

This image was made with VMD/NAMD/BioCoRE/JMV/other software support. VMD/NAMD/BioCoRE/JMV/ is developed with NIH support by the Theoretical and Computational Biophysics group at the Beckman Institute, University of Illinois at Urbana-Champaign.

Simulaciones de dinámica molecular para una mezcla de ácido benzoico en agua: Relación entre posiciones interatómicas y solubilidad

Molecular dynamics simulation for a mixture of benzoic acid in water: Relation between interatomic positions and solubility

Raimundo Gillet¹, Alumno de 6to año
Angélica Fierro², Profesor Asistente
José Ricardo Pérez-Correa¹, Profesor Titular
Loreto M. Valenzuela¹, Profesor Asistente

¹Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos, Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile

²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile

*Autor de correspondencia: lvalenzr@ing.puc.cl

Raimundo Gillet¹, 6th year student
Angélica Fierro², Assistant Professor
José Ricardo Pérez-Correa¹, Full Professor
Loreto M. Valenzuela¹, Assistant Professor

¹Department of Chemical and Bioprocesses Engineering, Engineering School, Pontificia Universidad Católica de Chile

²Department of the Organic Chemistry, Chemistry Faculty, Pontificia Universidad Católica de Chile

* Corresponding author: lvalenzr@ing.puc.cl

RESUMEN

Los polifenoles son una familia de compuestos ampliamente distribuidos en vegetales. Sus propiedades antioxidantes, antivirales, antimicrobianas y antiinflamatorias han atraído el interés de la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Su extracción óptima desde el material vegetal es un tema activo de investigación en ingeniería de procesos. Los compuestos polifenólicos contienen anillos aromáticos y grupos alcohólicos en su estructura, por lo que la mayoría de ellos presenta un comportamiento hidrofílico. Debido a estas características, el agua caliente presurizada es un solvente viable, seguro y amigable con el medio ambiente para su extracción. La simulación de dinámica molecular puede ser útil para representar y explicar la solubilidad de polifenoles en agua ya que la afinidad entre compuestos se representa por su atracción o repulsión intermolecular. El ácido benzoico es uno de los polifenoles más simples, y por tanto sus simulaciones de dinámica molecular no son complejas. Además, se han realizado estudios experimentales de su solubilidad, que se podrían comparar con los resultados de simulaciones de dinámica molecular. El propósito de este estudio fue explorar la aplicabilidad de simulaciones de dinámica molecular para predecir la solubilidad del ácido benzoico a distintas temperaturas, mediante el análisis de las distancias interatómicas y algunas de sus propiedades de equilibrio. Para ello, se efectuaron simulaciones a temperatura y presión constantes utilizando el software NAMD v2.9 y se analizó la interacción entre el agua y el ácido benzoico a distintas temperaturas. Los efectos de las interacciones intermoleculares se estudiaron a través de un análisis de energías, puentes de hidrógeno y funciones de distribución radial (RDF) una vez alcanzado el equilibrio, y los resultados fueron comparados con datos experimentales de solubilidad. Se observó que la cantidad promedio de puentes de hidrógeno formados aumenta a mayor solubilidad hasta llegar a un valor máximo.

Palabras clave: Ácido benzoico, solubilidad, dinámica molecular, RDF.

ABSTRACT

Polyphenols are a family of chemical compounds widely distributed in plants. Their antioxidant, antiviral, antimicrobial and anti-inflammatory properties have attracted the interest of the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Therefore, their optimal extraction from plant material is an active research topic in process engineering. Polyphenol compounds contain aromatic rings and alcohol groups in their structure, leading to a hydrophilic behavior in most cases. Hence, pressurized hot water is a viable, safe and environmentally friendly solvent for their extraction. It is possible to study the affinity of polyphenols for water as a first approach to understand their aqueous solubility at different temperatures and pressures. Equilibrium affinity between compounds is represented by their intermolecular attraction or repulsion; therefore molecular dynamics simulations could be useful to better explain the solubility of polyphenols in water. One of the simplest polyphenol molecules is benzoic acid, which implies that its molecular dynamics simulations should be simple to perform. Also, there is a large amount of experimental data on the literature to compare its solubility with the simulation results. The purpose of this study was to explore the applicability of molecular dynamics simulations in predicting the solubility of benzoic acid in water at different temperatures by analyzing interatomic distances and some of its equilibrium properties. Molecular dynamics simulations were carried out at isothermal-isobaric conditions using the NAMD v2.9 software, and the interaction between water and benzoic acid was analyzed at different temperatures. The effects of intermolecular interactions were studied by means of an analysis of energies, hydrogen bonding and radial distribution functions (RDF), once the equilibrium was reached, and the results were compared with experimental solubility data. It was observed that the average amount of hydrogen bonds increases with increasing solubility until it reaches a maximum value.

Keywords: Benzoic acid, solubility, molecular dynamics, RDF.

1. INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son una familia de compuestos naturales que durante las últimas décadas han recibido un creciente interés por parte de la industria y la comunidad científica debido a las propiedades antioxidantes que poseen. Se caracterizan por presentar en su estructura al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, y se pueden encontrar en frutas, verduras y hierbas. Los compuestos polifenólicos se relacionan directamente con

1. INTRODUCTION

Polyphenols are a family of natural compounds that has received an increasing interest from industries and the scientific community in the last decades due to its antioxidant properties. They are characterized by the presence of at least one aromatic ring in their structure adhered to one or more hydroxyl, and can be found in fruits, vegetables, and herbs. Polyphenol compounds are directly related to the sensory features in food, such as

características sensoriales en los alimentos como sabor, carácter astringente y color, y se ha demostrado que poseen propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y vasodilatadoras, entre otras [1]. Por dichos atributos, estos compuestos poseen una serie de aplicaciones industriales, tales como la producción de pinturas, papel y cosméticos, la fabricación de aditivos en la industria alimenticia como colorantes y preservantes, y también una serie de aplicaciones en la industria nutracéutica y farmacéutica [2].

El alto valor de los polifenoles hace evidente la necesidad de estudiar su actividad biológica y sus propiedades fisicoquímicas. En particular, la obtención de datos de su solubilidad en medio acuoso permitiría optimizar las técnicas que se utilizan para su extracción y mejorar el conocimiento acerca de sus mecanismos de acción en nuestro organismo. Sin embargo, las pruebas de laboratorio necesarias para obtener estos datos son costosas y requieren mucho tiempo de trabajo. Así, un análisis teórico del fenómeno de **solvatación** puede ser una alternativa para abaratar costos y disminuir los tiempos de trabajo.

La solubilidad de un compuesto es una propiedad íntimamente relacionada a su interacción con el solvente donde se sitúa. Los fenómenos de solvatación y las propiedades de equilibrio de fases están dados principalmente por las interacciones interatómicas e intermoleculares tales como la formación de puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, interacciones coulómbicas y otras. Dichas interacciones han sido ampliamente estudiadas y modeladas, y actualmente existe la posibilidad de simularlas y representarlas fielmente mediante herramientas computacionales como la dinámica molecular, una técnica desarrollada y utilizada ampliamente durante las últimas décadas. Esta consiste en la representación computacional de un sistema de moléculas a través del tiempo donde se modela la interacción entre sus átomos a través de campos de fuerzas denominados *force fields*. Estos son una serie de funciones parametrizadas a partir de mediciones experimentales o basadas en modelos teóricos de interacción entre partículas. Así, mediante el cálculo de ecuaciones dinámicas se puede determinar la trayectoria que sigue cada átomo en el sistema, y con ella se puede calcular su energía, las distancias interatómicas y otras propiedades que se relacionan con la solubilidad.

flavour, astringency and colour, and their antioxidant, anti-inflammatory and vasodilatory properties, among others, have been proved [1]. Because of said attributes, these compounds possess a number of industrial applications, such as paint, paper and cosmetics production; additive fabrication in the food industry, such as colouring agents and food preservatives, and a number of applications in the nutraceutical and pharmaceutical industries.

The high prices of polyphenols are a clear evidence of the need to study their biological activity and physicochemical properties. In particular, obtaining data of polyphenol's solubility in an aqueous medium would optimize the techniques used for their extraction, as well as improve the knowledge about their action mechanisms in our organism. Nevertheless, the laboratory tests needed to obtain these data are highly expensive, and require a lot of work time. Therefore, a theoretical analysis of the **solvation** phenomenon could be an alternative to decrease costs and work time.

Solubility is a property closely related to the compounds interaction with the solvent in which it is situated. Solvation phenomena and the phase equilibrium properties are mainly caused by the interatomic and intermolecular interactions, such as hydrogen bond formation, Van der Waals interactions, Coulomb interactions, and others. These interactions have been thoroughly studied and modeled, and there is the possibility to accurately simulate and represent them nowadays by means of computational tools like molecular dynamics, a technique developed and highly used in the last decades. This technique consists in the computational representation of a molecule system in time, where the interaction between its atoms is modeled through *force fields*. These are a number of functions that are parameterized from experimental measurements or based on particle interaction theoretical models. In this way, through the calculation of dynamic equations the movement of each atom in the system can be determined, allowing the calculation of its energy, interatomic distances and other properties that are related with solubility.

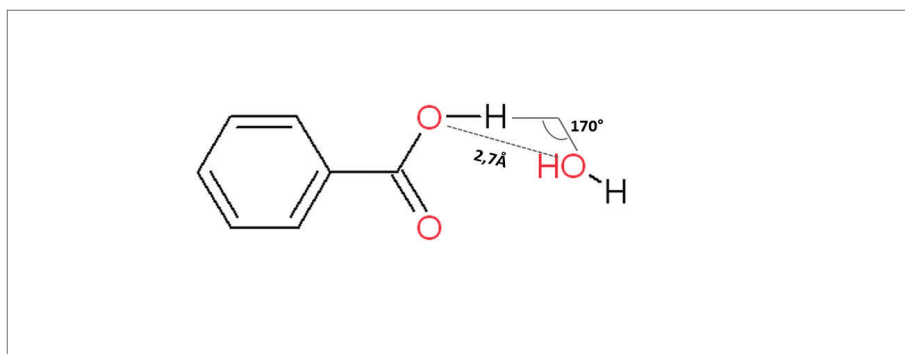


Figura 1. Estructura del Ácido Benzoico y parámetros de ángulo y distancia en un puente de hidrógeno formado entre el grupo hidroxilo del ácido benzoico y una molécula de agua. Elaborado usando ChemSketch v14 [3].

Figure 1. Benzoic Acid structure and angle and distance parameters in a hydrogen bond formed between the benzoic acid's hydroxyl and a molecule of water. Elaborated using ChemSketch v14 [3].

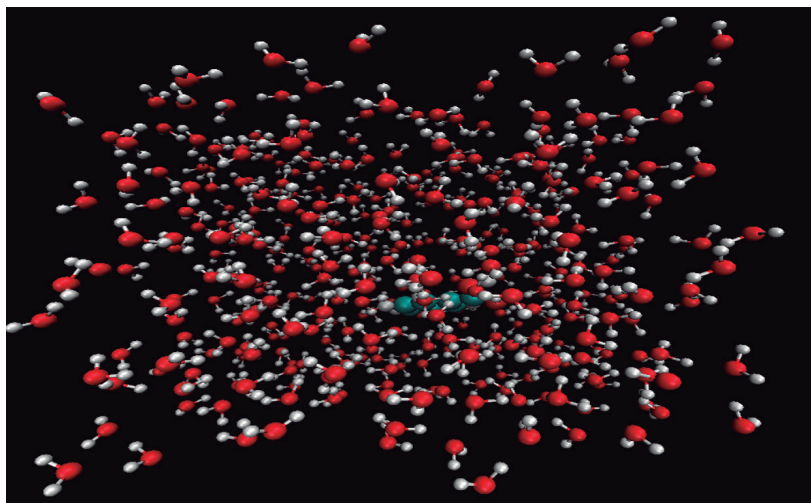


Figura 2. Caja de moléculas generada, visualizada en el programa VMD v1.9.2 [5]. Las esferas rojas, blancas y grises representan átomos de oxígeno, hidrógeno y carbono respectivamente. La molécula de ácido benzoico se ubica al centro de la caja.

Figure 2. Molecules box built, visualized in the VMD v1.9.2 [5] program. The red, white and grey spheres represent oxygen, hydrogen and carbon atoms respectively. The benzoic acid molecule is placed at the center of the box.

Uno de los polifenoles más simples es el ácido benzoico, lo que implica que sus simulaciones de dinámica molecular no debieran ser costosas en cuanto a tiempo de simulación. Además, se han realizado estudios experimentales de su solubilidad, que se podrían comparar con los resultados de las simulaciones. Por esto, dicho polifenol fue seleccionado como soluto en este trabajo. El propósito de este estudio es explorar la aplicabilidad de simulaciones de dinámica molecular para predecir la solubilidad del ácido benzoico a distintas temperaturas, mediante el análisis de las distancias interatómicas y algunas de sus propiedades de equilibrio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrollaron simulaciones computacionales de dinámica molecular con el propósito de estudiar las propiedades de equilibrio del ácido benzoico en presencia de agua a distintas temperaturas. Se ha mostrado que el ácido benzoico se presenta como monómero en disolución acuosa [4], por lo que el sistema simulado consistió en una caja de 1.100 moléculas de agua y una molécula de ácido benzoico, con un volumen inicial calculado de acuerdo a la densidad del agua a las condiciones de presión y temperatura de cada simulación.

Para determinar el modelo molecular de ácido benzoico, se efectuó una optimización geométrica y cálculo de cargas atómicas mediante minimización cuántica HF 6-31G* con el *software* Spartan08 [6]. Dicho modelo se utilizó para determinar los parámetros estructurales, de carga y de topología para el ácido benzoico, los cuales fueron generados mediante el servidor SwissParam –que provee archivos de topología y parámetros de estructura y carga para moléculas orgánicas pequeñas, compatibles con el *force field* CHARMM *all atoms*–, y fueron utilizados posteriormente como archivos de input en la simulación. Por otro lado, para el agua se utilizaron los parámetros de

One of the simplest polyphenols is benzoic acid, which means that its chemical simulations of molecular dynamics should not be expensive regarding simulation time. In addition, there have been experimental studies of its solubility, which could be compared with the simulation results. This is why this polyphenol was selected as the solute for this work. The purpose of this study was to explore the applicability of molecular dynamics simulations in predicting the solubility of benzoic acid in water at different temperatures by analyzing interatomic distances, as well as some of its equilibrium properties.

2. MATERIALS AND METHODS

Computational simulations of molecular dynamics were developed with the purpose of studying the equilibrium properties of benzoic acid in water at different temperatures. It has been shown that benzoic acid is present as monomer in aqueous solution [4], hence the simulated system consisted in a 1,000 water molecules and one benzoic acid box, with a first volume calculated according to the water density, pressure conditions, and temperature of each simulation.

To determine the molecular model of benzoic acid, a geometrical optimization and an atomic charge calculation through quantum minimization HF 6-31G* with the Spartan08 [6] software were carried out. This model was used to determine the structural, charge and topology parameters for the benzoic acid, which were generated through the SwissParam server. The latter provides files of topology, and structural and charge parameters to small organic molecules, compatible with the force field CHARMM *all atoms*, and were used as input files later in the simulation. In addition, structural, charge and topology parameters for water were used according to

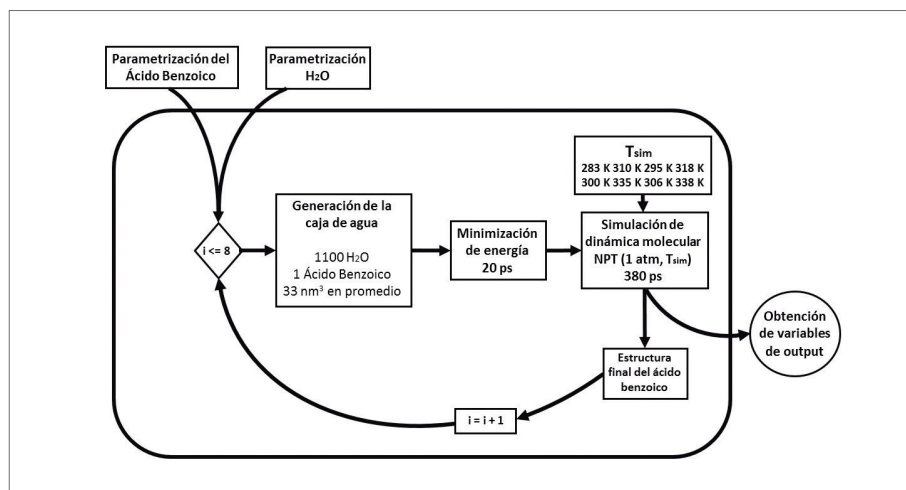


Figura 3. Diagrama del proceso de simulación.

Figure 3. Diagram of the simulation process.

estructura, carga y topología de acuerdo al modelo TIP3P [7] utilizando el *force field* CHARMM22 *all atoms*. La caja de agua fue generada utilizando el *software* VMD v1.9.2 [5].

La caja de átomos descrita, una vez modelada fue sometida a un protocolo de simulación de dinámica molecular utilizando un tiempo de 2 fs por paso (*timestep*); esto quiere decir que las ecuaciones de movimiento se calculaban cada 2 fs. El software utilizado para este procedimiento fue NAMD v2.9 [8]. El protocolo consistió en 8 fases de simulación. Cada fase contemplaba una minimización inicial de la energía del sistema por 10.000 pasos (20.000 fs) –para garantizar que los átomos tomaran posiciones energéticamente factibles–, y una posterior simulación de dinámica molecular manteniendo la presión y temperatura constantes (ensamble NPT) por 190.000 pasos (380.000 fs), tiempo suficiente para garantizar la estabilidad energética y estructural del sistema de acuerdo a pruebas preliminares.

En cada fase se utilizaron 8 temperaturas correspondientes a 283 K, 310 K, 295 K, 318 K, 300 K, 335 K, 306 K y 338 K. Estos valores de temperatura se corresponden con los que utilizaron Apelblat et al. [9] en mediciones experimentales de la solubilidad del mismo sistema. Para mantener la temperatura se implementó el método de control de Langevin [10] utilizando un coeficiente de amortiguación (*damping*) de 10.000 fs. Por otro lado, en todas las simulaciones se utilizó una presión de 1 atm, que fue controlada utilizando el método pistón de Langevin [11] con un período de oscilación de 100 fs y un decaimiento de 5 fs acoplado a la temperatura de cada fase.

Se utilizó la aproximación de condiciones de borde periódicas (PBC), la cual consiste en replicar la caja simulada una serie de veces en imágenes especulares a su alrededor, aumentando el volumen total. La celda para la aproximación PBC se generó con un tamaño equivalente al de la caja de agua, con un margen adicional de 2 Å a cada lado, permitiendo así fluctuaciones de volumen. Sin embargo, al aumentar el número de partículas simuladas, aumenta a su vez el número de cálculos que el programa

the TIP3P [7] model using the force field CHARMM22 *all atoms*. The water box was generated using the VMD v1.9.2 software [5].

The aforementioned box of atoms, once it was modeled, was subjected to a protocol of molecular dynamics simulation using a time of 2 fs per step (*timestep*), which means that the movement equations were calculated every 2 fs. The software used in this procedure was the NAMD v2.9 [8]. The protocol consisted in 8 simulation phases. Each phase considered an initial minimization of the system's energy by 10,000 steps (20,000 fs), to ensure that the atoms would take the energetically feasible positions, and a later molecular dynamics simulation maintaining constant pressure and temperature (NPT ensemble) by 190,000 steps (380,000 fs), enough time to ensure the energetic and structural stability of the system according to preliminary tests.

Eight temperatures, corresponding to 283 K, 310 K, 295 K, 318 K, 300 K, 335 K, 306 K and 338 K, were used in each phase. These temperature values correspond to the ones used by Apelblat et al. [9] in experimental measurements of solubility in the same system. In order to maintain the temperature the Langevin [10] method was used using an attenuation coefficient (*damping*) of 10,000 fs. On the other hand, a 1 atm pressure was used in all simulations, which was controlled using the Langevin piston method [11] with a 100 fs oscillation period and a decline of 5 fs united to the temperature of each phase.

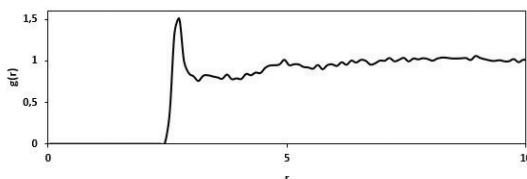
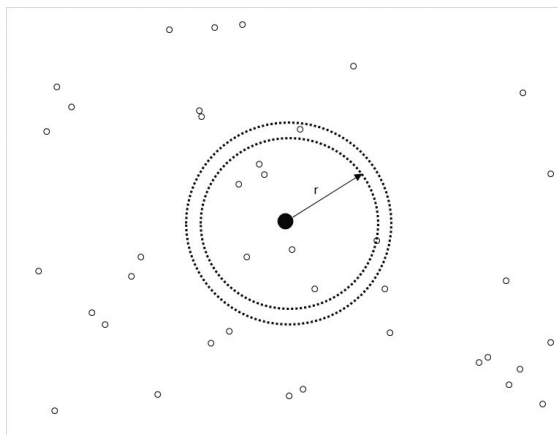
The Periodical Boundary Conditions (PBC) approach was used, which consists in copying the simulated box a number of times in mirror images in its surrounding, increasing the total volume. The cell for PBC approximation was generated with an equivalent size to the water box, with an additional margin of 2 Å each side, allowing volume fluctuations. However, when the number of simulated particles increases, the number of calculations that the program must make increases as well, hence, the simulation time also increases. To reduce this time, a **cutoff radius** of 9 Å was used as approximation.

debe realizar, y por lo tanto aumenta el tiempo de simulación. Para disminuir este tiempo se utilizó como aproximación un **radio de cutoff** de 9 Å.

Al final de cada fase, la estructura resultante del ácido benzoico producto de las interacciones intermoleculares y las temperaturas de simulación se incluía en una nueva caja de 1.100 moléculas de agua para entrar en la siguiente fase. Luego de las simulaciones, se analizaron los archivos de *output* obtenidos.

Para completar el análisis del fenómeno de solvatación usualmente se utiliza la Función de Distribución Radial (RDF). Esta función se elabora identificando un átomo central y un átomo objetivo. Luego, se calcula la densidad de átomos objetivo en torno a un cascarón de espesor fijo, cuyo centro es el átomo central (ver Figura 4). La densidad de átomos se representa como $g(r)$ y se calcula considerando el número de átomos encontrados dentro del cascarón a cada distancia ($n(r)$), el número de partículas por unidad de volumen en el sistema (ρ), el radio del cascarón y su espesor (r y Δr respectivamente). En la Ecuación 1 se presenta el cálculo de $g(r)$.

$$g(r) = \frac{n(r)}{r^4 \rho r^2 \Delta r} \quad (1)$$



At the end of each phase, the resultant structure of benzoic acid affected by the intermolecular interactions and the temperatures was included in a new 1,100 water molecules box to go into the next phase. After the simulations, the output files obtained were analyzed.

To complete the solvation phenomenon analysis, the Radial Distribution Function (RDF) is usually used. This function is elaborated by identifying a central atom and an objective atom. Then, the objective atom density is calculated on a fixed density shell whose center is the central atom (see Figure 4). The atoms density is represented as $g(r)$ and it is calculated considering the number of atoms found inside the shell at each distance ($n(r)$), the number of particles per volume unity in the system (ρ), the shell radius and its thickness (r y Δr respectively). In Equation 1, the calculation of $g(r)$ is presented.

$$g(r) = \frac{n(r)}{r^4 \rho r^2 \Delta r} \quad (1)$$

Figura 4. Esquema del procedimiento usado para elaborar una RDF. En la figura superior se representa en 2 dimensiones el átomo central (centro ennegrecido), el cascarón de radio variable r inferior se representa una curva con la forma que usualmente resulta de calcular $g(r)$ para distintos valores de r . Para disoluciones acuosas la distancia del primer pico observado equivale a la distancia a la que se forma un puente de hidrógeno.

Figure 4. Diagram of the procedure used to elaborate a RDF. In the upper figure, the central atom (darkened atom), the variable radius shell r and the objective atoms (white center) that are counted are represented in 2 dimensions. In the present case $n(r) = 2$ is counted (see Equation 1). In the lower figure, a curve with the shape that usually results from calculating $g(r)$ for different r values is represented. For aqueous dissolutions the distance of the first observed peak is equal to the distance in which a hydrogen bond is formed.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de las simulaciones se obtuvieron archivos que contenían la trayectoria completa del sistema en cada fase –esto es, las posiciones de cada átomo en cada paso de simulación (cada 2 fs)–. Como el protocolo consistió en 8 fases, se obtuvieron 8 archivos de trayectoria, los cuales fueron sometidos a un análisis posterior.

A partir de la trayectoria del sistema se pueden calcular una serie de variables de gran relevancia para explicar el fenómeno de solvatación y que, por tanto, deberían tener alguna relación con la solubilidad de la molécula en cuestión en medio acuoso. En este caso particular, se calculó la energía potencial del sistema que depende exclusivamente de las posiciones de las partículas del sistema, presentes en los archivos de trayectoria de *output*, y de sus masas, presentes en los archivos de parámetros. Esta energía a su vez se subdividió en energía potencial debida a interacciones de Van der Waals y energía potencial debida a interacciones coulombicas. La cantidad promedio de puentes de hidrógeno formados entre la molécula de ácido benzoico y el agua fue, determinada según la distancia y el ángulo que existe entre los sitios activos del ácido benzoico y las moléculas de agua más cercanas. Esta cantidad se relaciona con la función de distribución radial (RDF) en torno a los sitios activos del soluto y depende de la energía cinética del sistema y de su temperatura.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of the simulations were files that contained the complete trajectory of the system in each phase, this is to say, the positions of each atom in each simulation step (every 2fs). As the protocol consisted of 8 phases, 8 trajectory files were obtained, which were subjected to a later analysis.

From the system's trajectory a number of variables of great relevance can be calculated in order to explain the solvation phenomenon. These variables should have some relation with molecule solubility in an aqueous medium. In this particular case, the calculation was focused on the potential energy of the system, which depends exclusively on the position of the system's particles, present in the *output* trajectory files, and on their mass, present in the parameter files. This energy was subdivided as well into potential energy due to Van der Waals interactions, and potential energy due to Coulomb interactions. The average quantity of hydrogen bonds formed among the benzoic acid molecule and water was determined by the distance and the angle that exist between the active sites of benzoic acid and the nearer water molecules. This quantity is related to the radial distribution function (RDF) on the active sites of the solute, and it depends on the system's kinetic energy and its temperature.

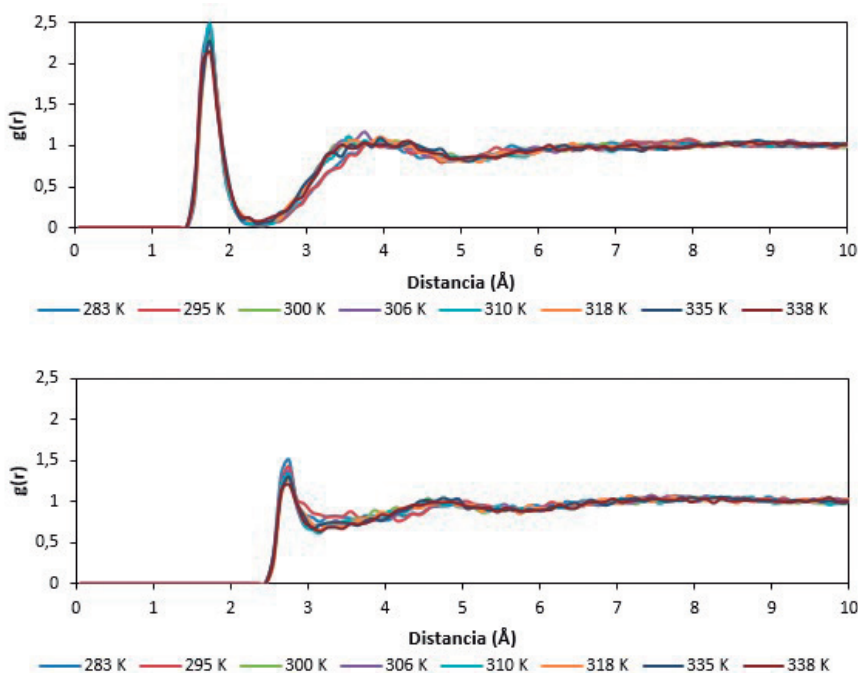


Figura 5. Función de distribución radial (RDF) obtenida a distintas temperaturas. El cálculo de la función de distribución radial se efectuó centrado en el grupo hidroxilo del ácido benzoico (gráfico superior) en primer lugar, y en segundo lugar se centró en su grupo carbonilo (gráfico inferior). La distribución radial se efectuó con respecto al átomo de oxígeno de cada molécula de agua, el cual la representa bien debido a que sus átomos de hidrógeno tienen una mayor movilidad.

Figure 5. Radial distribution function (RDF) obtained at different temperatures. The radial distribution function calculation was made centered on the hydroxyl of the benzoic acid (upper graph) in the first place, and centered on its carbonyl (lower graph) in the second place. The radial distribution was made on the oxygen atom of each molecule of water, which is correctly represented because its hydrogen atoms have a greater mobility.

Para analizar los archivos de *output* del protocolo y buscar su relación con la solubilidad medida experimentalmente, se requirió un tiempo de simulación lo suficientemente largo como para que el sistema alcanzara el equilibrio. Por esto, se utilizaron para el análisis los últimos 3.000 pasos (6.000 fs) de simulación en cada fase, cuya estabilidad energética y estructural fue garantizada por el análisis de energías y **RMSD**, cuyos valores llegaban a un equilibrio alrededor de los primeros 20.000 pasos.

Dentro de las variables de *output* estudiadas a distintas temperaturas, la que tuvo una tendencia más regular fue la cantidad promedio de puentes de hidrógeno formados, que aumentó al crecer la solubilidad. Las energías potenciales coulombica, de Van der Waals y total no mostraron una tendencia regular a distintas temperaturas. Por otro lado, las curvas de RDF obtenidas tienen un comportamiento acorde a la teoría: la altura del pico formado en el caso del grupo hidroxilo es mayor a la altura del pico para el grupo carbonilo, lo que se explica porque el primero es más activo en la formación de puentes de hidrógeno y una mayor altura de pico implica una mayor interacción con moléculas de agua. La perfecta superposición de las curvas de RDF a distintas temperaturas también es esperable debido a que la distancia de mayor interacción –equivalente a la distancia a la que se forma un puente de hidrógeno– no debe variar a distintas temperaturas. Sin embargo, en la curva para el grupo hidroxilo se observó una distancia de primer pico cercana a 2 Å, la cual es menor a la distancia teórica correspondiente a 2,7 Å [12].

Para ahondar el análisis de las variables estudiadas, su comportamiento a distintas temperaturas se comparó directamente con los valores de solubilidad medidos experimentalmente por Apelblat et al. [9].

Los análisis gráficos presentados en las Figuras 6 y 7 muestran una relación entre el número de puentes de

To analyze the output files of the protocol and search its relation with the experimentally measured solubility, one requirement was a simulation time long enough as to let the system reach equilibrium. Therefore, the last 3,000 simulation steps (6,000 fs) of each phase were used, whose energetic and structural stability were ensured by the energy analysis and **RMSD**, whose values reached equilibrium close to the first 20,000 steps.

Among the output variables studied at different temperatures, the one that had a more regular tendency was the average quantity of hydrogen bonds formed, which increased when the solubility was higher. The Coulomb potential, Van der Waals and total energies did not show a regular tendency at different temperatures. In addition, the RDF curves obtained behave accordingly to the theory: the height of the peak formed in the hydroxyl case is higher than the carbonyl peak because the first one is more active in the formation of hydrogen bonds, and a higher peak implies a higher interaction with water molecules. The perfect superposition of the RDF curves at different temperatures is also expected, because the greatest interaction distance –equivalent to the distance formed in an hydrogen bond– should not vary at different temperatures. Nevertheless, in the hydroxyl curve a distance close to 2 Å was observed in the first peak, which is less than the theoretical distance that corresponds to 2.7 Å [12].

To go deeper into the analysis of the studied variables, their behavior at different temperatures was directly compared with the solubility values experimentally measured by Apelblat et al. [9].

The graphic analysis presented in Figures 6 and 7 show a relation between the number of hydrogen bonds formed in the simulation and the experimentally measured solubility. This reveals a possible explanation to the solvation phenomenon of benzoic acid in aqueous medium at

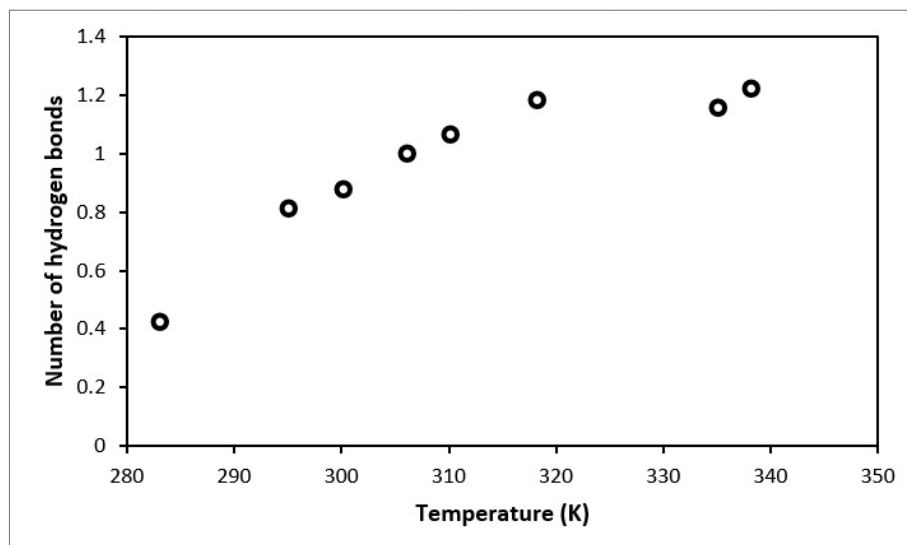


Figura 6.- Número promedio de puentes de hidrógeno formados entre soluto y solvente, contabilizados a lo largo de la simulación a cada temperatura.

Figure 6. Average number of hydrogen bonds between the solute and solvent, counted through the simulation at each temperature.

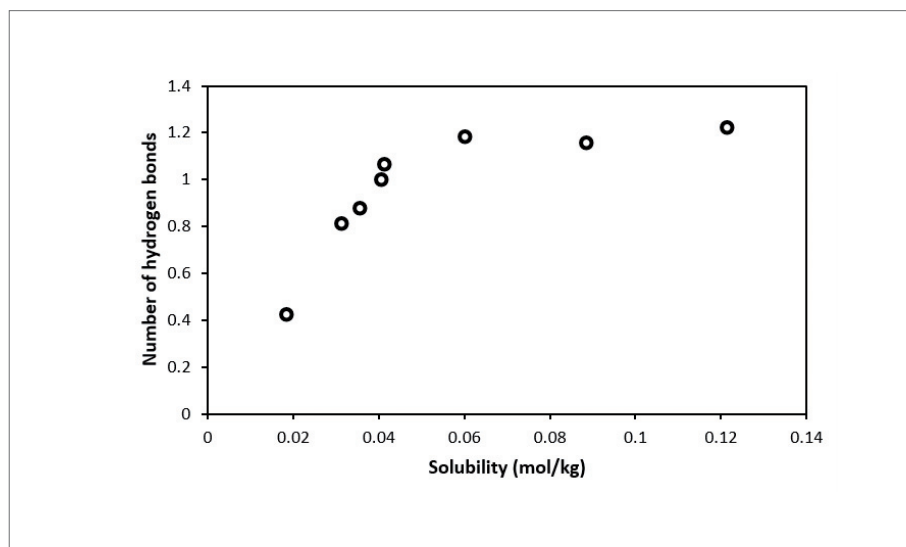


Figura 7. Número promedio de puentes de hidrógeno formados entre soluto y solvente, graficado en función de la solubilidad medida experimentalmente a cada temperatura.

Figure 7. Average number of hydrogen bonds formed between solute and solvent, represented in terms of the experimentally measured solubility at each temperature.

hidrógeno formados en la simulación y la solubilidad medida experimentalmente. Esto indica una posible explicación del fenómeno de solvatación del ácido benzoico en medio acuoso a distintas temperaturas: inicialmente el fenómeno es guiado por la formación de una baja cantidad de puentes de hidrógeno, la cual es, en promedio, menor a uno durante todo el tiempo de simulación; a medida que la temperatura asciende hasta los 320 K, la solubilidad del compuesto en medio acuoso aumenta asociada a un crecimiento en la cantidad de puentes de hidrógeno; y, a partir de dicha temperatura, la cantidad de puentes de hidrógeno formados se mantiene constante mientras aumenta la solubilidad. Este comportamiento sugiere que: (1) bajo los 320 K la solvatación del ácido benzoico es fuertemente dependiente de la cantidad de puentes de hidrógeno formados, que aumenta con el crecimiento de la temperatura; (2) sobre los 320 K se alcanza una cantidad máxima de puentes de hidrógeno, por lo que la solvatación empieza a ser guiada por otras interacciones (como fuerzas de Van der Waals o coulombicas). Adicionalmente, al graficar las energías potenciales total, coulombica y de Van der Waals a distintas temperaturas y compararlas con la solubilidad medida experimentalmente, se observó un cambio en la tendencia de los datos a los 320 K.

4. CONCLUSIONES

En los archivos de *output* de simulación se analizaron distintas propiedades fisicoquímicas del sistema que teóricamente se relacionan con el fenómeno de solvatación. Al comparar estas propiedades con datos de solubilidad medidos experimentalmente, se observó que su comportamiento a distintas temperaturas permite entregar una posible explicación del fenómeno de solvatación del ácido benzoico. Además, se encontró una relación entre la cantidad de puentes de hidrógeno formados entre soluto y solvente en las simulaciones, y la solubilidad medida experimentalmente a distintas temperaturas. Para

different temperatures: initially, the phenomenon is guided by the formation of a small quantity of hydrogen bonds, which is, on the average, less than one during the whole simulation time; as temperature rises until 320 K, the compound's solubility in aqueous medium increases due to an increase in the quantity of hydrogen bonds; and, from that temperature, the quantity of formed hydrogen bonds remains constant as the solubility increases. This behavior suggests that: (1) under 320 K the solvation of benzoic acid is strongly dependent on the number of formed hydrogen bonds, which increases as the temperature rises; (2) over 320 K a maximum number of hydrogen bonds is reached, so solvation begins to be guided by other interactions (such as Van der Waals and Coulomb forces). Additionally, when the total, Van der Waals and Coulomb potential energies at different temperatures were represented in a graph and then compared to the experimentally measured solubility, a change in the trend of data at 320 K was observed.

4. CONCLUSIONS

In the simulation output files different physiochemical properties of the system were analyzed, which are theoretically related to the solvation phenomenon. When these properties were compared with experimentally measured solubility data, it was observed that their behavior at different temperatures provides a possible explanation to the solvation phenomenon in benzoic acid. In addition, a relation between the quantities of hydrogen bonds formed between solute and solvent in the simulations, and the experimentally measured solubility at different temperatures was found. In order to validate this

validar esta hipótesis, así como la metodología propuesta y los resultados obtenidos con ella, se considerará en el desarrollo futuro de este proyecto el análisis de otros tipos de polifenoles similares al ácido benzoico y se corroborará si el comportamiento es parecido.

Los programas utilizados para la generación de archivos de *input*, el desarrollo de las simulaciones y el análisis de archivos de *output* mostraron ser precisos, debido a que el sistema simulado mostró propiedades esperables en su gran mayoría: las curvas de RDF tuvieron la forma esperada, con la excepción del primer peak observado en el caso del grupo hidroxilo; no hubo grandes fluctuaciones en la estructura del ácido benzoico, lo que se corroboró con el análisis de RMSD; la cantidad de puentes de hidrógeno formados en las simulaciones mostró una relación con la solubilidad medida experimentalmente a distintas temperaturas. Por lo tanto, dichos programas se mantendrán como parte de la metodología en el futuro de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Proyecto Anillo ACT 1105/2012 de CONICYT por el financiamiento de esta investigación y al National Institutes of Health por el uso del software NAMD v2.9.

hypothesis and the proposed methodology, other kind of polyphenols similar to benzoic acid will be analyzed.

The programs used to generate input files, the simulation development and the output file analysis were accurate because the simulated system showed mainly expected properties: the RDF curves had the expected shape, except the first peak observed in the hydroxyl; there were no significant fluctuations in the benzoic acid structure, which was corroborated with the RMSD analysis; the number of hydrogen bonds formed in the simulations exhibited a relation to the experimentally measured solubility at different temperatures. Therefore, those programs will be kept as part of the methodology in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to Project Anillo ACT 1105/2012 of CONICYT for financial support and to the National Institutes of Health for the use of the NAMD v2.9 software.

GLOSARIO

Anillo Aromático: Estructura química también denominada benceno. Consiste en un anillo formado por seis átomos de carbono con enlaces dobles conjugados, en forma de hexágono (ver Figura 1). Los electrones en sus enlaces dobles se encuentran deslocalizados, generando una estructura resonante que le confiere una alta estabilidad.

Hidrofílico: Molécula que, debido a su estructura química, tiene la tendencia a interactuar o disolverse en agua.

Solvatación: Proceso de asociación de las moléculas de un disolvente con las moléculas o iones de un soluto.

Radio de *cutoff*: Distancia radial máxima a la cual se restringe el cálculo de las interacciones de cada átomo con sus moléculas vecinas. Se utiliza como simplificación en dinámica molecular para reducir el tiempo de cálculo computacional.

RMSD: Medida de la distancia promedio entre los átomos de una molécula.

GLOSSARY

Aromatic Ring: Chemical structure also known as benzene. It consists of a ring formed by six carbon atoms with double conjugated bonds, in a hexagonal shape (see Figure 1). The electrons in its bonds are delocalized, generating a resonant structure which provides great stability to the ring.

Hydrophilic: Molecule that, due to its chemical structure, has a tendency to interact or dissolve in water.

Solvation: Association process of the solvent molecules with the molecules or ions of a solute.

Cutoff radius: Maximum radial distance to which the calculation of the interaction of each atom with its nearby molecules is restricted. It is used as a simplification in molecular dynamics in order to reduce the computational calculation time.

RMSD: Measure of the average distance among the atoms of a molecule during a whole simulation.

PRINCIPIO CIENTÍFICO

La dinámica molecular consiste en la representación de un sistema de moléculas a través del tiempo, modelando la energía potencial resultante de la interacción entre sus átomos a través de campos de fuerzas denominados *force fields*. Los *force fields* son una serie de funciones parametrizadas a partir de mediciones experimentales y basadas en modelos teóricos de interacción entre partículas. En una simulación de dinámica molecular cada átomo tiene asociada una posición, velocidad, carga, número atómico y una lista de los enlaces en los que participa. Utilizando dicha información, el *force field* modela las fuerzas ejercidas sobre cada partícula, determinando de esa manera su aceleración para calcular nuevas posiciones y velocidades. La manera en que se modela comúnmente esta perturbación es a través de las leyes de mecánica clásica de Newton; de esta manera, un movimiento de una partícula *i* estará dado por la Ecuación 2, y al integrarla se obtiene la posición de la partícula en el tiempo.

$$\frac{F_i}{m_i} = \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (2)$$

El avance del tiempo de simulación se modela discretizándolo en intervalos cortos, denominados *timesteps*. En cada *timestep* las ecuaciones que dirigen el movimiento de cada una de las partículas se calculan de manera iterativa.

Para analizar la solubilidad del sistema en estudio es fundamental tener conocimiento del fenómeno de solvatación para el ácido benzoico. Un importante componente en este fenómeno es el puente de hidrógeno, formado a una distancia y ángulo característicos (ver Figura 1). El enlace se forma principalmente entre grupos específicos de alta electronegatividad en el soluto –que se denominan sitios activos– y las moléculas de agua circundantes. Los sitios activos del ácido benzoico son su grupo hidroxilo y carbonilo. En ambos casos la distancia calculada de un puente de hidrógeno es aproximadamente de 2,7 Å [12]. Esta se mide entre los átomos de oxígeno de cada sitio activo y de la molécula de agua que forma el enlace. El ángulo medido entre el oxígeno e hidrógeno del sitio activo y el oxígeno de la molécula de agua es aproximadamente 170° [12] en ambos casos. Así, para calcular la cantidad de puentes de hidrógeno formados en una simulación, se contabilizan las moléculas de agua que se ubican a una distancia y ángulo de dichas características con respecto a los grupos activos del ácido benzoico.

SCIENTIFIC PRINCIPLE

Molecular dynamics simulations consist in the representation of a molecular system in time, modeling the potential energy produced by the interaction among its atoms through force fields. *Force fields* are a number of functions that are parameterized from experimental measurements or based on particles interaction theoretical models. In a molecular dynamics simulation each atom is associated to a position, charge, atomic number and a list of the bonds in which it participates. Using that information, the force field models the force applied on each particle, thus determining its acceleration to calculate new positions and velocities. The way in which this motion is commonly modeled is through Newton's classical mechanics law; in this way, the movement of a particle *i* will be given by the Equation 2, which provides the position of the particle through time when it is integrated.

$$\frac{F_i}{m_i} = \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (2)$$

The simulation time progress is modeled by discretizing it in short intervals denominated timesteps. In each timestep, the equations that direct the movement of each one of the particles are calculated in an iterative manner.

In order to analyze the solubility of the studied system, knowledge about the solvation phenomenon for benzoic acid is fundamental. An important component of this phenomenon is the hydrogen bond, which formed a distinctive distance and angle (see Figure 1). The bond is mainly formed among specific groups of high electronegativity in the solute -which are denominated active sites- and the surrounding water molecules. The active sites of benzoic acid are its hydroxyl and carbonyl groups. In both cases, the calculated distance of a hydrogen bonds is 2.7 Å [12] approximately. This is measured between the oxygen atoms of each active site and the water molecule that forms the bond. The angle measured between the oxygen and hydrogen of the active site and the oxygen of the water molecule is approximately 170° [12] in both cases. Thus, to calculate the number of hydrogen bonds formed in one simulation, the water molecules that are located at a distance and angle of aforementioned characteristics regarding the active groups of benzoic acid are counted.

REFERENCES

- [1] LANDETE, J. M. "Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2012, vol. 52, no. 10, p. 936-948.
- [2] BRAVO, L. "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance". *Nutrition Reviews*, 1998, vol. 56, no. 11, p. 317-333.
- [3] SPESSARD, G. O. "ACD Labs/LogP dB 3.5 and ChemSketch 3.5". *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 1998, vol. 38, no. 6, p. 1250-1253.
- [4] SAGARIK, K. et al. "A theoretical study on clusters of benzoic acid–water in benzene solutions". *Chemical Physics*, 2004, vol. 306, no. 1, p. 1-12.
- [5] HUMPHREY, W. et al. "VMD: visual molecular dynamics". *Journal of Molecular Graphics*, 1996, vol. 14, no. 1, p. 33-38.
- [6] SHAO, Y. et al. "Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package". *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2006, vol. 8, p. 3172-3191.
- [7] JORGENSEN, W. L. et al. "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water". *The Journal of Chemical Physics*, 1983, vol. 79, no 2, p. 926-935.
- [8] PHILLIPS, J. C. et al. "Scalable molecular dynamics with NAMD". *Journal of Computational Chemistry*, 2005, vol. 26, no. 16, p. 1781-1802.
- [9] APELBLAT, A. et al. "The solubilities of benzene polycarboxylic acids in water". *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2006, vol. 38, no. 5, p. 565-571.
- [10] SHUICHI, N. "Constant temperature molecular dynamics methods". *Progress of Theoretical Physics Supplement*, 1991, vol. 103, p. 1-46.
- [11] FELLER, S. E. et al. "Constant pressure molecular dynamics simulation: the Langevin piston method". *The Journal of Chemical Physics*, 1995, vol. 103, no. 11, p. 4613-4621.
- [12] NAGY, P. I. et al. "Theoretical studies of the 2-and 4-hydroxybenzoic acid with competing hydrogen bonds in the gas phase and aqueous solution". *The Journal of Physical Chemistry*, 1993, vol. 97, no. 18, p. 4628-4642.

EQUIPO DE INVESTIGADORES / RESEARCH TEAM

Raimundo
GilletAngélica
FierroJosé Ricardo
PérezLoreto
Valenzuela