

DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN EN SISTEMAS BIFÁSICOS POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

CHRISTIAN FELIPE PANTOJA RIVILLAS



UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA DE QUÍMICA

SANTIAGO DE CALI

2014

DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN EN
SISTEMAS BIFÁSICOS POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

CHRISTIAN FELIPE PANTOJA RIVILLAS

Proyecto de Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al
título de Química

Director de tesis:

Julien Wist, Dr.Sc

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI

2014

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN EN
SISTEMAS BIFÁSICOS POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

CHRISTIAN FELIPE PANTOJA RIVILLAS, 1991

PALABRAS CLAVES: SISTEMAS BIFÁSICOS, PULSOS
SELECTIVOS, CODIFICACIÓN ESPACIAL, COEFICIENTE DE
PARTICIÓN

Contenido

1. Resumen.....	11
2. Objetivos.....	12
2.2. Objetivo General.....	12
2.2. Objetivo específicos.....	12
3. Introducción.....	13
3.1. El origen en la inhomogeneidad magnética en sistemas bifásicos.....	13-14
3.2. Descripción de los experimentos selectivos en RMN.....	14-21
3.2.1. Codificación espacial.....	14-16
3.2.1. Selección espacial.....	17-19
3.3. Compensación de la inhomogeneidad en los experimentos selectivos.....	19-20
3.2.2. Coeficiente de partición K_D	19-20
4. Antecedentes y planteamiento del problema.....	2-25
4.1. Sistemas Bifásicos Liquido-Liquido.....	20-24
4.2. Determinación del Coeficiente de partición K_D	24-25
4.2.1. Método Shake-flask.....	25
4.2.2 Método de cromatografía líquida.....	25
5. Metodología.....	26
5.1. Composición de los sistemas ODA y ODM.....	26
5.2. Secuencias de pulsos selectivas.....	26
5.2.1. Secuencia DPGSE-Selectiva.....	27
5.2.1. Secuencia DPGSE-Múltiple-Excitación.....	27-28

6. Discusión de resultados.....	29
6.1. Experimentos DPGSE-selectivo y DPGSE-Múltiple-Excitación: Sistema ODA y Sistema ODM.....	31-32
6.3. Determinación del coeficiente de partición.....	33-35
6.4. Comparación en términos de sensibilidad y limitaciones.....	35
7. Conclusiones.....	36
8. Referencias.....	37-38

Lista de Tablas

Tabla 1.0 Comparación entre la Determinación del coeficiente de partición por RMN y cromatografía gas-liquido CGL.....	33
Tabla 2.0 Variación del coeficiente de partición P medido por RMN con respecto a la temperatura.....	34

Lista de Figuras

1. Descripción del sistema bifásico (ODA), representación ambiente y la inducción magnética en cada fase.....
2. Descripción del proceso de codificación espacial en el experimento eco de gradiente.....
3. Descripción de los perfiles de excitación tras llevar acabo la transformada de Fourier en el espacio del tiempo; A) pulso gaussiano, B) Pulso cuadrado.....
4. Descripción del proceso de selección de un volumen discreto a partir de la variación sobre el SPOFF a lo largo del sistema bifásico.....
5. Descripción del proceso de múltiple-excitación realizado sobre el sistema bifásico (OD).....
6. Descripción espacial de selección realizada por los esquemas (DPFGSE) Selectivo y (DPFGSE) Multi- Selectivo.....
7. Selección espacial realizada por la secuencia PRESS.....
8. Secuencias selectivas, A. Secuencia DPFGSE propuesta por Kozminski, B. Secuencia DPFGSE-Selectiva, C. Secuencia DPFGSE-Múltiple-Excitación.....
9. Espectro protónico ^1H del sistema ODA, Temperatura 300K.....
10. Espectro protónico ^1H del sistema ODM, Temperatura 300K.....
11. Experimento DPFGSE-selectivo realizado a diferentes distancias de la interfase del sistema ODM.....
12. Superposición de los espectro espacialmente selectivos sobre del sistema (ODA) medidos a 293K
13. Superposición de los espectro espacialmente selectivos sobre del sistema (ODM) medidos a 293K

14 Determinación del coeficiente de partición P en función de la posición espacial en los sistemas ODA y ODM a 273 K y 272K.....

15 Comparación entre el experimento (DPFGSE) Multi- Selectivo (rojo) y el experimento protónico ^1H (azul) para el sistema (Octanol/ D_2O /Metanol) a 300K....

Lista de Símbolos

λ : Susceptibilidad magnética

Ω_{cs} : Corrimiento Químico

K_D : Coeficiente de partición

μ : Potencial Químico

μ^0 : Potencial Químico estándar

μ_0 : Permeabilidad magnética del vacío

$\vec{B}$: Inducción magnética interna

$\vec{B}_0$: Campo magnético estático

γ : Relación giromagnética

ν_0 : Frecuencia de resonancia.

ϕ : Fase codificada

ϕ_0 : Fase inicial

ϕ_{cs} : Fase asociada al corrimiento químico

a_x : Actividad

V_x : Volumen parcial molar

K : Constante universal de los gases

Lista de Abreviaturas y Acrónimos

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

DPFGSE: Double Pulsed Field Gradient Selective Echo

ODA: Sistema Octanol/D₂O/Acetona

ODM: Sistema Octanol/D₂O/Metanol

AFM: Atomic force microscopy

SEM: Scanning electron microscope

SFG: Sum frequency generation spectroscopy

MRI: Magnetic resonance imaging

ISIS: imaged selected in vivo spectroscopy

PRESS: Point Resolved Spectroscopy Sequence

STEAM: Stimulated echo acquisition mode

UV: Espectroscopia Ultravioleta

HPLC: High-performance liquid chromatography

GC: Gas-liquid chromatography

TLC: Thin-layer chromatography

SPOFF: offset del pulso

1. Resumen

Habitualmente los experimentos de RMN son llevados a cabo en campos magnéticos altamente homogéneos sin embargo, en el caso de los sistemas bifásicos la inhomogeneidad magnética producto de la diferencia en la susceptibilidad magnética entre fases hacen de dicho objetivo una meta difícil de alcanzar, por lo tanto estrategias como la selección espacial abren nuevos caminos en la búsqueda de metodologías capaces de realizar estudios dinámicos y cuantitativos sobre tales sistemas.

En el presente trabajo se realizó una modificación sobre los bloques de selección del esquema DPGSE (Double Pulsed Field Gradient Selective Echo) propuesto por Kozminski ^[1] en el año 2000, con lo cual se logra una múltiple excitación por medio de una modulación sinusoidal de un pulso selectivo, posteriormente se calculó el coeficiente de partición (K_d) de los sistemas *Octanol/D₂O/Acetona* (**ODA**) y *Octanol/D₂O/Metanol* (**ODM**) encontrando valores de $K_d = 0.62$ para el sistema ODA a 273K y $K_d = 0.19$ para el sistema ODM a 272K, lo cual fue consistente con los valores reportados en la literatura.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

- Proponer una secuencia capaz compensar la inhomogeneidad del campo magnético producto de la diferencia en la susceptibilidad magnética entre las fases del sistema

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar el coeficiente de partición para los sistemas (ODA) y (ODM) por medio de los esquemas selectivos propuestos.
- Analizar las fortalezas y debilidades de los esquemas selectivos con respecto a su capacidad para cuantificar un analito en sistemas bifásicos.
- Comparar los esquemas selectivos con los métodos actuales que son empleados en la determinación de los coeficientes de partición.

3. Introducción

3.1 El origen de la inhomogeneidad magnética en sistemas bifásicos

Consideremos un sistema compuesto por dos fases homogéneas en mutuo contacto α y β . Posteriormente, una vez ambas fases se encuentren saturadas se procede a la incorporación del analito de interés.

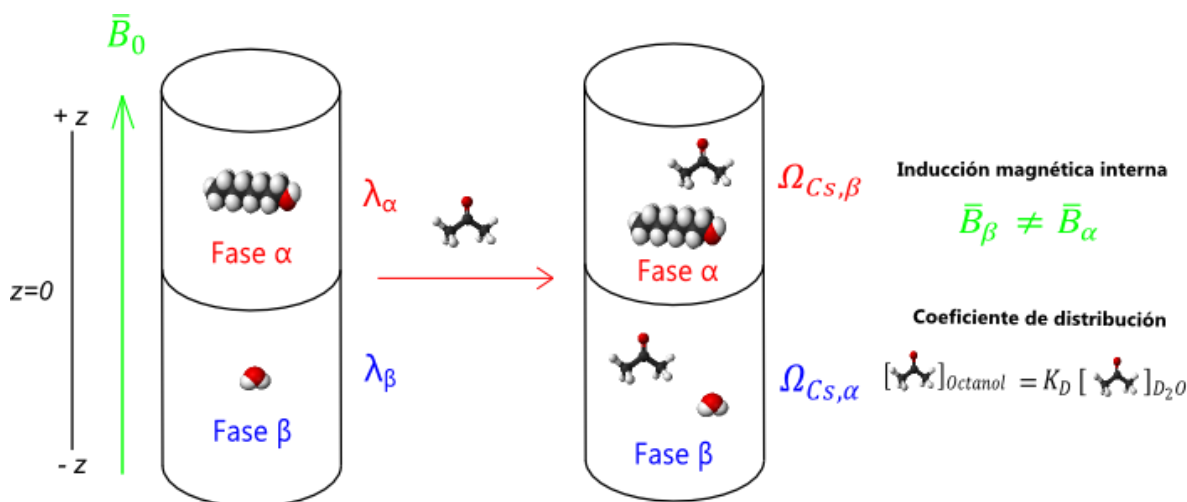


Figura 1. Descripción del sistema bifásico (ODA), representación del ambiente químico y la inducción magnética en cada fase

El equilibrio de partición se alcanza una vez el potencial químico μ_x de la especie en ambas fases se iguala:

$$\mu_{x,\alpha} = \mu_{x,\beta} \quad (1)$$

Dos parámetros fundamentales, determinan el ambiente magnético de un núcleo:

- El primero corresponde al ambiente químico en el cual se encuentra inmerso el núcleo de interés que en este caso resulta ser uniforme a lo largo de cada fase.
- El segundo parámetro corresponde a la inducción magnética interna $\vec{B}$, la cual depende de la permeabilidad magnética de vacío μ_0 y la susceptibilidad magnética λ correspondiente a cada fase:

$$\overrightarrow{B_\alpha} = \mu_0(1 + \lambda_\alpha)\overrightarrow{B_0} \quad (2)$$

$$\overrightarrow{B_\beta} = \mu_0(1 + \lambda_\beta)\overrightarrow{B_0} \quad (3)$$

En este caso, dado que λ cambia abruptamente al pasar de una fase a otra, se origina una distorsión sobre el campo magnético aplicado y por ende sobre la forma de las señales resultantes.

3.2 Descripción de los experimentos selectivos en RMN

3.2.1. Codificación espacial

En ausencia de un gradiente de campo magnético, el campo magnético es homogéneo. Esto significa que la magnitud y dirección del campo en todos los puntos del espacio es la misma. Consideremos un campo magnético de magnitud B_0 aplicado en la dirección del eje z:

$$B(r) = B_0 \cdot e_z \quad (4)$$

Donde e_z es un vector unitario de la forma $e_z = [0 \ 0 \ 1]$

En presencia de un gradiente de campo magnético la magnitud de campo varía de forma gradual a lo largo de la dirección del gradiente, en este caso consideremos un gradiente de campo magnético de magnitud G aplicado en la dirección del eje z:

$$B(r) = B_0 \cdot e_z + G \cdot z \cdot e_z \quad (5)$$

La posición en z se encuentra dada como $z = r \cdot e_z$

Si consideramos la relación existente entre la frecuencia de resonancia $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$ donde γ corresponde a la relación giromagnética y el campo magnético que experimenta el núcleo es posible obtener una frecuencia específica en cada posición a lo largo del eje z:

$$B(z) = B_0 \cdot e_z + G \cdot z \cdot e_z$$

$$\frac{\gamma B(z)}{2\pi} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \cdot e_z + \frac{\gamma G \cdot z}{2\pi} \cdot e_z$$

$$v(z) = v_0 \cdot e_z + \frac{\gamma G \cdot z}{2\pi} \cdot e_z \quad (6)$$

El ancho de frecuencias codificadas SW está dado a partir de la magnitud del gradiente G y la longitud de muestra L en la bobina de detección

$$SW = \gamma \cdot G \cdot L \quad (7)$$

En la mayoría de los casos esta longitud corresponde a un valor constante entre $18mm$ a $20mm$ que corresponde a la longitud de las bobinas en la sonda de tal forma que el SW podrá ser modificado según el valor de G empleado durante la codificación espacial

Las etapas que acontecen durante la codificación espacial están descritas en la **figura 2.** para el experimento eco de gradiente [2]

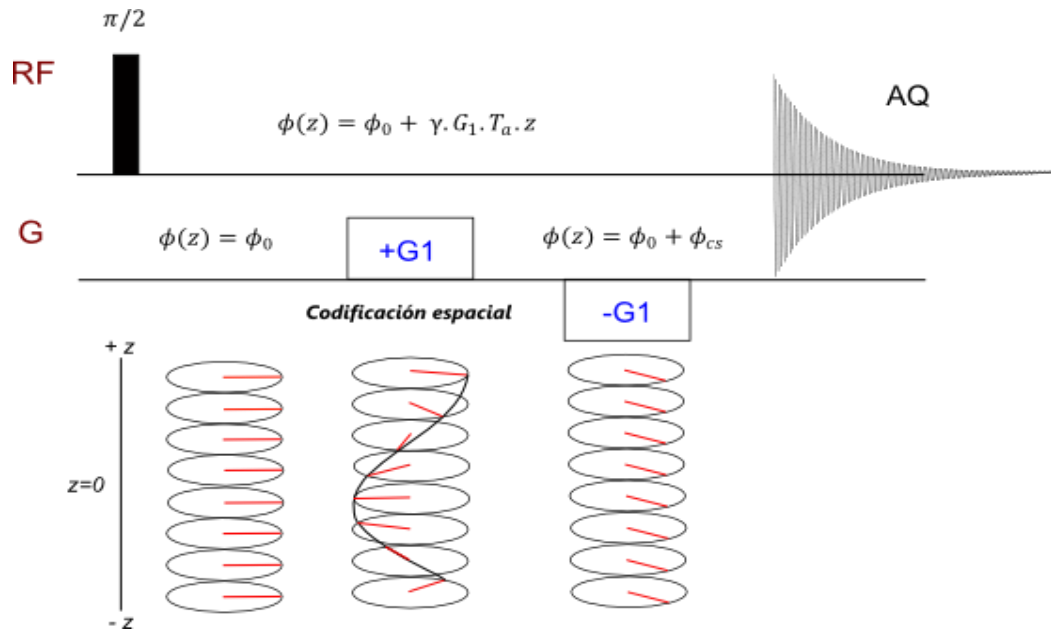


Figura 2. Descripción del proceso de codificación espacial en el experimento eco de gradiente

En el comienzo del experimento la magnetización del sistema se encuentra en equilibrio termodinámico a lo largo del eje z . Una vez el sistema es irradiado con un pulso de excitación la magnetización es transferida al plano xy donde la fase de cada uno de los isocromatos a lo largo del eje z está dada por la frecuencia de resonancia del núcleo y el tiempo de evolución t :

$$\phi_0 = 2\pi \cdot \nu_0 t \quad (8)$$

La aplicación del primer gradiente $+G_1$ de duración T_a ocasiona la codificación de la fase de cada isocromato como una función de la posición en el eje z , de modo que la frecuencia de resonancia de cada núcleo dependerá de su posición espacial tal como se encuentra descrito en la Ec. 6, en tanto la fase estará dada por:

$$\phi(z) = \phi_0 + \gamma \cdot G_1 \cdot T_a \cdot z \quad (9)$$

Posteriormente la aplicación de un segundo gradiente de signo opuesto $-G_1$ de la misma magnitud y duración T_a ocasiona la decodificación del sistema, igualando la fase a lo largo del eje z

$$\phi(z) = \phi_0 + \gamma \cdot G_1 \cdot T_a \cdot z - \gamma \cdot G_1 \cdot T_a \cdot z \quad (10)$$

$$\phi(z) = \phi_0 \quad (11)$$

3.2.2. Selección espacial

La aplicación de un pulso selectivo ^[3] de amplitud B_1 modulada lleva a cabo la selección del volumen de muestra una vez el sistema se encuentra codificado espacialmente por el gradiente de campo magnético G .

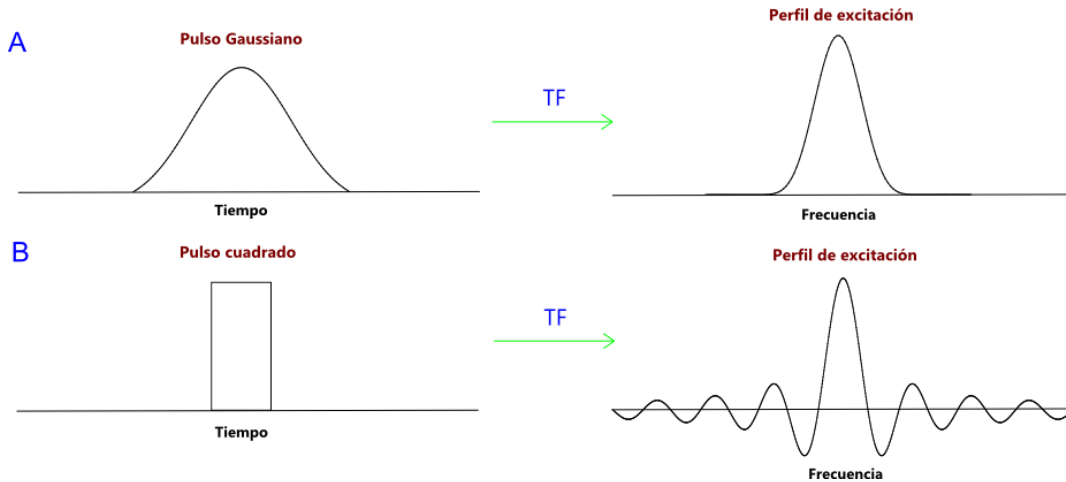


Figura 3. Descripción de los perfiles de excitación tras llevar a cabo la transformada de Fourier en el espacio del tiempo; A) pulso gaussiano, B) Pulso cuadrado

La selectividad del pulso depende de su perfil de excitación en el espacio de frecuencia, el cual puede ser obtenido de manera aproximada haciendo uso de la aproximación lineal sobre la transformada de Fourier. ^[4,5] Tal como se muestra en la **figura 3**, La selectividad del pulso gaussiano resulta ser mayor en relación al pulso cuadrado clásico, dado que el rango de frecuencias excitadas por este último resulta ser más extenso a consecuencia de las oscilaciones de su perfil de excitación a frecuencias lejanas a la condición de resonancia $\Omega_0 = 0$.

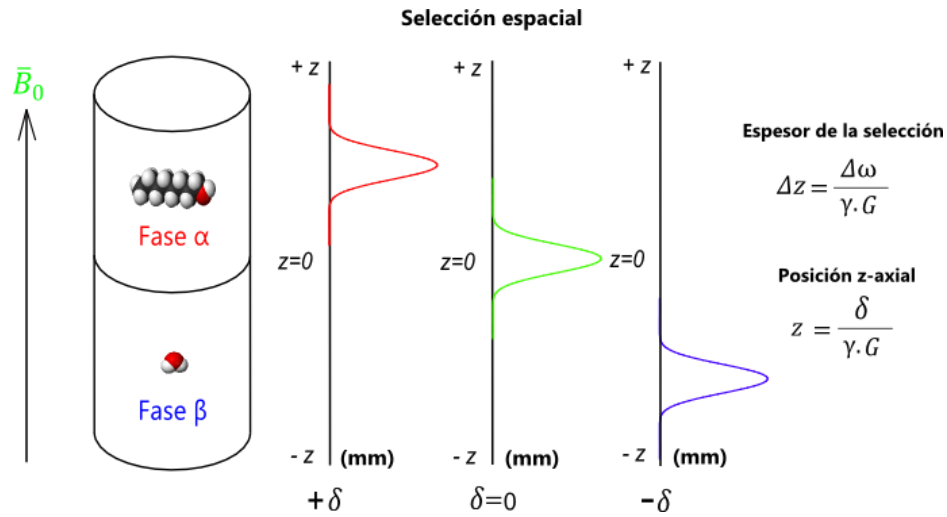


Figura 4. Descripción del proceso de selección de un volumen discreto a partir de la variación sobre el **SPOFF** (δ) a lo largo del sistema bifásico.

La simetría en la selección del volumen transversal de muestra en el sistema bifásico depende de la buena ubicación de la región interfacial en el centro de la bobina, ya que con ello se asegura que $+\gamma \cdot G \cdot z$ de gradiente se encuentre justamente en la interfase del sistema $z = 0$, de tal forma que un cambio sobre el signo de un valor específico de δ nos permita medir a una distancia simétrica en relación a la interfase. Las dimensiones del volumen de selección pueden ser modificadas variando el ancho del perfil de excitación $\Delta \omega$ o ajustando la magnitud del gradiente G de codificación tal como se encuentra descrito en la **figura 4**.

En el caso de realizar una excitación de más de una región, el pulso gaussiano es modulado con una fase sinusoidal, de modo que la selección se puede llevar a cabo en ambas fases simultáneamente tal como lo muestra la aproximación lineal de su perfil de excitación descrito en la **figura 5**.

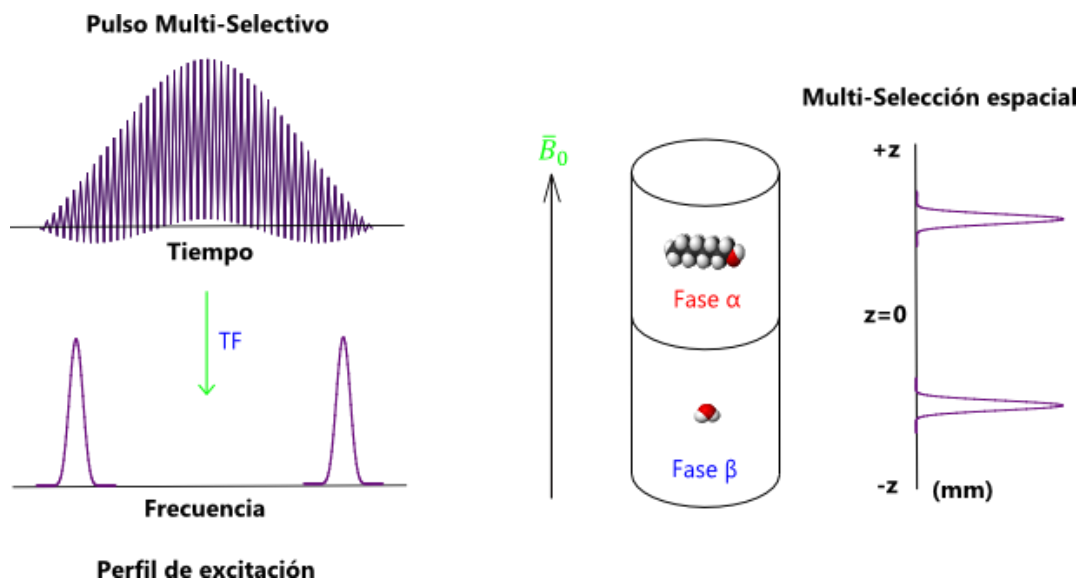


Figura 5. Descripción del proceso de múltiple-excitación realizado sobre el sistema bifásico (OD).

3.3. Compensación de la inhomogeneidad en los experimentos selectivos

La razón por la cual esta estrategia es capaz de sopesar la falta de homogeneidad se debe a la forma en la cual se realiza la selección del volumen de muestra tal como se encuentra descrito en la **figura 6**.

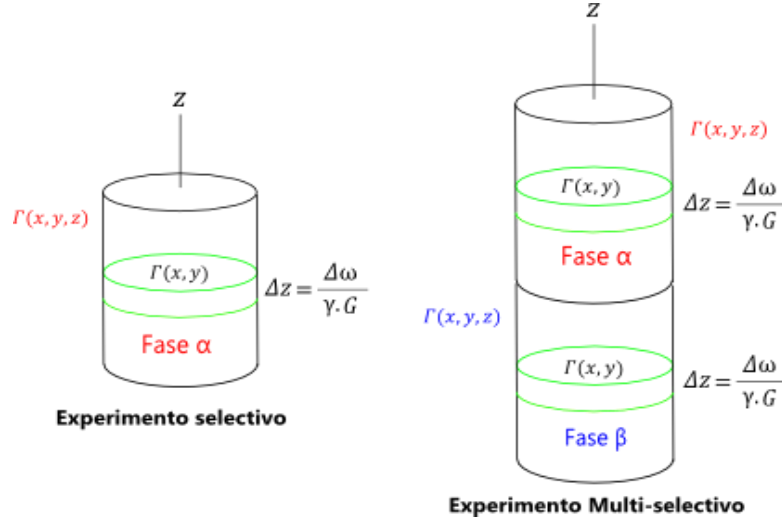


Figura 6. Descripción espacial de selección realizada por los esquemas (DPFGSE) Selectivo y (DPFGSE) Multi- Selectivo

La inhomogeneidad del campo está dada por una función tridimensional $\Gamma(x, y, z)$ a lo largo de toda la muestra, sin embargo cuando se lleva a cabo la selección de un volumen específico es posible considerar dicha función independiente de la componente z , de modo que las fluctuaciones espaciales solo dependerán de las componentes transversales de $\Gamma(x, y, z)$.

Tal como se observa en la **figura 6**, la inhomogeneidad depende principalmente de la variación a lo largo del eje z , mientras que las variaciones en las componentes transversales $\Gamma(x, y, z)$ son muy pequeñas, de modo que es posible considerar el volumen seleccionado de muestra como parcialmente homogéneo.

3.2.3. Coeficiente de partición (K_D):

Si una sustancia **X** se encuentra distribuida entre una fase orgánica y una fase acuosa en equilibrio, el potencial químico μ en cada una de las fases está dado por ^[6]:

$$\mu_X = \mu_X^0 + RT \ln a_X$$

$$\mu_X = \mu_X^0 + RT \ln(\gamma_X \varphi_X) \quad (12)$$

Donde μ_X^0 corresponde al potencial químico de la sustancia pura **X**, γ_X al coeficiente de actividad y φ_X es la fracción molar de la especie **X** en cada fase.

Para cada una de las fases φ_X esta dada por:

$$[X] \cdot V_X = \varphi_X \quad (13)$$

donde V_X corresponde al volumen parcial molar de X en solución. En el caso de soluciones diluidas de líquidos no electrolíticos en agua u octanol, el volumen parcial molar puede ser remplazado por el volumen molar del líquido puro sin errores apreciables,

$$V_X^{aq} = V_X^{org}$$

Condición de equilibrio: $\mu_X^{aq} = \mu_X^{org}$

$$\mu_X^0 + RT \ln(\gamma_X^{aq} \cdot [X]^{aq} \cdot V_X^{aq}) = \mu_X^0 + RT \ln(\gamma_X^{org} \cdot [X]^{org} \cdot V_X^{org})$$

$$\ln(\gamma_X^{aq} \cdot [X]^{aq} \cdot V_X^{aq}) = \ln(\gamma_X^{org} \cdot [X]^{org} \cdot V_X^{org})$$

$$\ln(\gamma_X^{aq}) + \ln([X]^{aq}) + \ln(V_X^{aq}) = \ln(\gamma_X^{org}) + \ln([X]^{org}) + \ln(V_X^{org})$$

$$\ln(\gamma_X^{aq}) - \ln(\gamma_X^{org}) = \ln([X]^{org}) - \ln([X]^{aq})$$

$$\exp\left[\ln\left(\frac{\gamma_X^{aq}}{\gamma_X^{org}}\right)\right] = \exp\left[\ln\left(\frac{[X]^{org}}{[X]^{aq}}\right)\right]$$

$$\left(\frac{\gamma_X^{aq}}{\gamma_X^{org}}\right) = \left(\frac{[X]^{org}}{[X]^{aq}}\right) = P$$

$$P = \left(\frac{\gamma_X^{aq}}{\gamma_X^{org}}\right) \quad (14)$$

4. Antecedentes y Planteamiento del Problema

4.1. Sistemas bifásicos líquido-líquido

Los sistemas bifásicos han sido estudiados ampliamente con la finalidad de comprender los fenómenos de transporte, equilibrios, coeficientes de partición, predicción de mecanismo de reacción, y modelamiento de membranas biológicas entre otros ^[7].

En la actualidad diversos métodos son usados en el estudio de la interfase líquido-líquido, entre ellos se encuentra la microscopia de fuerza atómica (AFM), los Rayos-X, la dispersión de neutrones y la microscopía electrónica de barrido (SEM). Aunque son técnicas muy útiles algunas de ellas provocan la modificación de la interfase o el rompimiento del equilibrio termodinámico del sistema como es el caso del AFM.

Históricamente la mayor parte de la información obtenida acerca de la estructura y dinámica de la interfase líquido-líquido proviene de los estudios de tensión superficial y análisis termodinámicos ^[8], aunque hace algunas décadas se han desarrollado métodos ópticos no lineales que con ayuda de estudios en dinámica molecular, han sido capaces de obtener información específica de esta región.

La espectroscopia SFG (Sum frequency generation spectroscopy) es considerada una técnica no lineal que permite analizar la estructura molecular de los sistemas hidrocarburo/agua por medio de variaciones en las frecuencias vibracionales en los enlaces de hidrógeno del H₂O cercanos a la región interfacial; por otro lado los estudios en dinámica molecular emplean el modelo de fluidos de Lennard-Jones con el fin de calcular los coeficientes de difusión en sistemas bifásicos en relación a su dependencia con la temperatura y la distancia promedio respecto a la interfase.

En general el estudio de los sistemas líquido-líquido impone un problema técnico importante: La discriminación entre la información proveniente del pequeño volumen que compone la interfase y la información proveniente del volumen de muestra restante. ^[9]

Hace algunos años en el campo de la resonancia magnética *in vivo* surgió la necesidad de estudiar sistemas biológicos de forma selectiva, de tal manera que la señal obtenida correspondiera a una región específica del sistema. El primer paso para alcanzar dicha meta consistió en modificar la superficie de las bobinas con la finalidad de observar señales de regiones discretas del sistema, sin embargo debía existir la posibilidad de

seleccionar la región espacial donde se deseaba extraer la señal, lo cual fue obtenido por medio de las técnicas de gradientes de campo estático donde se alteraba la forma del campo con el objetivo de obtener un campo magnético homogéneo únicamente en regiones cercanas al centro del imán ^[10] posteriormente se desarrollaría la técnica de “punto-sensible” la cual por medio de la variación en la fortaleza del gradiente de campo lograría la selección de un volumen específico sin alterar las señales restantes ^[11]

Aunque dichos métodos realizan la selección de un volumen discreto no poseen una buena resolución espacial de las señales por lo tanto fue necesario el uso de gradientes lineales y pulsos selectivos, tal como se realiza en los experimentos de (RMI). Un nuevo grupo de esquemas basados en las técnicas ISIS ^[12] (imaged selected in vivo spectroscopy) de múltiple selección permitieron realizar una determinación discreta del sistema sin la necesidad de excitar la totalidad del mismo, tal como sucedía con los esquemas anteriores, lo cual hizo de las técnicas ISIS altamente sensibles a los efectos dinámicos.

Dos de los esquemas más representativos de este tipo de experimentos corresponden a la secuencias PRESS ^[13] (Point Resolved Spectroscopy Sequence) y STEAM ^[14] (Stimulated echo acquisition mode) las cuales actualmente son empleadas en la mayoría de equipos de resonancia destinados a las aplicaciones *in vivo*.

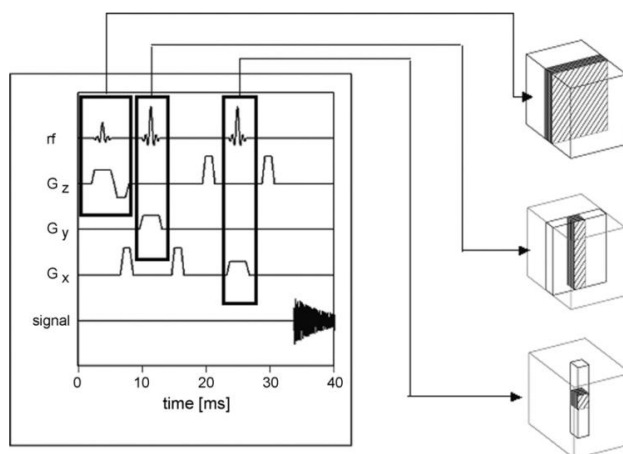


Figura 7.0 Selección espacial realizada por la secuencia PRESS a través de la geometría de un voxel ^[13]

Uno de los inconvenientes en este tipo de esquemas radica en los diferentes tiempos de relajación T_2 asociados a cada una de las especies químicas presentes en el sistema analizado, lo cual exige un continuo reajuste en los plazos del experimento con fin de no

perder señales de metabolitos específicos. Por otro lado la selección tridimensional se ve afectada por imperfecciones en los pulsos empleados para realizar la excitación a través de los tres ejes espaciales, razón por la cual procesos rigurosos de calibración y aplicación de fuertes gradientes son necesarios para evitar distorsiones sobre el voxel (ver figura 7.0) de selección, acosta de la reducción en sensibilidad debido a pérdidas por difusión ocasionadas por el uso de gradientes fuertes ^[14].

En el año 2009, Lambert ^[9] emplea la secuencia STEAM con el objeto de analizar la región cercana a la interfase del sistema Benceno-agua encontrando que los efectos por difusión cerca de la interfase son 5 veces menores en relación a los medidos internamente en cada una de las fases empleando un voxel de selección de $250 \times 250 \mu m^3$, logrando de esta forma una alta resolución cerca de la región interfacial pero una baja relación señal ruido debido a la pequeña región de muestra excitada.

Kozminski ^[1] ha propuesto un esquema basado en el Double Pulsed Field Gradient Selective Echo (DPFGSE) el cual ofrece una alta selectividad en sistemas heterogéneos a través de la selección de un volumen transversal de muestra, compensando parcialmente la pérdida de sensibilidad ocasionada por la geometría del voxel empleada en los esquemas STEAM y PRESS.

Otro enfoque diferente a la selección espacial con el fin de estudiar sistemas bifásicos fue propuesto por Martin ^[10] en el año 2012, su idea consiste en igualar la susceptibilidad magnética entre dos fases parcialmente miscibles por medio de un dopaje paramagnético de $GdCl_3$ obteniendo de esta forma una mejora sobre la resolución espectral, sin embargo dado que el ambiente magnético es igualado en ambas fases resulta problemático conocer por medio de RMN cómo una sustancia se distribuye o transfiere de una fase a otra.

4.2. Determinación del coeficiente de partición:

Los coeficientes de distribución han sido correlacionados con los estudios de actividad biológica para moléculas orgánicas simples de los cuales se ha concluido que solventes con cadenas largas de ésteres o alcoholes resultan ser los más apropiados para su uso como fase orgánica en determinación del coeficiente de distribución. En la actualidad el

sistema 1-octanol/Agua es el modelo más ampliamente usado y del cual se registra mayor cantidad de información en la literatura.

Dada la definición del coeficiente de distribución como una propiedad termodinámica medida bajo condiciones de equilibrio físico-químico específicas, permite describir cuantitativamente las propiedades lipofílicas e hidrofílicas de una sustancia en particular, lo cual se encuentra relacionado con la energía Gibbs de transferencia que representa en cierta medida la tendencia termodinámica de una sustancia a distribuirse entre dos fases en contacto. ^[15]

Actualmente dos de los métodos mayormente empleados en la determinación de los coeficientes de distribución son:

4.2.1. Método Shake-flask

El método Shake-flask consiste en disolver el analito en el sistema bifásico dentro de un tubo de ensayo, una vez ambas fases se encuentren mutuamente saturadas se procede a agitar el sistema y se deja reposar durante algunas horas hasta alcanzar el equilibrio de partición, finalmente se determina la concentración el analito en ambas fases a través de una variedad de métodos entre los que se destaca UV, HPLC, GC, TLC.

4.2.2. Método de Cromatografía líquida

En el año de 1951 Collander ^[16] logro establecer la relación existente entre el coeficiente de distribución y el factor de retención:

$$K_D = a \log(k) + b \quad (15)$$

Donde K_D corresponde al coeficiente de distribución, k al factor de retención y las constantes a , b corresponden a valores experimentales medidos en sustancias con coeficiente de distribución conocidos.

En el caso particular de los coeficientes de distribución en el sistema octanol-agua (**P**) se emplea generalmente columnas C_{18} y C_8 con una fase móvil compuesta de metanol-agua. En la actualidad los métodos de cromatografía líquida han sido ampliamente usados debido a su rapidez y reproducibilidad en sus resultados.

5. Metodología

Inicialmente se prepararon dos sistemas bifásicos de Octanol/ D_2O empleando como solutos acetona y metanol.

5.1. Composición de muestras:

Sistema Octanol/ D_2O /Acetona (ODA)

Se tomaron 225 μL de D_2O + 225 μL de Octanol y se agregaron 50 μL de acetona obteniendo una solución al 0.1% V/V.

Sistema Octanol/ D_2O /Metanol (ODM)

Se tomaron 230 μL de D_2O + 230 μL de Octanol y se agregaron 40 μL de metanol obteniendo una solución al 0.15% V/V

5.2. Secuencias de pulsos selectivas:

Los experimentos citados a continuación fueron tomados sobre un espectrómetro **Bruker Avance II- 400 MHz** con un campo $B_0=9.4T$ una sonda BBO (directa, la bobina de ^{13}C interna y la bobina 1H externa) equipada con gradientes en los 3 ejes. EL gradiente máximo para el eje z es de 50 G/cm

Se tomaron los espectros protónicos 1H para ambos sistemas con el objetivo de observar los efectos de la falta de homogeneidad sobre el ancho de banda de las señales a una temperatura de 300K.

Los espectros selectivos fueron tomados a partir de las modificaciones realizadas a la secuencia *DPFGSE* (*Double Pulsed Field Gradient Selective Echo*) propuesta por Kozminski en la **Figura 7A**. Este esquema consta de un pulso inicial de 90° encargado de generar la magnetización transversal, posteriormente dos bloques selectivos formados por un pulso *chirp* y un gradiente de codificación G_1 se encargan de realizar la selección espacial del volumen de muestra, mientras los gradientes G_A y G_B cumplen el papel de seleccionar el orden de coherencia ^[1] y eliminar los posibles artefactos formados durante el transcurso del experimento.

5.2.1. Secuencia DPFGE-selectiva

Teniendo en cuenta los argumentos dados sobre la selectividad anteriormente se procede a modificar la secuencia de Kozminski (**DPFGE**) empleando en cada bloque de selección un pulso gaussiano en lugar de un *chirp* pulso tal como se muestra en la **figura 7B**.

5.2.2. Secuencia DPFGE-Múltiple-excitación

Con la idea de lograr una excitación múltiple en el sistema se propone emplear en el bloque de selección un pulso gaussiano modulado sinusoidalmente en amplitud tal como se encuentra descrito en la **figura 7C**

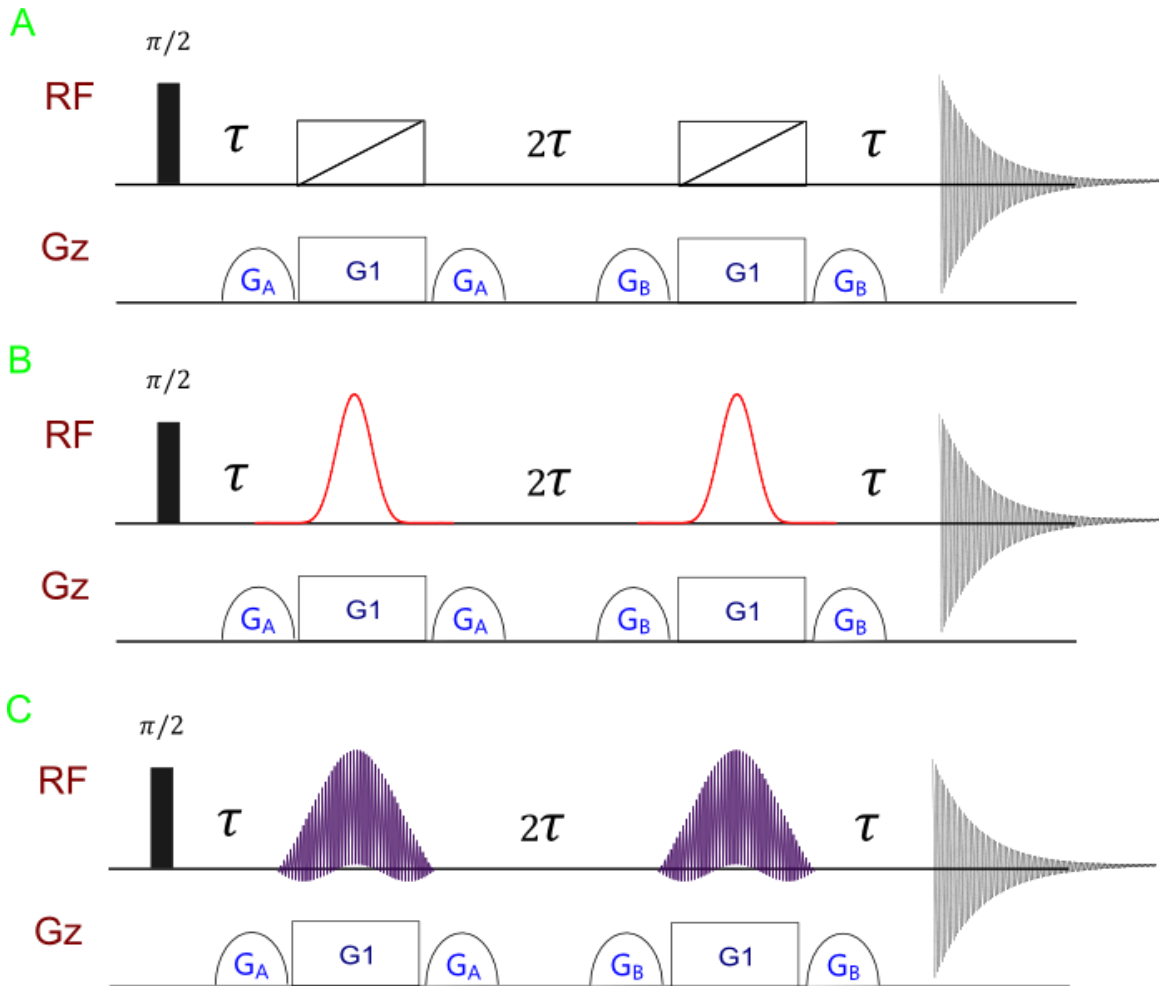


Figura 8. *Secuencias selectivas, A. Secuencia DPGSE propuesta por Kozminski, B. Secuencia DPGSE-Selectiva, C. Secuencia DPGSE-Múltiple-Excitación.*

El pulso gaussiano empleado tiene duración $1ms$ y un ancho de banda $\Delta\omega = 1200Hz$, la magnitud del gradiente de codificación $+G_1$ fue ajustado al 20% del valor máximo lo cual corresponde a 11 gauss/cm, mientras que los gradientes G_A y G_B se ajustaron al 40% del valor máximo lo cual corresponde a 22 gauss/cm

Los esquemas selectivos al igual que los experimentos protónicos 1H se realizaron a diferentes temperaturas con la idea de observar las variaciones sobre el coeficiente de partición del sistema.

Todos los espectros obtenidos fueron procesados e integrados en el software de Scilab versión 5.4

6. Discusión de resultados:

Inicialmente se obtuvieron los espectros ^1H correspondiente a los sistemas bifásicos (ODA) y (ODM) con la idea de mostrar el efecto ocasionado por la diferencia de susceptibilidad magnética (λ) bajo condiciones óptimas de *shimming*

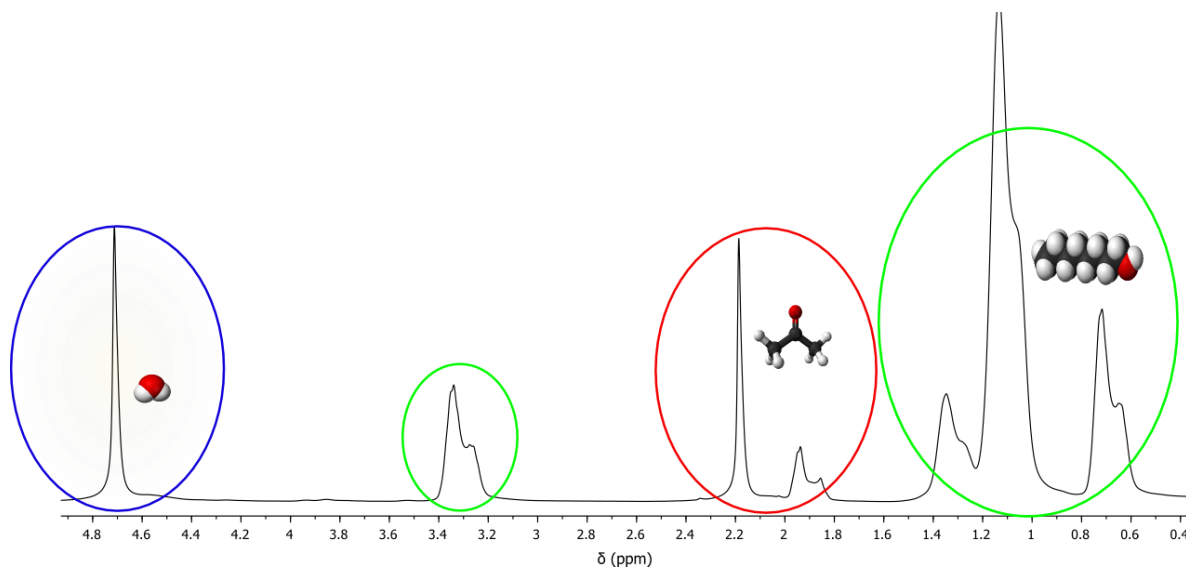


Figura.9 Espectro protónico ^1H del sistema ODA, Temperatura 300K

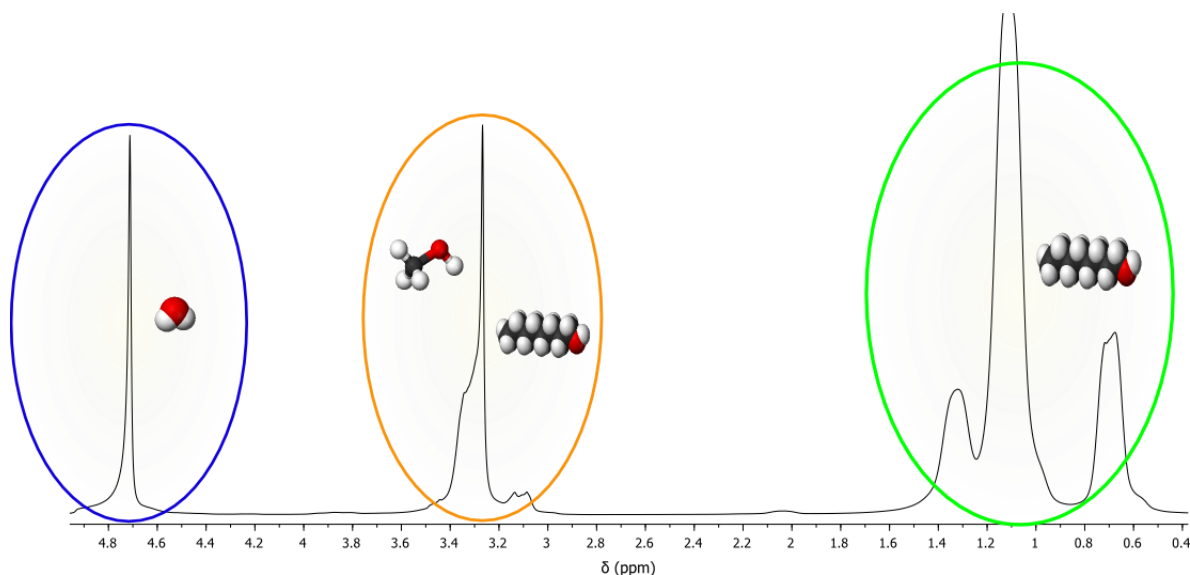


Figura.10 Espectro ^1H del sistema ODM, Temperatura 300K

El ensanchamiento inusual de las señales se atribuye a la inhomogeneidad del campo magnético producto de la diferencia de susceptibilidad magnética (χ) entre las dos fases, Igualmente se observan señales asimétricas típicas de sistema inhomogeneos. Sin embargo en el caso del sistema *ODA* es posible asignar las señales correspondientes a la acetona en ambas fases, las cuales se encuentran ubicadas a 2.2 ppm y 1.9 ppm señaladas en la **figura 9**, mientras que en el sistema *ODM* no es posible resolver ambas señales correspondientes al metanol dado que una de ellas se encuentra solapada con la señal del ($\text{CH}_2\text{--O}$) perteneciente al octanol cercana a los 3.4 ppm tal como se muestra en la **figura 10**, lo cual resulta problemático si se desea cuantificar la concentración del analito a través de este tipo experimento.

Vale destacar que las señales correspondientes al grupo hidroxilo (--OH) no se observan a razón del rápido intercambio *Protón-Deuterio* ^[17] que se lleva cabo con el D_2O del sistema,

Empleando la secuencia DPFGE-selectiva fue posible observar como la inhomogeneidad afecta la resolución espectral a medida que nos acercamos a la interfase

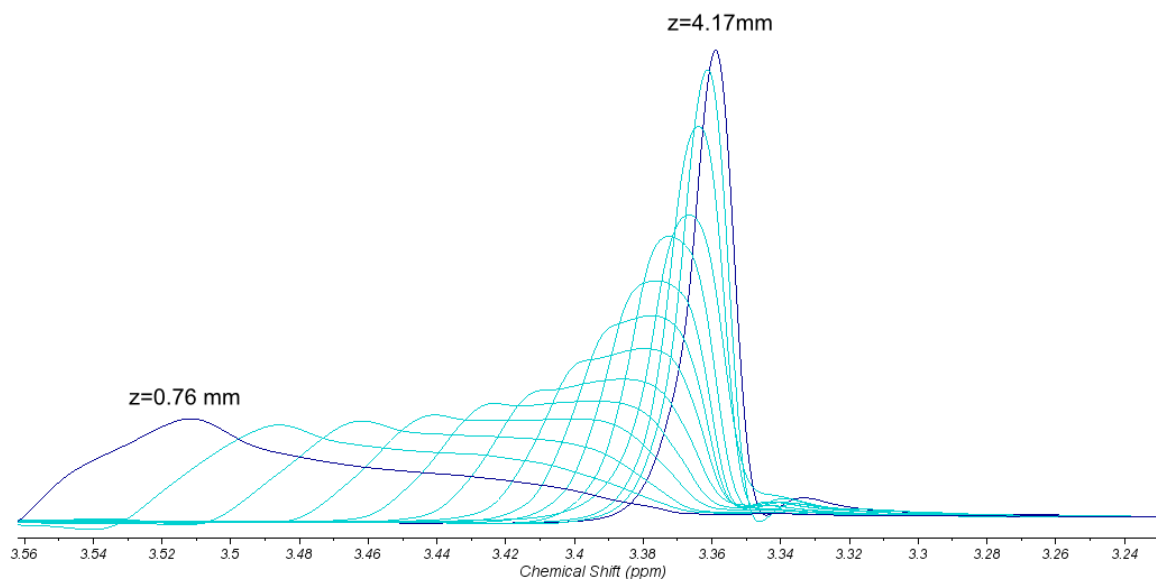


Figura. 11 Experimento DPFGE-selectivo realizado a diferentes distancias de la interfase del sistema *ODM*

La señal del ($\text{CH}_3\text{--}$) del metanol medida a $z = 4.17\text{ mm}$ de distancia en relación a la interfase posee un corrimiento químico de 3.36 ppm con una resolución relativamente buena, sin embargo una vez se comienza a variar el SPOFF (δ) con el fin de acercarnos al punto $z=0\text{mm}$ se observa como la forma de la señal se degrada gradualmente hasta

una gran banda que se extiende entre 3.36 ppm y 3.56 ppm a una distancia de **z=0.76 mm** de la interfase.

6.1. Experimentos DPGSE-selectivo y DPGSE-Múltiple-Excitación: Sistema ODA y Sistema ODM

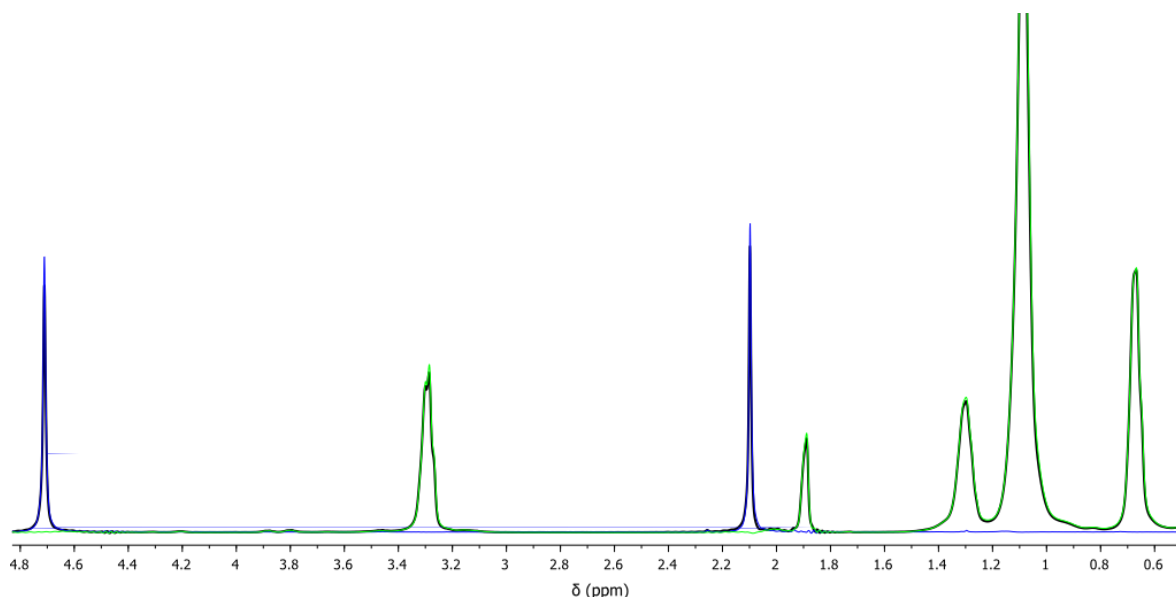


Figura. 12. Superposición de los espectro espacialmente selectivos sobre el sistema (ODA) medidos a 293K

En la superposición de los espectros selectivos del sistema ODA en la **figura.13**, la selección de una volumen discreto en la fase acuosa a **z=3.17mm** muestra la aparición de únicamente dos señales correspondientes al HDO/H₂O a 4.7 ppm y la acetona en dicha fase a 2.1ppm (*azul*). Posteriormente se cambió el signo de δ con la finalidad de seleccionar un volumen discreto sobre fase orgánica del sistema a **z=-3.17 mm** de la interfase, mostrando las correspondientes señales de la fase orgánica (*verde*) y de la acetona inmersa en ella a 1.85 ppm con una diferencia de 0.2 ppm en relación a su corrimiento químico en la fase acuosa. D₂O

A diferencia del esquema anterior (δ) no necesita ser modificado para realizar la selección de un volumen discreto dado que el perfil de excitación es simétrico respecto a $z=0\text{mm}$, razón por la cual en una única medición es posible recopilar la información de dos experimentos selectivos medidos a la misma distancia de la interfase, tal como se observa en el espectro Multi-selectivo denotado en negro en la **figura 12**.

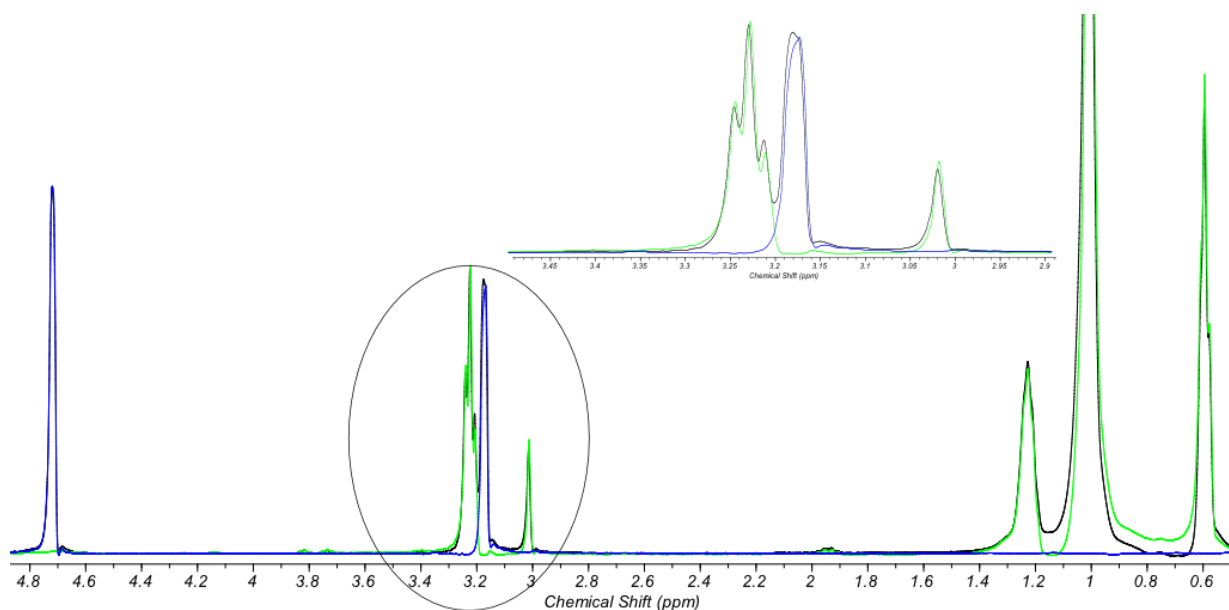


Figura 13. Superposición de los espectro selectivos sobre del sistema (ODM) medidos a 293K

En el sistema ODM se observa que la señal correspondiente al (CH_3^-) del metanol en la fase D_2O (azul) medida a $z=3.17\text{mm}$ de la interfase posee un corrimiento químico de 3.19ppm, la cual no había sido resuelta en el experimento ^1H , mientras que en selección realizada sobre fase orgánica (verde) se observa que el metanol posee un corrimiento de 3.01ppm con una diferencia de 0.18ppm similar a la observada en el sistema ODA

A diferencia del anterior esquema la señal del metanol a 3.19 ppm reportada en el experimento de múltiple excitación (negro) sigue estando solapada parcialmente, aunque la resolución del experimento es mucho mayor en comparación con el espectro ^1H reportado en la **figura**. Por tal razón en sistemas donde el solapamiento es dominante el esquema **DPFGSE-selectivo** resultan ser más eficiente

6.3 Determinación del coeficiente de partición

El coeficiente de distribución de una sustancia X en el sistema 1-octanol/agua está representado por la letra P, donde la concentración de la sustancia X en la fase orgánica se encuentra representada por $[X]^{org}$ y en la fase acuosa por $[X]^{aq}$:

$$P = \frac{[X]^{org}}{[X]^{aq}} \quad (15)$$

La cantidad representada por P corresponde a un valor adimensional independiente de la concentración total de la sustancia X, que se encuentra definido para una temperatura específica donde ambos solventes se encuentran mutuamente saturados.

El coeficiente de partición **P** del sistema Octanol/D₂O/Acetona fue determinado a una temperatura de 293K a través de la integración de las señales del analito en los experimentos antes mencionados.

Tabla 1.0 Comparación entre la determinación del coeficiente de partición por RMN y cromatografía gas-liquido CGL

Tipo experimento	Coeficiente de partición P, NMR, T=293K	Coeficiente de partición P, CGL, T=293K	Porcentaje de diferencia (%)
Protónico ¹ H	0.414	0.5754	28.0
(DPFGSE) Selectivo	0.628	0.5754	9.1
(DPFGSE) Multi-selectivo	0.620	0.5754	7.7

Tal como se observa en la **tabla 1.0**, los coeficientes de partición **P** obtenidos a partir de los dos tipos de experimentos selectivos son muy cercanos, lo cual indica la equivalencia de ambos métodos en términos de cuantificación, haciendo que el uso de uno u otro dependan exclusivamente de las características del sistema y no del tipo de esquema de selección empleado.

Posteriormente se analizó el coeficiente de partición (P) de ambos sistemas en función de la posición espacial con la finalidad de garantizar el estado de equilibrio.

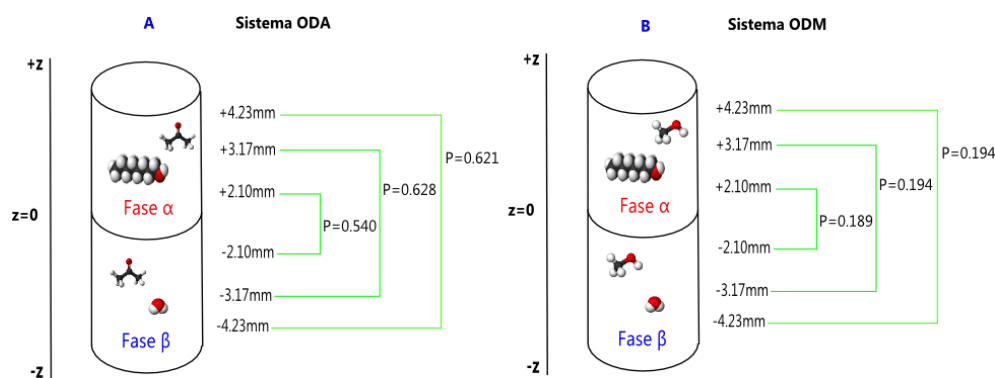


Figura 14. Determinación del coeficiente de partición P en función de la posición espacial en los sistemas ODA y ODM a 273 K y 272K

Dado que el coeficiente de partición corresponde a una propiedad termodinámica intensiva al medir dicha propiedad a lo largo de la muestra la variación en su valor estimado de equilibrio debe ser muy pequeña tal como se observa en regiones superiores a los 2.10mm, sin embargo en regiones cercanas a la interfase se observan cambios mayores como consecuencia del continuo intercambio de moléculas del analito de una fase a otra modificando ligeramente el valor de equilibrio medido experimentalmente tal como es observado a distancias menores a 2.10mm en la **figura 14**

El sistema ODM fue empleado para determinar la dependencia del coeficiente de partición P en relación a la variación de temperatura haciendo uso del esquema (DPFGSE) selectivo.

Tabla 2.0 Variación del coeficiente de partición P medido por RMN con respecto a la temperatura

Experimento	Coeficiente de partición P , NMR			Coeficiente de partición P , CGL
	T=292K	T=300 K	T=307K	T=292K
(DPFGSE) selectivo	0.194	0.221	0.260	0.1949845

La variación del coeficiente de distribución P con la temperatura está descrito a partir de las relaciones de termodinámicas de transferencia [6]:

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln(P) \quad (16)$$

Asumiendo que el cambio en la entalpía molar estándar ΔH^0 es independiente en el rango de temperaturas de estudio, se obtiene que la dependencia de **P** en relación a la temperatura está dado por:

$$\frac{d \ln(P)}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (17)$$

Sin embargo desde un punto de vista práctico, esta relación no es muy exacta dado que no siempre se tiene a disposición las entalpías de transferencia como tampoco la dependencia del volumen molar del solvente en relación a la temperatura.

Según estudios realizados por Leo Albert en 1971^[6] sobre la dependencia de los coeficientes de distribución en relación a la temperatura, se demostró que dichos coeficientes cambian muy poco en tanto ambas fases sean parcialmente miscibles, lo cual es acorde con la pequeña variación observada en las mediciones realizadas por RMN.

6.4. Comparación en términos de sensibilidad y limitaciones

La fortaleza del método Shake-flask radica en la determinación directa del coeficiente de partición sin realizar aproximaciones teóricas acerca del valor real del mismo sin embargo al igual que en la mayoría de metodologías analíticas propuestas la sensibilidad resulta ser el factor limitante a la hora de cuantificar la cantidad de analito presente en cada una de las fases.

En el caso de la espectroscopia UV el rango de detección esta dado para coeficientes de partición entre $-1 < \log(P) < 1$ siempre y cuando se tenga garantía de la pureza del soluto, mientras que en el caso de los métodos cromatográficos el rango de detección se extiende desde $-3 < \log(p) < 3$ bajo condiciones ideales de medición.

Para el caso de los esquemas selectivos empleados anteriormente la sensibilidad resulta ser uno de los principales desafíos en su implementación, dado que sus principios hacen del método una técnica poco sensible tal como se encuentra descrito en la **figura 6**.

A pesar de las ventajas en términos de resolución la sensibilidad se ve fuertemente afectada debido a la reducción en el volumen observado ya que la intensidad de las señales depende del número de núcleos excitados por unidad de volumen, tal como se muestra en la imagen comparativa de la **figura 15** correspondiente a un esquema (DPFGSE) Multi- Selectivo que posee un espesor de selección de $\Delta z = 0.25 \text{ mm}$.

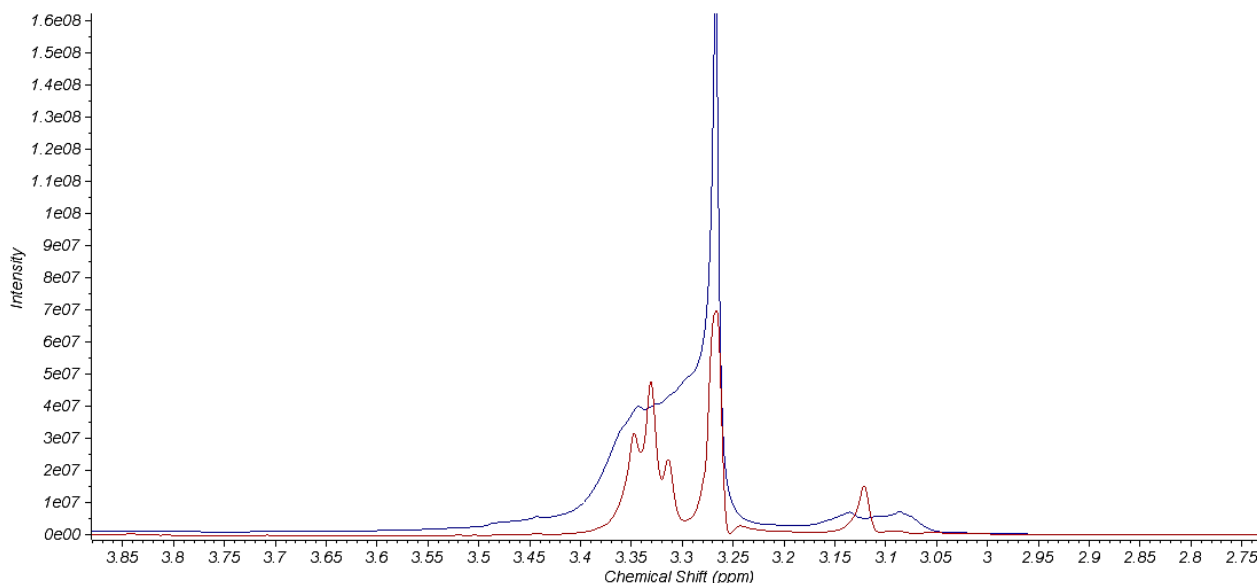


Figura 15. Comparación entre el experimento (DPFGSE) Multi- Selectivo (rojo) y el experimento protónico ^1H (azul) para el sistema (Octanol/ D_2O /Metanol) a 300K

Por lo tanto en el caso de analitos que se encuentren 50 o más veces concentrados en una fase con respecto a la otra, los esquemas selectivos propuesto resultaran ineficientes dado que la intensidad de las señal en una de las fases será prácticamente imperceptible haciendo imposible la determinación del coeficiente de partición de la especie.

7. Conclusiones

-La modificación llevada a cabo sobre el esquema de Kozminski con la idea de realizar una múltiple excitación a través de una modulación sinusoidal del pulso gaussiano permitió obtener resultados similares a los obtenidos con el esquema de única selección (DPFGSE-selectivo), haciendo de ambos métodos complementarios en función de las características particulares de cada sistema en estudio. Sin embargo, la diferencia de los resultados obtenidos por los dos métodos es tan pequeña comparada con las diferencias reportadas entre varios estudios y varias técnicas que no es posible determinar cuál experimento resulta ser más exacto. En cambio el experimento Multi-selectivo es limitado a sistemas donde las señales del analito no se solapan

-Las limitaciones en sensibilidad propias de los experimentos selectivos hacen de esta estrategia limitada en los casos en que el analito de interés se encuentre en concentraciones muy bajas, por lo tanto debe ser complementada con técnicas clásicas tales como cromatografía gas-liquido o espectroscopia de UV.

8. Referencias

- [1] W. Kozminski, Application of spatially resolved NMR spectroscopy for high resolution spectra of heterogeneous samples, *Polym. J. Chem.* 74 (2000) 1185–1189.
- [2] Markl, M. and Leupold, J. (2012), Gradient echo imaging. *J. Magn. Reson. Imaging*, 35: 1274–1289
- [3] P. Wasik, Y.B Tewari, M.M Miller and D.e Martire octanol/water partition coefficients and aqueous solubilities of organic compounds, NBSIR, (U.S Dept. of commerce, Washington 1981.
- [4] B. L. Tomlinson and H. D. W. Hill, *J. Chem. Phys.* 59, 1775 (1973).
- [5] R. Freeman, H.D. W. Hill, B. L. Tomlinson and L.D. Hall, *J. Chem Phys.* 61, 4466 (1974).
- [6] Frekker, the hydrophobic fragmental constant: its derivation and application. A means of characterizing membrane system (Elsevier, New York 1977)
- [7] Martin, B. T., Chingas, G. C., & McDougal, O. M. (2012). Origin and correction of magnetic field inhomogeneity at the interface in biphasic NMR samples. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, 218, 147–52.
- [8] I. Benjamin, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1997, 48, 407 – 451
- [9] J. Lambert, R. Hergenröder, D. Suter, V. Deckert, Probing liquid–liquid interfaces with spatially resolved NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 6343–6345.
- [10] Damadian R, Minkoff L, Goldsmith M, Stanford M, Koutcher J. Field focusing nuclear magnetic resonance (FONAR): visualization of a tumor in a live animal. *Science* 1976;194:1430–2.
- [11] Hinshaw WS. Image formation by nuclear magnetic resonance: the sensitive point method. *J Appl Phys* 1976;47:3709–21.

- [12] Ordidge RJ, Connelly A, Lohmann AB. Image-selected in vivo spectroscopy (ISIS). A new technique for spatially selective NMR spectroscopy. *J Magn Reson* 1986;66:283–94.
- [13] Bottomley PA. Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Ann NY Acad Sci* 1987;508:333–48.
- [14] Frahm J, Merboldt K-D, Hancinik W. Localized proton spectroscopy using stimulated echoes. *J Magn Reson* 1987;72:502–8
- [15] C Hansh and A. Leo, substituent constants for Correlation Analysis in chemistry and biology (Wiley, New York, 1979)
- [16] R. Collander, *Acta Chem. Scand.* 5 (1951) 774.
- [17] Zhang Yz, Paterson Y, Roder H: Rapid amide proton Exchange rates in peptides and proteins measured by solvent quenching an two dimensional NMR, *Protein Sci* 1995, 4: 804-814