*, 21(5):884–892, 2002.
- [25] Ronald Breslow, Xiaojun Zhang, Ruo Xu, Milana Maletic, and Roland Merger. Selective catalytic oxidation of substrates that bind to metalloporphyrin enzyme mimics carrying two or four cyclodextrin groups and related metallosalens. *Journal of the American Chemical Society*, 118(46):11678–11679, 1996.
- [26] H. Hlasiwetz and L Barth. Mittheilungen aus dem chemischen labororium in innsbruck i) ueber einige harze [zersetzungsproducte derselben durch schmelzen des kali]. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 138(1):61–76, 1866.
- [27] Max Bamberger. Zur kenntniss der überwallungsharze. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*, 12(1):441–463, Dec 1891.
- [28] S. Dutt. General synthesis of α -unsaturated acids from malonic acid. *Quart J. Chem.*, 1:297–301, 1925.
- [29] R. Robinson and J. Shinoda. Synthesis of certain 2-styrylchrmol derivatives. *J. Chem. Soc.*, 127:1979–1980, 1925.
- [30] M. Dalal and S. Dutt. A general synthesis of α -unsaturated acid from malonic acid. part ii. *J. Ind. Chem. Soc.*, 9:309–314, 1932.
- [31] Fritz Vorsatz. Über eine verbesserung der synthese von oxyzimtsäuren. *Journal für Praktische Chemie*, 145(3-9):265–269, 1936.
- [32] M. Nethaji, V. Pattabhi, and G. R. Desiraju. Structure of 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (ferulic acid). *Acta Crystallographica Section C*, 44(2):275–277, Feb 1988.
- [33] Laura Bravo. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11):317–333, 1998.

- [34] E. I. Chupka and V. M. Burlakov. Energetics of exchange processes in lignin. 9. possible trends in intramolecular charge-transfer and energy processes in lignin. *Khim. Drev.*, 2:31–38, 1984.
- [35] H. Ohashi, E. Yamamoto, N. G. Lewis, and G.H.N. Towers. 5-hydroxyferulic acid in zeae mays and hordeum vulgare cell wall. *Phytochemistry*, 26:1915–1916, 1987.
- [36] J.W. Lee R.G. Fulcher, T.P. O'Brien. Observations on the aleurone layer. i. conventional and fluorescence microscopy of the cell wall with emphasis on phenol-carbohydrate complexes in wheat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25:23–24, 1972.
- [37] M.G. Smart and T. P. O'brien. Observations on the scutellum. iii. ferulic acid as a component of the cell wall in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*, 6(4):485–491, 1979.
- [38] Veranush Pussayanawin, David L. Wetzel, and R. G. Fulcher. Fluorescence detection and measurement of ferulic acid in wheat milling fractions by microscopy and hplc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(3):515–520, 1988.
- [39] C. G. Michniewicz, J. and Biliaderis and W. Bushuk. Water-insoluble pentosans of wheat: Composition and some physical properties. *Cereal Chem.*, 67:434–439, 1990.
- [40] L. Reiner and C. F. Van Sumere. Correlations between ferulic acid and germination of malting barley. *Cereal Chem.*, 67:434–439, 1990.
- [41] P. W. Greig-Smith and M. F. Wilson. Cinnamic acid derivatives as avian repellents., 1989. UK patent 88-29167.
- [42] D. Classen, J. T. Arnason, J. A. Serratos, J. D. H. Lambert, C. Nozzolillo, and B. J. R. Philogéne. Correlation of phenolic acid content of maize to resistance tositophilus zeamais, the maize weevil, in cimmyt's collections. *Journal of Chemical Ecology*, 16(2):301–315, Feb 1990.
- [43] V. Lattanzio, V. Linsalata, G. Maruca, R. Marullo, B. B. Singh, and P. Perrino. Preexisting phenols and resistance to aphid in cowpea vigan unguiculata: Preliminary results. *Genetica Agraria*, 42:461–462, 1988.
- [44] Kristofer Klein and Udo Blum. Inhibition of cucumber leaf expansion by ferulic acid in split-root experiments. *Journal of Chemical Ecology*, 16(2):455–463, Feb 1990.

- [45] Ananth Sekher Pannala, Tom S. Chan, Peter J. O'Brien, and Catherine A. Rice-Evans. Flavonoid b-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(5):1161 – 1168, 2001.
- [46] Masaki Kikugawa, Moriyasu Tsuchiyama, Kenji Kai, and Tatsuji Sakamoto. Synthesis of highly water-soluble feruloyl diglycerols by esterification of an aspergillus niger feruloyl esterase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3):615–622, Aug 2012.
- [47] Robert N. Goldberg, Brian E. Lang, Michael J. Selig, and Stephen R. Decker. A calorimetric and equilibrium investigation of the reaction methyl ferulate(aq) + H₂O(l) = methanol(aq) + ferulic acid(aq). *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43(3):235 – 239, 2011.
- [48] J. Mèndez and M. I. Lojo. Phenolic and indole constituents of edible peas. *Journal of Food Science*, 36(6):871–872, 1971.
- [49] F. Wolf. Fluorescence spectra of some hydroxycinnamic acid derivatives. *Adv. Front. Plant Sci.*, 21:169–172, 1968.
- [50] M. Hiramoto and K. Watanabe. On the constituents of catalpa ovata g. don. *J. Pharm. Soc.*, 59:261, 1939.
- [51] Y. S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10):4113–4117, 1998.
- [52] E. Graf, J.R. Mahoney, R.G. Bryant, and J.W. Eaton. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. stringent requirement for free iron coordination site. *Journal of Biological Chemistry*, 259(6):3620–3624, 1984. cited By 685.
- [53] W. Brzyska and A. Kula. Preparation and properties of complexes of heavy lanthanides with ferulic acid. *Rudy Met. Niezelaz.*, 28:157–160, 1983. cited By 1.
- [54] O.P. Sharma. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochemical Pharmacology*, 25(15):1811 – 1812, 1976.
- [55] Toda Shisuo, Kimura Michio, and Ohnishi Motoyo. Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Med*, 57(1):8–10, 1991.
- [56] T.W. Fenton, M.M. Mueller, and D.R. Clandinin. Isomerization of some cinnamic acid derivatives. *Journal of Chromatography A*, 152(2):517 – 522, 1978.

- [57] Kunio Yagi and Nobuko Ohishi. Action of ferulic acid and its derivatives as antioxidants. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 25(2):127–130, 1979.
- [58] Kazuko Kawanishi and Yohei Hashimoto. Long chain esters of virola species. *Phytochemistry*, 26(3):749 – 752, 1987.
- [59] Y. Liu. Safe pharmaceutical composition for decreasing side effects of antiviral drugs and increasing the immune function (sdi) ii, December 10 1991. US Patent 5,071,839.
- [60] A. S. Chawla, M. Singh, M. S. Murthy, M. Gupta, and H. Singh. Anti-inflammatory action of ferulic acid and its esters in carrageenan induced rat paw oedema model. *Indian J Exp Biol.*, 25(3):187, March 1987.
- [61] Katsumi Imaida, Fumio Furukawa, Kazuhiro Toyoda, Naoshi Shimoji, Hideaki Okamiya, Michihito Takahashi, and Ryohei Hasegawa. Effect of co-administration of n-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine and sodium chloride as an initiation procedure for a promoting effect of ethoxyquin on stomach tumorigenesis in f344 male rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, 3(1):53–56, 1990.
- [62] Mou-Tuan Huang, Robert C. Smart, Ching-Quo Wong, and Allan H. Conney. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Research*, 48(21):5941–5946, 1988.
- [63] Robert J. Nicolosi, Lynne M. Austrian, and D.Mark Hegsted. Rice bran oil lowers serum total and low density lipoprotein cholesterol and apo b levels in nonhuman primates. *Atherosclerosis*, 88(2):133 – 142, 1991.
- [64] M. A. Moore, I. Martinez-Munoz, and R. C. Hoskeney. Factors affecting the oxidative gelation of wheat water-solubles. *Cereal Chem.*, 67(1):81–84, 1987.
- [65] G.M. Jackson and R.C. Hoskeney. Effect of endogenous phenolic acids on the mixing properties of wheat flour doughs. *Journal of Cereal Science*, 4(1):79 – 85, 1986.
- [66] Yukihiro Ozaki and Jian-Ping Ma. Inhibitory effects of tetramethylpyrazine and ferulic acid on spontaneous movement of rat uterus in situ. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 38(6):1620–1623, 1990.
- [67] Tyuji Okada, Kiyoshi Nakagawa, and Naohiko Yamaguchi. Studies on antioxidative activity of ferulate and synergistic effect on amino compounds. *NIPPON SHOKUHIN KOGYO GAKKAISHI*, 29(5):305–309, 1982.

- [68] Cevdet Nergiz and Kemal Ünal. Determination of phenolic acids in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 39(2):237 – 240, 1991.
- [69] Ock-Sook YI, Daeseok Han, and Hyun-Kyung Shin. Synergistic antioxidative effects of tocopherol and ascorbic acid in fish oil/lecithin/water system. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(11):881–883, Nov 1991.
- [70] Masao Fujimaki, Takashi Tsugita, and Tadao Kurata. Fractionation and identification of volatile acids and phenols in the steam distillate of rice bran. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(9):1721–1725, 1977.
- [71] Michael Naim, Benjamin J. Streim, Joseph Kanner, and Hanna Peleg. Potentiall of ferulic acid as a precursor to off-flavors in stored orange juice. *Journal of Food Science*, 53(2):500–503, 1988.
- [72] B. J. Alder and T. E. Wainwright. Studies in molecular dynamics. i. general method. *The Journal of Chemical Physics*, 31(2):459–466, 1959.
- [73] B. J. Alder and T. E. Wainwright. Phase transition in elastic disks. *Phys. Rev.*, 127:359–361, Jul 1962.
- [74] Loup Verlet. Computer experiments on classical fluids. i. thermodynamical properties of lennard-jones molecules. *Phys. Rev.*, 159:98–103, Jul 1967.
- [75] Nathan Schmid, Andreas P. Eichenberger, Alexandra Choutko, Sereina Riniker, Moritz Winger, Alan E. Mark, and Wilfred F. van Gunsteren. Definition and testing of the gromos force-field versions 54a7 and 54b7. *European Biophysics Journal*, 40(7):843, Apr 2011.
- [76] Zhixiong Lin and Wilfred F. van Gunsteren. Refinement of the application of the gromos 54a7 force field to -peptides. *Journal of Computational Chemistry*, 34(32):2796–2805, 2013.
- [77] S. W. de Leeuw, J. W. Perram, and E. R. Smith. Simulation of electrostatic systems in periodic boundary conditions. i. lattice sums and dielectric constants. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 373(1752):27–56, 1980.
- [78] Christopher J. Fennell and J. Daniel Gezelter. Is the ewald summation still necessary? pairwise alternatives to the accepted standard for long-range electrostatics. *The Journal of Chemical Physics*, 124(23):234104, 2006.
- [79] Giovanni Bussi, Davide Donadio, and Michele Parrinello. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, 126(1):014101, 2007.

-
- [80] Shichi Nosé. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics*, 52(2):255–268, 1984.
- [81] Glenn J. Martyna, Douglas J. Tobias, and Michael L. Klein. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*, 101(5):4177–4189, 1994.
- [82] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8):3684–3690, 1984.
- [83] Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, Kiyoshi Nishikawa, and Kenichi Kinugawa. Molecular collective dynamics in solid para-hydrogen and ortho-deuterium: The parrinello–rahman-type path integral centroid molecular dynamics approach. *The Journal of Chemical Physics*, 119(2):953–963, 2003.
- [84] Raúl Fuentes-Azcatl and José Alexandre. Non-polarizable force field of water based on the dielectric constant: Tip4p/ ϵ . *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(5):1263–1272, 2014. PMID: 24422512.
- [85] Peter. Kollman. Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. *Chemical Reviews*, 93(7):2395–2417, 1993.
- [86] John G. Kirkwood. Statistical mechanics of fluid mixtures. *The Journal of Chemical Physics*, 3(5):300–313, 1935.
- [87] Werner Billes, Florian Bazant-Hegemark, Matthias Mecke, Martin Wendland, and Johann Fischer. Change of free energy during adsorption of a molecule. *Langmuir*, 19(26):10862–10868, 2003.
- [88] J. Kästner. Umbrella sampling. *SRC SimTech*, 00(35):1–11, March 2011.

Apéndice A

Ensamble NVT

```
; Run parameters
integrator           = md
nsteps              = 40000000
dt                  = 0.0015
; Output control
nstxout             = 5000
nstvout             = 5000
nstenergy           = 5000
nstlog              = 5000
energygrps          = NW7 DXNA
; Bond parameters
continuation        = no
constraint_algorithm = lincs
constraints          = all-bonds
lincs_iter          = 1
lincs_order         = 4
; Neighborsearching
cutoff-scheme       = Verlet
ns_type             = grid
nstlist             = 10
rcoulomb            = 1.4
rvdw                = 1.4
; Electrostatics
coulombtype         = PME
pme_order           = 4
fourierspacing      = 0.16
; Temperature coupling
tcoupl              = V-rescale
```

```
tc-grps          = NW7DXNA Water_and_ions
tau_t           = 0.1    0.1
ref_t           = 270    270
; Pressure coupling
pcoupl          = no
; Periodic boundary conditions
pbc             = xyz
; Dispersion correction
DispCorr        = EnerPres
; Velocity generation
gen_vel         = yes
gen_temp        = 270
gen_seed        = -1
```

Apéndice B

Ensamble NPT

```
; Run parameters
integrator           = md
nsteps              = 5000000
dt                  = 0.001
; Output control
nstxout             = 500
nstvout             = 500
;nstxtcout          = 500
nstenergy           = 500
nstlog              = 500
nstxout-compressed  = 500
compressed-x-precision = 0.002
energygrps          = NW7 DXNA
; Bond parameters
continuation        = yes
constraint_algorithm = lincs
constraints          = all-bonds
lincs_iter          = 1
lincs_order         = 4
; Neighborsearching
cutoff-scheme       = Verlet
ns_type             = grid
nstlist             = 10
rcoulomb            = 1.4
rvdw                = 1.4
; Electrostatics
coulombtype         = PME
pme_order           = 4
```

```
fourierspacing      = 0.16
; Temperature coupling
tcoupl              = V-rescale
tc-grps             = NW7DXNA Water_and_ions
tau_t               = 0.1  0.1
ref_t               = 270  270
; Pressure coupling
pcoupl              = Berendsen
pcoupltype          = isotropic
tau_p               = 2.0
ref_p               = 1.0
compressibility     = 4.5e-5
refcoord_scaling    = com
; Periodic boundary conditions
pbc                 = xyz
; Dispersion correction
DispCorr            = EnerPres
; Velocity generation
gen_vel             = no
```

Apéndice C

Dinámica Molecular

```
; Run parameters
integrator           = md-vv
nsteps              = 70000000
dt                  = 0.0015
; Output control
nstxout             = 10000
nstvout             = 10000
nstfout             = 10000
nstenergy           = 10000
nstlog              = 10000
nstxout-compressed  = 1000
compressed-x-grps   = System
energygrps          = NW7 DXNA
; Bond parameters
continuation        = yes
constraint_algorithm = lincs
constraints          = all-bonds
lincs_iter          = 1
lincs_order         = 4
; Neighborsearching
cutoff-scheme       = Verlet
ns_type             = grid
nstlist             = 20
rlist               = 1.4
rcoulomb            = 1.4
rvdw                = 1.4
; Electrostatics
coulombtype         = PME
```

APÉNDICE C. DINÁMICA MOLECULAR

```
pme_order                = 4
fourierspacing           = 0.16
ewald_rtol               = 1e-5
; Temperature coupling
tcoupl                   = V-rescale
tc-grps                  = NW7DXNA Water_and_ions
tau_t                    = 0.1    0.1
ref_t                    = 270    270
; Pressure coupling
pcoupl                   = Berendsen
pcoupltype               = isotropic
tau_p                    = 2.0
ref_p                    = 1.0
compressibility           = 4.5e-5
refcoord_scaling         = com
; Periodic boundary conditions
pbc                      = xyz
; Dispersion correction
DispCorr                 = EnerPres
; Velocity generation
gen_vel                  = no
```

Apéndice D

Ensamble NPT (*Pulling*)

```
define                = -DPOSRES_CD
; Run parameters
integrator            = md-vv
nsteps                = 100000
dt                    = 0.002
; Output control
nstxout               = 100
nstvout               = 100
nstenergy             = 100
nstlog                = 100
; Bond parameters
continuation          = no
constraint_algorithm  = lincs
constraints            = all-bonds
lincs_iter            = 1
lincs_order           = 4
ns_type               = grid
; Neighborsearching
cutoff-scheme         = Verlet
nstlist               = 20
rlist                 = 1.4
rcoulomb              = 1.4
rvdw                  = 1.4
; Electrostatics
coulombtype           = PME
pme_order             = 4
fourierspacing        = 0.16
; Temperature coupling
```

APÉNDICE D. ENSAMBLE NPT (PULLING)

```
tcoupl          = V-rescale
tc-grps         = NW7DXNA  Water_and_ions
tau_t          = 0.1    0.1
ref_t          = 300    300
; Pressure coupling
pcoupl         = Berendsen
pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 2.0
ref_p          = 1.0
compressibility = 4.5e-5
refcoord_scaling = com
; Periodic boundary conditions
pbc           = xyz
; Dispersion correction
DispCorr      = EnerPres
; Velocity generation
gen_vel       = yes
gen_temp      = 310
gen_seed      = -1
; COM motion removal
nstcomm       = 100
comm-mode     = Linear
comm-grps     = System
```


Apéndice E

Generación de Ventanas “*Pulling*”

```
define                                = -DPOSRES_CD -DPOSRES_DXNA
; Run parameters
integrator                            = md-vv
dt                                     = 0.0010
tinit                                  = 0
nsteps                                 = 2000000
nstcomm                                = 10
; Output parameters
nstxout                               = 1500
nstvout                               = 0
nstfout                               = 0
nstxout-compressed                    = 1500
nstenergy                             = 1500
; Bond parameters
constraint_algorithm                  = lincs
constraints                           = all-bonds
continuation                          = yes
; Single-range cutoff scheme
cutoff-scheme                         = verlet
nstlist                               = 20
ns_type                               = grid
rlist                                  = 2.0
rcoulomb                              = 2.0
rvdw                                   = 2.0
; PME electrostatics parameters
coulombtype                           = PME
```

*APÉNDICE E. GENERACIÓN DE VENTANAS
“PULLING”*

```

fourierspacing          = 0.12
fourier_nx              = 0
fourier_ny              = 0
fourier_nz              = 0
pme_order               = 4
ewald_rtol              = 1e-5
optimize_fft            = yes
; Temperature coupling
Tcoupl                  = Nose-Hoover
tc_grps                 = NW7DXNA  Water_and_ions
tau_t                   = 1          1
ref_t                   = 300        300
; Pressure coupling
Pcoupl                  = Parrinello-Rahman
pcoupltype              = isotropic
tau_p                   = 1.0
compressibility         = 4.5e-5
ref_p                   = 1.0
refcoord_scaling        = com
; Generate velocities is off
gen_vel                 = no
; Periodic boundary conditions
pbc                     = xyz
; Long-range dispersion correction
DispCorr                = EnerPres
; Pull code
pull                    = umbrella
pull-geometry           = distance
pull-dim                = Y N N
pull-start              = yes
pull-ngroups            = 2
pull-ncoords            = 1
pull-group1-name        = DXNA
pull-group2-name        = NW7
pull-coord1-groups      = 0 1
pull-coord1-rate        = 0.01      ; 0.01 nm per ps
pull-coord1-k           = 10000     ; kJ mol-1 nm-2

```

Apéndice F

Dinámica Molecular c/ventana *“Umbrella Sampling”*

```
define                = -DPOSRES_CD -DPOSRES_DXNA
integrator            = md-vv
nsteps               = 20000000
dt                   = 0.0010
nstxout              = 1000
nstvout              = 0
nstfout              = 0
nstxout-compressed   = 1000
nstenergy            = 1000
nstcomm              = 1000
constraint_algorithm = lincs
constraints           = all-bonds
continuation         = yes
ns_type              = grid
cutoff-scheme        = Verlet
nstlist              = 20
rlist                = 1.4
rcoulomb             = 1.4
rvdw                 = 1.4
coulombtype          = PME
fourierspacing       = 0.16
pme_order            = 4
ewald_rtol           = 1e-5
optimize_fft         = yes
Tcoupl               = Nose-Hoover
tc_grps              = NW7DXNA Water_and_ions
```

APÉNDICE F. DINÁMICA MOLECULAR C/VENTANA
“UMBRELLA SAMPLING”

tau_t	=	0.8	0.8
ref_t	=	300	300
Pcoupl	=	Parrinello–Rahman	
pcoupltype	=	isotropic	
tau_p	=	1.0	
ref_p	=	1.0	
compressibility	=	4.5e-5	
refcoord_scaling	=	com	
gen_vel	=	no	
pbc	=	xyz	
DispCorr	=	EnerPres	
pull	=	umbrella	
pull-geometry	=	distance	
pull-dim	=	Y N N	
pull-start	=	yes	
pull-ngroups	=	2	
pull-ncoords	=	1	
pull-group1-name	=	DXNA	
pull-group2-name	=	NW7	
pull-coord1-groups	=	1 2	
pull-coord1-rate	=	0.0	
pull-coord1-k	=	10000	; kJ mol ⁻¹ nm ⁻²