



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Monterrey**

**Refinamiento del modelo de membrana basado en  
fases de solvatación con la incorporación de  
diacetilfosfatidilcolina hidratada**

Proyecto de tesis que presenta

**Mary Luz Gómez López**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

En

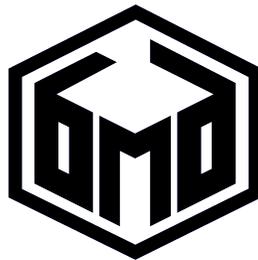
Ingeniería y Física Biomédica

Director de Tesis:

Dr. Mauricio Carrillo Tripp

Apodaca, Nuevo León

Agosto 2023



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de la Diversidad Biomolecular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Monterrey, Nuevo León, México, bajo la dirección del Dr. Mauricio Carrillo Tripp y evaluado por el comité tutorial conformado por el Dr. Daniel Paulo Sánchez Herrera, la Dra. Blanca Estela Galindo Barraza, ambos adscritos a este Centro, y el Dr. José Marcos Falcón González, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato del Instituto Politécnico Nacional.

## **Agradecimientos**

Esta investigación fue financiada en parte por el Fondo de Ciencia Básica (proyecto número 132376) y el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (proyecto número A1-S-17041), ambos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México, así como por fondos fiscales del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Monterrey, todos ellos aprobados y asignados a M.C.T. Agradecemos al Centro por dar acceso a su infraestructura a todos los miembros del grupo de investigación del Laboratorio de la Diversidad Biomolecular.

También agradecemos al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías México por haber otorgado una beca de posgrado a M.L.G.L durante los dos años del programa de Maestría en Ingeniería y Física Biomédica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Monterrey.

Todos los cálculos y simulaciones numéricas se realizaron en la infraestructura de cómputo de alto rendimiento del Laboratorio de la Diversidad Biomolecular.

# Índice

<b>Índice de figuras</b>	<b>7</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>8</b>
<b>Resumen</b>	<b>9</b>
<b>Abstract</b>	<b>10</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>11</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>14</b>
2.1. Membrana celular . . . . .	15
2.2. Modelos de Membrana . . . . .	16
2.2.1. Modelo bifásico . . . . .	16
2.2.2. Modelación computacional de solvente implícito o explícito	18
2.2.3. Modelo de membrana de solvatación multifase . . . . .	18
2.2.4. Diacetilfosfatidilcolina hidratada . . . . .	21
2.3. Variables termodinámicas . . . . .	23
2.3.1. Cambio de energía libre de transferencia . . . . .	23
2.3.2. Cambio de energía libre de solvatación . . . . .	24

2.4.	Simulación de dinámica molecular . . . . .	26
2.4.1.	Simulación de dinámica molecular en GROMACS . . . . .	28
	<b>Hipótesis</b>	<b>32</b>
	<b>Objetivos</b>	<b>32</b>
<b>3.</b>	<b>Metodología</b>	<b>33</b>
3.1.	Caracterización del sistema DAcPC:Agua . . . . .	33
3.2.	Elección de solutos para el proceso de solvatación . . . . .	40
3.3.	Optimización del protocolo de integración termodinámica . . . . .	42
3.3.1.	Simulación de dinámica molecular del sistema Agua_Agua	42
3.3.2.	Distribución de valores de Lambda y tamaño de muestreo para el sistema Agua_Agua . . . . .	45
3.4.	Construcción del modelo de membrana de solvatación multifase original y modificado . . . . .	49
3.4.1.	Construcción, minimización y relajación de los sistemas con solventes representativos de los estratos fosfolipídicos	51
3.4.2.	Solvatación de los solutos en los tres solventes . . . . .	53
3.4.3.	Minimización de energía y relajación de los sistemas sol- vente_soluto (Ci-Sj) . . . . .	53

3.4.4.	Cálculos para determinar $\Delta G_{solv}$ y $\Delta G_{transf}$ . . . . .	54
3.4.5.	Validación del protocolo optimizado para la IT a partir del modelo octanol_agua . . . . .	55
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	<b>57</b>
4.1.	Efecto de la proporción de agua en DAcPC . . . . .	57
4.2.	Selección de solutos para el proceso de solvatación . . . . .	58
4.3.	Protocolo para la integración termodinámica . . . . .	59
4.3.1.	Efecto de la distribución de valores del parámetro $\lambda$ en el cálculo de $\Delta G_{solv}$ . . . . .	59
4.3.2.	Efecto del tamaño de muestreo en el cálculo de $\Delta G_{solv}$ . . . . .	60
4.4.	Cálculo de $\Delta G_{solv}$ , $\Delta G_{transf}$ y coeficiente de partición . . . . .	62
<b>5.</b>	<b>Discusión</b>	<b>69</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusión</b>	<b>73</b>
	<b>Referencias</b>	<b>75</b>
	<b>Anexo 1: Parámetros de dinámica molecular</b>	<b>84</b>
	<b>Anexo 2: Scripts para la configuración, minimización y relajación de sistemas solvente y solvente-soluto</b>	<b>97</b>

## Índice de figuras

1.	Modelo de membrana de solvatación multifase (MMPSM) . . . . .	19
2.	Representación gráfica de la solvatación . . . . .	20
3.	Celdas computacionales del MMPSM . . . . .	21
4.	Esquema del camino termodinámico para el cálculo de $\Delta G_{solv}$ . . .	24
5.	Celdas computacionales para el cálculo de variables termodinámicas	49
6.	Esquema del proceso de simulación de dinámica molecular de sis- temas . . . . .	54
7.	Modelo de solvatación de dos fases . . . . .	56
8.	Celdas computacionales de DAcPC:Agua . . . . .	57
9.	Esquema de procesos para el cálculo de $\Delta G_{solv}$ . . . . .	64

## Índice de tablas

2.	Coefficientes de partición octanol-agua . . . . .	41
3.	Valores asignados al parámetro $\lambda$ . . . . .	46
4.	Tamaños de muestreo del parámetro $\lambda$ . . . . .	46
5.	Sistemas computacionales para las simulaciones de dinámica molecular . . . . .	50
6.	Estructura molecular de solutos seleccionados para el modelo MM-PSM . . . . .	58
7.	Caracterización del parámetro de acoplamiento $\lambda$ . . . . .	60
8.	Caracterización del tamaño de muestreo: agua en agua . . . . .	61
9.	Caracterización del tamaño de muestreo: anilina en octanol . . . . .	63
10.	Resultados del $\Delta G_{solv}$ de sistemas solvente_soluto . . . . .	66
11.	Resultados del cálculo de $\Delta G_{Transf}$ . . . . .	67
12.	Validación del modelo computacional . . . . .	69

## Resumen

Esta investigación se enfocó en estudiar el efecto de utilizar una mezcla de diacetilfosfatidilcolina (DAcPC) y agua para representar el estrato polar en un modelo computacional de una bicapa fosfolipídica.

El objetivo fue refinar este modelo para obtener una representación más cercana de la membrana biológica. Se observó que la adición de moléculas de agua al DAcPC mejora la predicción del comportamiento de pequeñas moléculas al interactuar con la membrana.

En particular, se encontró que al añadir agua se obtiene una disminución en el cambio de energía libre de solvatación y transferencia de los solutos estudiados. Esto indica que las moléculas de agua tienen un efecto estabilizador en el proceso de solvatación dentro del estrato polar. Además, se optimizó el protocolo computacional para el cálculo de variables termodinámicas, logrando una distribución adecuada de los parámetros que definen las interacciones moleculares.

En conjunto, este estudio proporciona un modelo refinado que predice de manera correcta el comportamiento de moléculas pequeñas al interactuar con la membrana fosfolipídica. Los resultados tienen implicaciones para investigaciones futuras sobre el mecanismo de acción de fármacos a nivel de la membrana.

## **Abstract**

This work focused on studying the effect of using a mixture of diacetylphosphatidylcholine (DAcPC) and water to represent the polar region in a computational model of a phospholipid bilayer.

The goal was to refine this model to obtain a representation closer to the biological membrane. It was observed that adding water molecules to DAcPC improves the prediction of the behavior of small molecules when interacting with the membrane.

In particular, it was found that adding water decreases the change in free energy of solvation and transfer of the studied solutes. This indicates that water molecules have a stabilizing effect on the solvation process within the polar region. Additionally, the computational protocol for calculating thermodynamic variables was optimized, achieving an adequate distribution of the parameters that define molecular interactions.

Taken together, this study provides a refined model that correctly predicts the behavior of small molecules when interacting with a phospholipid membrane. The results have implications for future research on the mechanism of action of drugs at the membrane level.

# 1. Introducción

El estudio de las interacciones de biomoléculas con la membrana celular sigue siendo fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos biomédicos. Es imprescindible poder estimar la probabilidad de que un fármaco tenga la capacidad de atravesar la membrana celular y alcanzar su diana terapéutica [1, 2]. Esta información es de gran relevancia tanto para investigadores biomédicos como para la industria farmacéutica. El efecto de solvatación se ha investigado tanto teórica como experimentalmente, ya que este fenómeno subyace en las interacciones de moléculas con los diferentes estratos de la membrana. Algunas técnicas experimentales utilizadas incluyen la dispersión de rayos X de ángulo ancho y pequeño [3, 4], difracción de neutrones [5], resonancia magnética nuclear (RMN) y resonancia paramagnética de electrones [6, 7]. No obstante, estas técnicas son sofisticadas y difíciles de utilizar debido a las complejas interacciones nanoscópicas entre las moléculas y la membrana celular.

La membrana celular es un sistema complejo y diverso, compuesto principalmente por lípidos. Debido a su importancia biológica y alta complejidad, se han propuesto modelos que simplifican su estudio, manteniendo características esenciales para representar fenómenos relevantes, reduciendo su estructura compleja a una bicapa lipídica [8]. Uno de los modelos comúnmente utilizados en la industria farmacéutica emplea los solventes octanol y agua para representar las fases lipídica-acuosa de la membrana celular. Este modelo ha ganado popularidad debido a que permite medir, de manera relativamente sencilla, el coeficiente de partición de moléculas, que indica la proporción de concentraciones de las moléculas entre ambas fases [9]. Esta proporción, a su vez, permite estimar si la molécula en

cuestión podrá atravesar la membrana, lo cual está relacionado con su lipofilidad.

A pesar de las ventajas del modelo octanol-agua, presenta una limitación importante al no considerar las interacciones de los fármacos en las regiones polar y apolar de la bicapa lipídica de manera independiente, ya que estas últimas están representadas por una sola fase (octanol). Desde un enfoque teórico, y con el objetivo de buscar mejores aproximaciones, se han desarrollado modelos computacionales de membranas celulares explícitas que permiten el estudio de la interacción de fármacos con la estructura completa de la membrana. Sin embargo, estos modelos resultan costosos computacionalmente debido a la alta diversidad y cantidad de componentes involucrados [10]. Para abordar estas limitaciones, se propuso un modelo alternativo llamado *Membrane Multi-Phase Solvation Model* (MMPSM).

El MMPSM es un enfoque innovador que permite el estudio de las interacciones termodinámicas entre fármacos y los diferentes estratos de una bicapa fosfolipídica. Este modelo propone el uso de tres solventes independientes entre sí: el solvente S1 emula la fase acuosa, mientras que los solventes S2 y S3 representan los estratos conformados por las cabezas polares y las colas hidrofóbicas de la bicapa fosfolipídica, respectivamente. De esta manera, el MMPSM permite calcular el cambio en energía libre al transferir el fármaco de un solvente a otro, a partir del cambio en la energía libre de solvatación del fármaco en los distintos solventes. La lógica subyacente en este modelo radica en que el valor estimado del cambio de energía libre al pasar el fármaco del solvente S1 al S2, y del S2 al S3, proporciona información sobre la facilidad con la que el fármaco podrá ingresar y atravesar la membrana fosfolipídica.

Este enfoque ha demostrado ser valioso en el estudio de mecanismos de acción

de antibióticos y anestésicos [11, 12]. Falcon-Gonzalez y colaboradores presentaron la primera versión de la metodología computacional para estudiar la interacción termodinámica de membranas biológicas con moléculas pequeñas, utilizando el modelo de solvatación con detalle atómico para representar la membrana, diferenciando la región hidrófila de la hidrófoba. Al aplicarlo al análisis del mecanismo molecular de acción de la AmB, (un antimicótico) y de un análogo químico más seguro, los resultados proporcionaron información significativa sobre este proceso. La estimación de cambios de energías de solvatación y transferencia de varios compuestos en diferentes solventes simuló el paso de las drogas a través de la membrana. Los hallazgos del trabajo predijeron que ambas drogas se dimerizan en todos los solventes, lo cual desfavorece su penetración en el núcleo hidrófobo de la membrana a bajas concentraciones, pero permite la migración termodinámicamente posible de los esteroides de la membrana a una gota de droga adsorbida en la superficie de esta. Así, el MMPSM proporcionó una descripción detallada del mecanismo molecular que vincula las hipótesis actuales sobre el complejo proceso antibiótico de la AmB.

En un segundo trabajo, Falcon-Gonzalez y colaboradores utilizaron una segunda versión del MMPSM para estudiar las diferencias en el efecto anestésico entre la lidocaína y la bupivacaína. Se estimó el cambio en la energía libre de solvatación y el coeficiente de partición de las formas ionizadas de estos anestésicos locales al transferirlos del ambiente acuoso a las diferentes fases que representan la membrana. El análisis termodinámico reveló que la lidocaína difunde más rápidamente dentro de la membrana (mayor probabilidad), mientras que la bupivacaína tarda más en difundir fuera de ella (menor probabilidad). Estos resultados ofrecieron una explicación plausible de las diferencias en el inicio y duración del efecto

anestésico entre estos fármacos.

A pesar de los avances del MMPSM, dos limitaciones importantes aún deben abordarse. En primer lugar, la molécula utilizada como solvente para representar el estrato polar de la bicapa fosfolipídica solo se asemeja ligeramente a las cabezas polares de los fosfolípidos. En segundo lugar, no se ha considerado la presencia de moléculas de agua en este solvente, a pesar de que existen en la interfaz hidrofílica de la bicapa fosfolipídica [13].

Surge entonces la pregunta, ¿de qué manera se puede refinar el MMPSM para reducir estas dos limitaciones tan importantes?

## **2. Antecedentes**

En este capítulo, presentamos una revisión detallada de los conceptos fundamentales necesarios para comprender la propuesta de nuestro proyecto de investigación. Además, describimos las técnicas y metodologías computacionales que hasta la fecha se han empleado para implementar el *Membrane Multi Phase Solvation Model* (MMPSM). Con un enfoque interdisciplinario, este trabajo tiene como objetivo refinar el MMPSM mediante el uso de un solvente con propiedades más cercanas a las del estrato polar de la bicapa fosfolipídica. Esto permitirá obtener un modelo de membrana celular con propiedades fisicoquímicas más próximas a las de una membrana biológica, abriendo nuevas perspectivas para la utilización del MMPSM en su tercera versión.

## 2.1. Membrana celular

La membrana celular exhibe una alta diversidad de lípidos que conforman una bicapa, cuya composición varía entre especies, tejidos y/o células dentro de un organismo [14]. Los principales lípidos estructurales en las membranas eucariotas son los glicerofosfolípidos, con predominancia de la fosfatidilcolina, y fracciones menores de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico [15].

Los fosfolípidos presentan una región hidrofóbica, que consiste en un esqueleto de glicerol esterificado a cadenas de ácido graso saturadas o cis-insaturadas de diferentes longitudes en las posiciones sn-1 y sn-2 [14]. Además, poseen una región polar que contiene un grupo fosfodiéster en la posición sn-3, el cual se esterifica con colina, etanolamina, serina o inositol para formar el ácido fosfatídico [16]. La presencia de ácidos grasos insaturados en al menos una posición confiere a la bicapa una fluidez significativa a 37 °C [17].

La glicerofosfatidilcolina presenta una geometría molecular casi cilíndrica, lo que le permite organizarse espontáneamente en bicapas planas al interactuar con una fase acuosa [18]. Las regiones hidrofóbicas de los lípidos tienden a agregarse, evitando el contacto directo con moléculas de agua para minimizar el área superficial, mientras que las regiones hidrofílicas interactúan directamente con el ambiente acuoso y entre sí [15].

Las moléculas de agua interactúan favorablemente con el estrato formado por las cabezas polares de los fosfolípidos mediante la formación de puentes de hidrógeno con los grupos aceptores de fosfatos, carbonilos y oxígenos del glicerol [19, 20]. A

medida que se profundiza en la bicapa, la cantidad de moléculas de agua interactuando con ella disminuye gradualmente [21], desde una densidad de agua bulto en el exterior, llegando a una densidad cero aproximadamente a 1.5 nm de profundidad, lo que abarca por completo el grupo de cabezas polares en las membranas de fosfatidilcolina [21].

## **2.2. Modelos de Membrana**

El estudio de las interacciones entre fármacos o moléculas y la membrana celular es de gran relevancia en la investigación farmacológica, ya que proporciona información valiosa para predecir su adsorción y distribución en el organismo [11, 12, 22]. Esta información es crucial para el diseño de fármacos con propiedades farmacéuticas mejoradas. Sin embargo, investigar y observar estas interacciones experimentalmente en membranas biológicas reales resulta sumamente complejo. Por esta razón, se han propuesto diversos modelos que representan las propiedades fisicoquímicas y características estructurales de la membrana.

En este capítulo, se detallan algunos ejemplos de estos modelos de membrana, tanto experimentales como computacionales.

### **2.2.1. Modelo bifásico**

Uno de los modelos utilizados para determinar la lipofilia de un fármaco a través de la membrana celular es el modelo de dos fases. Este modelo considera el medio acuoso y la región anfipática de la membrana celular, utilizando solventes sustitutos con propiedades fisicoquímicas similares a las de la bicapa lipídica.

Experimentalmente, se emplea un embudo de decantación donde se colocan dos solventes inmiscibles, uno acuoso y otro orgánico, en equilibrio. Cuando se agrega un soluto, representado como A, al sistema, este se distribuye en ambos solventes 1 y 2, hasta alcanzar una relación específica entre las concentraciones de cada fase, conocida como coeficiente de partición o  $\log P$ , en donde P es el cociente de ambas concentraciones [9].

Overton [23] y Meyer [24] propusieron que la partición aceite-agua puede simular la partición de un soluto entre la fase acuosa y una fase orgánica. Por convención, la concentración de la fase orgánica se sitúa en el numerador y la concentración de la fase acuosa en el denominador. En el contexto biológico, la medición del coeficiente de partición se ha realizado utilizando solventes como ésteres de cadena larga o alcoholes, siendo el 1-octanol el más comúnmente utilizado para la fase orgánica.

Se han medido los coeficientes de partición de diversos compuestos utilizando la partición octanol-agua como una aproximación a los coeficientes de partición de solutos que interactúan con la membrana celular. En general, un soluto puede atravesar la membrana lipídica con mayor facilidad si tiene un  $\log P > 1$ , lo que indica una mayor lipofilia. Por el contrario, cuando el coeficiente de partición es  $< 1$ , la molécula tiene una mayor afinidad al agua [9]. Sin embargo, la estimación de los coeficientes de partición de octanol-agua que representan la fase acuosa (agua) y la fase anfipática (octanol) de una membrana, no considera la región polar y no polar de la fase anfipática de la membrana celular.

### **2.2.2. Modelación computacional de solvente implícito o explícito**

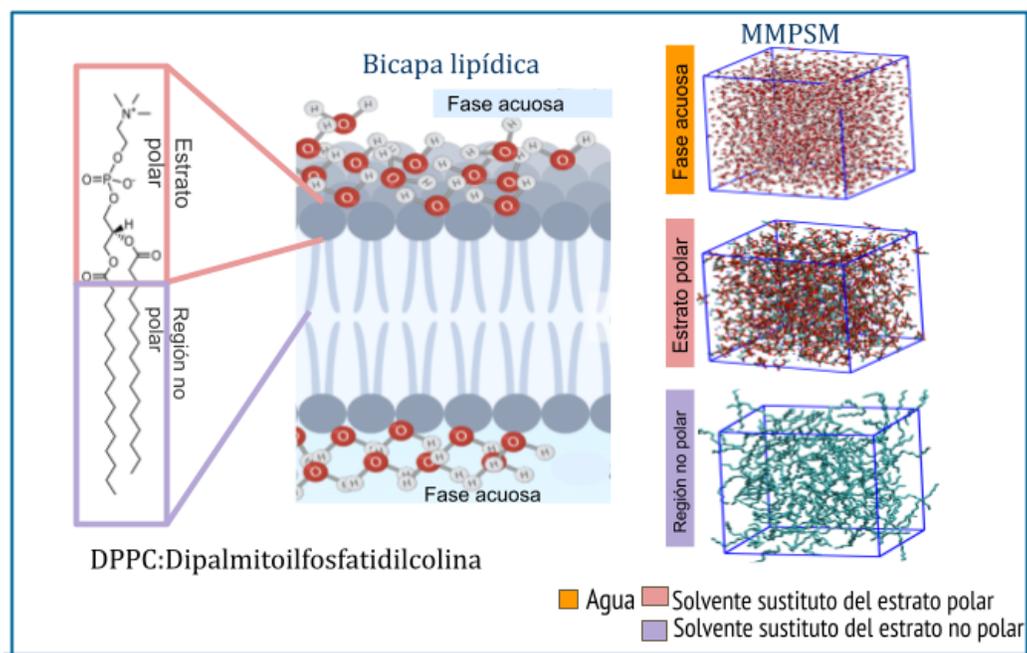
Los modelos de dinámica molecular son una herramienta invaluable para estudiar el comportamiento y la evolución de las membranas lipídicas a lo largo del tiempo. Para el estudio de las bicapas lipídicas, existen dos enfoques principales basados en solventes: modelos implícitos y modelos explícitos.

Los modelos implícitos son rápidos en términos computacionales, pero sus predicciones pueden carecer de precisión en comparación con datos experimentales [10]. Estos modelos simplifican la representación del solvente, lo que conlleva a una descripción menos detallada del sistema y sus interacciones.

Por otro lado, los modelos explícitos proporcionan una descripción más detallada al considerar explícitamente las moléculas del solvente y sus interacciones con la membrana lipídica [25]. Esto permite una mayor precisión en las predicciones, ya que se tienen en cuenta las fuerzas y propiedades específicas de las moléculas involucradas. Sin embargo, como consecuencia, el costo computacional de los modelos explícitos es mayor debido al mayor número de partículas que deben ser simuladas.

### **2.2.3. Modelo de membrana de solvatación multifase**

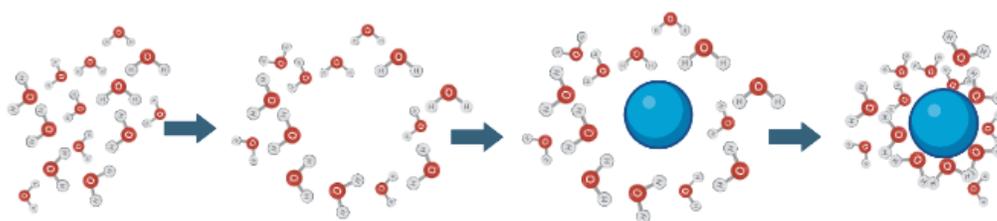
El Modelo de Membrana de Solvatación Multifase (Membrane Multi-Phase Solvation Model o MMPSM) es un modelo a nivel atómico que representa la membrana lipídica con tres fases independientes (acuosa, polar y no polar), cada una con propiedades fisicoquímicas distintas. En la Fig.1 se muestra de forma gráfica la construcción del MMPSM.



**Figura 1:** Representación gráfica del modelo de membrana de solvatación multifase (MMPSM): Se muestra la estructura química de la Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), en el recuadro rosa se delimita la región polar y en color morado las colas hidrofóbicas. La bicapa lipídica está conformada por moléculas de este tipo, inmersas en una solución acuosa. El MMPSM consiste en celdas computacionales llenas de solventes que emulan la fase acuosa, el estrato polar y las colas hidrofóbicas de la bicapa fosfolipídica.

Este enfoque termodinámico permite estimar el cambio de la energía libre de solvatación, transferencia y el coeficiente de partición de un soluto a través de la fase acuosa, fase polar e interior de la bicapa fosfolipídica [11]. La solvatación se refiere a la interacción de las moléculas de un solvente con un soluto, donde el solvente rodea y estabiliza al soluto mediante fuerzas intermoleculares, lo que resulta en la reorganización de las moléculas del solvente alrededor del soluto (ver Figura 3) [26].

En la construcción del MMPSM, originalmente se utilizó la molécula acetilmetilfosfato (AMP) para representar el estrato polar debido a su similitud estructural con las cabezas polares de los fosfolípidos [11]. Sin embargo, en una versión posterior del MMPSM [12], se reemplazó el AMP por el Trimetilazaniometil-hidrógeno-fosfato (HTC) debido a su mayor similitud con la cabeza polar del DPPC, especialmente el grupo colina. El MMPSM siempre ha considerado el hexadecano para representar el estrato no polar de la bicapa lipídica.

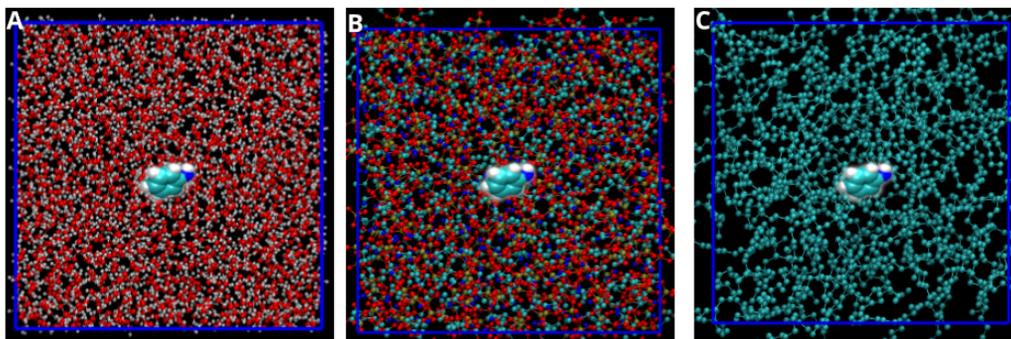


**Figura 2:** Representación gráfica del proceso de solvatación de un soluto (esfera azul) en el solvente agua

Como se mencionó anteriormente, este modelo de membrana de solvatación multifase ha contribuido a comprobar las hipótesis sobre el mecanismo de acción molecular de un fármaco antimicótico a nivel de la membrana celular [11]. Además, el modelo ha permitido analizar las diferencias en el inicio y la duración del efecto biológico de anestésicos a nivel de la membrana, proporcionando evidencia que refuerza una de las hipótesis del mecanismo de acción de estos [12]. Estos resultados sugieren que el MMPSM es una herramienta útil para entender, respaldar o comprobar posibles mecanismos de permeación a través de la membrana.

El modelo de solvatación multifase se construye con tres celdas computacio-

nales independientes, cada una conteniendo el mismo soluto pero utilizando un solvente diferente para cada fase: agua, solvente representante del estrato polar y hexadecano (ver Figura 3).



**Figura 3:** Celdas computacionales independientes empleadas en el MMPSM. Las celdas computacionales cúbicas contienen distintos solventes (representación CPK): A) agua, B) solvente representativo del estrato polar (variable), y C) solvente representativo del estrato no-polar (hexadecano). Todas las celdas tienen el mismo soluto en su interior (representación space-fill). Se usa la convención estándar de colores para los distintos tipos de átomos: oxígeno en rojo, hidrógeno en blanco, carbono en cian, nitrógeno en azul, y fósforo en café.

#### 2.2.4. Diacetilfosfatidilcolina hidratada

Se ha llevado a cabo investigación previa en el ámbito de moléculas que presentan similitudes estructurales con el estrato polar de la bicapa fosfolipídica. Moléculas como el AMP y el HPC se han utilizado como solventes representantes del estrato polar, sin embargo, no incorporan todos los grupos funcionales presentes en la región polar fosfolipídica [11, 12].

En un estudio experimental de partición de compuestos, se empleó la diacetilfosfatidilcolina (DAcPC) como aproximación al estrato polar de la bicapa lipídica.

La estructura química del DAcPC está compuesta por el grupo principal del DPPC, con cadenas de ácidos grasos truncadas. Otra característica de la DAcPC es su similitud con la capa de hidratación de la cabeza polar del DPPC, ya que la DAcPC se disuelve en agua en una proporción molar de 1:14 (1.96 M) [27].

En un estudio experimental más reciente, se midió la refractividad de las fases hidratadas de DAcPC con diferentes concentraciones de moléculas de agua y se determinó la polaridad mediante fluorescencia de estado estacionario. Se observó que la polaridad disminuye con la reducción del número de moléculas de agua presente, mostrando una función sigmoidea decreciente. Por tanto, el uso de la DAcPC con presencia de moléculas de agua, en una proporción de DAcPC:agua [1:8-16], se correlaciona adecuadamente con la naturaleza polar de la fosfatidilcolina fluida [28].

Cada estrato de la bicapa fosfolipídica presenta propiedades fisicoquímicas diferentes, las cuales pueden ser representadas por distintos solventes independientes: agua, solvente polar y solvente lipofílico. Se sabe que las cabezas polares fosfolipídicas se extienden aproximadamente hasta 1.5 nm de profundidad, con una cierta cantidad de agua presente. Por tanto, es importante mejorar la descripción de la interfaz hidrofílica con el solvente representativo del estrato polar implementado en el MMPSM. Así, es deseable el uso de un solvente que se asemeje mejor a la naturaleza polar de la membrana para aumentar la precisión del cálculo de interacciones de las moléculas que interactúan con ella.

El uso del MMPSM permite el cálculo de variables termodinámicas, como se discutirá en las siguientes secciones.

## 2.3. Variables termodinámicas

### 2.3.1. Cambio de energía libre de transferencia

El cambio de energía libre de transferencia de un soluto entre dos fases inmiscibles corresponde al trabajo necesario para transferir ese soluto desde una posición fija en la primera fase a una posición fija en la segunda fase. Este cambio en la energía libre, representado como  $\Delta G_{transf}$ , depende de las interacciones entre la molécula de soluto y las moléculas del solvente en ambas fases, que se describen mediante el cambio en la energía libre de solvatación,  $\Delta G_{solv}$ . Matemáticamente, el  $\Delta G_{transf}$  se calcula como la diferencia entre las energías libres de solvatación del soluto en las dos fases:

$$\Delta G_{transf} = \Delta G_{solv2} - \Delta G_{solv1} \quad (1)$$

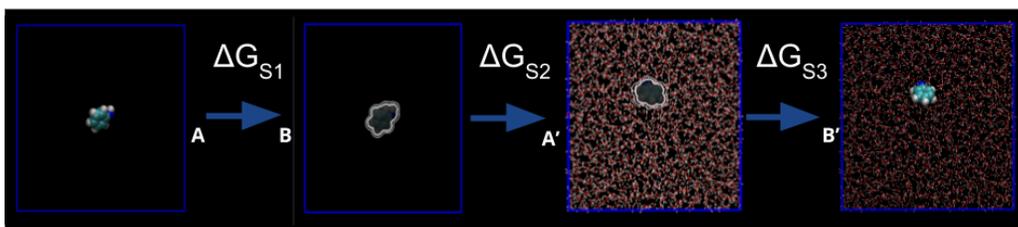
Además, el  $\Delta G_{transf}$  está relacionado con el coeficiente de partición de un soluto, que describe las concentraciones de equilibrio del soluto en dos fases diferentes [9]. Esta relación se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{transf} = -2,303RT \log P \quad (2)$$

donde R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta [11].

### 2.3.2. Cambio de energía libre de solvatación

El cambio en la energía libre de solvatación,  $\Delta G_{solv}$ , se refiere al trabajo necesario para transferir una molécula (soluto) del vacío al interior de un solvente. En el modelo MMPSM, se emplea un camino termodinámico de tres pasos para calcular este cambio de energía, como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4:** Esquema del camino termodinámico empleado para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  en el MMPSM. De izquierda a derecha: un fármaco (soluto) en el vacío debe apagar sus interacciones moleculares ( $\Delta G_{S1}$ ) para ingresar a una celda con moléculas (solvente) ( $\Delta G_{S2}$ ) y luego encender nuevamente sus interacciones moleculares ( $\Delta G_{S3}$ ). De esta forma,  $\Delta G_{solv}$  se calcula como la suma de  $\Delta G_{S1}$ ,  $\Delta G_{S2}$  y  $\Delta G_{S3}$ .

Dado que la energía libre es una función de estado, el cambio en la energía libre entre dos estados del sistema es independiente del camino utilizado para conectarlos. Por lo tanto, podemos definir  $\Delta G_{S1}$  como el cambio en la energía libre que ocurre cuando se apagan todas las interacciones no covalentes del soluto,  $\Delta G_{S2}$  como el cambio en la energía libre que ocurre al transferir el soluto del vacío al solvente, y  $\Delta G_{S3}$  como el cambio en la energía libre que ocurre al encender nuevamente todas las interacciones no covalentes del soluto dentro del solvente. Dado que el soluto con interacciones moleculares apagadas no interactúa con el sistema y el volumen accesible no cambia,  $\Delta G_{S2} = 0$ .

Utilizando el camino termodinámico descrito, el cambio en la energía libre de solvatación se calcula como:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{S1} - \Delta G_{S3} \quad (3)$$

El cálculo de  $\Delta G_{S1}$  y  $\Delta G_{S3}$  en el modelo MMPSM se basa en el enfoque de integral termodinámica (IT) para estimar el cambio en energía libre durante la transferencia del soluto entre las diferentes fases del sistema.

En la ecuación 4,  $\lambda$  es un parámetro de acoplamiento que se utiliza para cambiar gradualmente las interacciones no covalentes del soluto con las moléculas del solvente durante el camino termodinámico. El hamiltoniano  $H(r, p; \lambda)$  representa la función que describe el sistema, donde  $r$  son las coordenadas atómicas y  $p$  son los momentos de los  $N$  átomos del sistema,

$$\Delta G_{BA} = \int_{\lambda_0}^{\lambda_1} \left( \frac{\partial H(r, p; \lambda)}{\partial \lambda} \right)_{\lambda} d\lambda \quad (4)$$

Para calcular el cambio en energía libre al apagar las interacciones moleculares ( $\Delta G_{S1}$ ), se utiliza el parámetro de acoplamiento  $\lambda$  cuyo valor va desde 1 (con interacciones) hasta 0 (sin interacciones). La integral termodinámica se resuelve numéricamente, evaluando el promedio del ensamble  $n$  veces, donde  $n$  es el número de valores de  $\lambda$  elegidos. Se realizan simulaciones de dinámica molecular para cada valor de  $\lambda$  en el rango  $[0,1]$ .

Para calcular el cambio en energía libre al prender las interacciones moleculares del soluto en el solvente ( $\Delta G_{S3}$ ), se utiliza un enfoque similar, es decir, el valor

de  $\lambda$  va desde 1 (interacciones con el solvente completamente encendidas) hasta 0 (sin interacciones con el solvente).

Una vez que se resuelven las integrales termodinámicas para  $\Delta G_{S1}$  y  $\Delta G_{S3}$ , se utilizan en la ecuación 3 para obtener el cambio en energía libre de solvatación ( $\Delta G_{solv}$ ) del soluto en el solvente.

Es importante destacar que el cálculo de estas energías libres implica realizar múltiples simulaciones de dinámica molecular para diferentes valores de  $\lambda$ , lo que puede requerir recursos computacionales significativos. Sin embargo, este enfoque proporciona una descripción detallada y precisa de las interacciones entre el soluto y el solvente en diferentes entornos, lo que permite una caracterización termodinámica más completa de las interacciones fármaco-membrana en el modelo MMPSM.

## 2.4. Simulación de dinámica molecular

La simulación de dinámica molecular es una técnica computacional que se enfoca en el estudio de la evolución temporal de las posiciones e interacciones entre átomos en un sistema molecular. Esta técnica se basa en la solución numérica de las ecuaciones de movimiento de Newton para todas las partículas del sistema en cada instante de tiempo. Fue desarrollada originalmente por Alder y Wainwright [29, 30] al investigar sistemas de interacción de esferas duras.

En la actualidad, la dinámica molecular se utiliza para el estudio de estructuras moleculares, variables termodinámicas y la dinámica de sistemas moleculares. Permite estimar cantidades promediadas, como la energía, temperatura y presión,

que son fundamentales para comprender el comportamiento promedio del sistema en estudio. Para llevar a cabo esta técnica, se utilizan métodos, algoritmos numéricos y parámetros adecuados al sistema en cuestión. Estos métodos pueden variar dependiendo de las características específicas del sistema y de los fenómenos que se deseen estudiar.

La dinámica molecular ha demostrado ser una herramienta poderosa para investigar una amplia variedad de sistemas, desde proteínas y ácidos nucleicos en biología, hasta materiales y polímeros en ciencia de materiales. Su capacidad para simular el comportamiento atómico con gran detalle y a lo largo de escalas de tiempo significativas ha llevado a importantes avances en diversas áreas de la ciencia. Además, esta técnica ha sido útil para validar y complementar resultados experimentales, así como para generar nuevas hipótesis y comprender fenómenos complejos a nivel molecular.

El éxito de la dinámica molecular radica en su capacidad para capturar las interacciones entre partículas, lo que proporciona una visión detallada de la dinámica y el equilibrio termodinámico de un sistema. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las simulaciones de dinámica molecular tienen limitaciones y dependen en gran medida de la precisión de los modelos y parámetros utilizados. Por lo tanto, es fundamental llevar a cabo una validación cuidadosa de los resultados y considerar las condiciones específicas del sistema para obtener conclusiones significativas y confiables.

### 2.4.1. Simulación de dinámica molecular en GROMACS

GROMACS es una herramienta especializada en simulaciones de dinámica molecular de sistemas biológicos y químicos. Este software permite realizar estudios detallados de la evolución temporal de los sistemas moleculares. Para iniciar una simulación en GROMACS, se requiere un archivo de estructura molecular y la topología de la molécula. La topología incluye el tipo de campo de fuerza (Force Field, FF) a utilizarse en la simulación. Los campos de fuerza son un conjunto de parámetros que describen aspectos específicos de un sistema, como información sobre enlaces, ángulos, restricciones e interacciones atómicas [31].

En la actualidad, existen campos de fuerza disponibles que describen con razonable precisión las interacciones entre los átomos que conforman el sistema real. Estas interacciones se traducen en un potencial de energía total, que forma parte del Hamiltoniano del sistema. Por lo tanto, los resultados de las simulaciones de dinámica molecular dependen de la precisión de los campos de fuerza utilizados en los sistemas estudiados. Para este propósito, se han desarrollado diferentes conjuntos de parámetros, como GROMOS [32], CHARMM [33], OPLS [34, 35] y AMBER [36], que han mejorado la fiabilidad de las simulaciones de dinámica molecular de bicapas lipídicas hidratadas [37]. La elección del campo de fuerza apropiado dependerá del sistema molecular que se desee estudiar [38, 39].

Uno de los campos de fuerza compatibles con GROMACS es GROMOS (Groningen Molecular Simulation), el cual se centra en lograr un equilibrio entre una descripción precisa de las interacciones atómicas en función de la conformación y una representación funcional simple pero eficiente [40, 41].

El archivo de estructura molecular proporciona las coordenadas de la molécula, mientras que la topología define las interacciones atómicas. Estos archivos son necesarios para definir el espacio físico de simulación, solvatando o neutralizando el sistema si es necesario, y preparándolo para el inicio de la simulación. Durante las simulaciones, se emplean métodos computacionales como la minimización de energía potencial y relajaciones de acoplamiento de temperatura y presión [31].

A continuación, se describen las simulaciones que se realizan para el modelo de membrana de solvatación multifase (MMPSM).

### **Minimización de energía**

En GROMACS, es posible realizar la minimización de energía con el objetivo de reajustar las posiciones iniciales y reducir las fuerzas y energías potenciales de los átomos en el sistema. Esto ayuda a evitar choques estéricos o geometrías inapropiadas que podrían provocar errores computacionales durante la simulación.

Antes de ejecutar la simulación de minimización, es necesario integrar las coordenadas del sistema, la topología y los parámetros de simulación en un archivo de control. Estos parámetros definen el algoritmo que se utilizará durante el proceso de minimización, como el método de descenso más pronunciado (steepest descent), gradiente conjugado o l-bfgs. También se especifican otros parámetros, como el número de pasos, tolerancia de fuerza, tamaño de paso, radio de corte, entre otros [31].

Con los datos integrados, se inicia la minimización de energía del sistema, ya sea en una computadora local o en un servidor si el sistema es computacionalmente

costoso. Como resultado, se obtiene un sistema final con una distancia adecuada entre átomos, lo que favorece el proceso de relajación.

## **Relajación de sistemas**

Para asegurar que un sistema molecular se encuentre en condiciones experimentales estándar, esto es, con valores de temperatura y presión adecuados al sistema de estudio, es necesario muestrear configuraciones correspondientes a los ensambles NVT (N número de partículas, V volumen, y T temperatura constantes) y NPT (N número de partículas, P presión, y T temperatura constantes).

En simulaciones de sistemas moleculares utilizando GROMACS, los algoritmos asignan velocidades aleatorias a los átomos del sistema, siguiendo una distribución Maxwell-Boltzmann coherente con el ensamble canónico, y esto se realiza mediante el uso de un termostato [42]. El termostato tiene la función de mantener el sistema a una temperatura promedio constante con una perturbación mínima. En las simulaciones de dinámica molecular comunes, el termostato V-rescale se utiliza debido a su capacidad para generar propiedades físicas precisas en el sistema [43].

Una vez completada la simulación de dinámica molecular en el ensamble NVT, se procede de la misma manera con el barostato, que tiene la función de mantener el sistema a una presión promedio constante. Entre los barostatos disponibles, el C-rescale es más preciso y requiere un tamaño de muestreo menor en comparación con otros como Berendsen o Parrinello-Rahaman [31].

En conjunto, el termostato y el barostato desempeñan un papel importante en la

relajación del sistema a una temperatura y presión promedio constante, adecuada para el estudio del sistema en cuestión. Estos algoritmos aseguran que el sistema se encuentre en equilibrio termodinámico, permitiendo así un estudio más preciso de sus propiedades.

## **Producción**

Después de haber simulado el sistema en los ensambles NVT y NPT, se procede a la etapa conocida como "Producción". En esta fase, se configura el archivo de parámetros de dinámica con los termostatos y barostatos adecuados, junto con otros parámetros relevantes como el integrador, el tamaño de paso, el número de pasos, el radio y la longitud de corte, entre otros.

Durante la simulación de producción, se obtienen los resultados y datos de interés, como propiedades físicas, conformaciones estructurales y trayectorias de partículas. Estos datos son esenciales para analizar y obtener información relevante sobre el sistema simulado [31]. La etapa de producción proporciona una descripción detallada de la evolución temporal del sistema, permitiendo un estudio más profundo y completo de sus características y comportamiento.

## Hipótesis

El uso de la diacetilfosfatidilcolina hidratada como solvente representativo del estrato polar en el modelo de membrana de solvatación multifase mejorará la predicción del comportamiento de la interacción de moléculas pequeñas con la bicapa fosfolipídica.

## Objetivo General

El objetivo general de este estudio es refinar el modelo de membrana de solvatación multifase al utilizar una mezcla de diacetilfosfatidilcolina y agua para representar el estrato polar de la bicapa fosfolipídica.

## Objetivos Específicos

1. Determinar la proporción óptima de DAcPC:Agua como solvente representativo del estrato polar fosfolipídico en el modelo de membrana basado en fases de solvatación.
2. Optimizar los valores de las variables del protocolo de la integración termodinámica: número y distribución de valores del parámetro de acoplamiento  $\lambda$ , y tamaño de muestreo.
3. Caracterizar el efecto de tales variables en la convergencia y precisión del cálculo de  $\Delta G_{solv}$  de solutos dentro de un rango amplio de lipofilidad.

### 3. Metodología

En este capítulo se presenta una descripción del diseño experimental y los protocolos implementados para el refinamiento del MMPSM con la incorporación de la molécula de diacetilfosfatidilcolina con moléculas de agua, además del procedimiento para la validación de la implementación mediante el cálculo del coeficiente de partición.

#### 3.1. Caracterización del sistema DAcPC:Agua

Las coordenadas atómicas y los campos de fuerza que describen las interacciones atómicas de las moléculas de DAcPC y agua se obtuvieron del servidor web Automated force field Topology Builder (ATB). La molécula de DAcPC se identifica con el código *molid 33708*, y se utilizó el modelo de carga puntual simple (SPC) para describir las interacciones de las moléculas de agua. Los campos de fuerza utilizados para describir las interacciones entre átomos son una aproximación de átomo unido, coherente con el conjunto de parámetros GROMOS53A7, obtenidos de la misma manera en ATB

Todos los procedimientos descritos a continuación fueron llevados a cabo utilizando el software GROMACS 2022. En esta sección, se proporcionan detalles exhaustivos sobre los pasos y los parámetros utilizados en la dinámica molecular de los sistemas utilizando el solvente propuesto, DAcPC con moléculas de agua.

Inicialmente, se configuró un sistema compuesto únicamente por moléculas de DAcPC para investigar su comportamiento en ausencia de moléculas de agua

([1:0]). Posteriormente, tomando como base estudios previos que han demostrado la correlación existente entre la proporción de moléculas de agua por DAcPC [1:8-16] y la naturaleza polar de una bicapa de PC fluida, se construyeron sistemas que contenían moléculas de agua y DAcPC en proporciones de [1:4] [1:8], e [1:16]. Esta elección permitió analizar el comportamiento de cada sistema al incrementar las moléculas de agua, abarcando proporciones de 0, 4, 8 y 16 moléculas de agua por cada molécula de DAcPC. El número total de moléculas para cada uno de estos sistemas se detalla en la Tabla 1.

<b>[DAcPC:Agua]</b>	<b>Número de Moléculas</b>
1:0	122
1:4	122/488
1:8	122/976
1:16	122/1952

**Tabla 1:** Proporciones de diacetilfosfatidilcolina hidratada y número de moléculas para la construcción de celdas computacionales.

### **Configuración inicial del sistema DAcPC:Agua [1:0]**

Para la configuración inicial de un sistema con proporción DAcPC:Agua, se construyen celdas computacionales de dimensiones  $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ . Esto se logra utilizando los archivos de coordenadas en formato PDB de la molécula de DAcPC y ejecutando el siguiente comando en la terminal:

```
>gmx insert-molecules -ci ${solvente}.pdb -nmol 122
```

```
-box 4.0 4.0 4.0 -o ${solvente}.gro
```

La instrucción `gmx insert-molecules` permite insertar el número máximo de moléculas del solvente dentro de una caja cúbica. Las banderillas `-ci` se refieren a las coordenadas de entrada, `-nmol` indica el número de moléculas a insertar, y `-box` se utiliza para especificar las dimensiones de la caja computacional en nanómetros. Por último, `-o` se emplea para indicar el nombre del archivo de salida. Este paso se repite hasta obtener un total de cuatro archivos en formato `.gro`, correspondientes a los cuatro sistemas con proporción de DAcPC:Agua [1:0].

Conociendo el número máximo de moléculas de DAcPC dentro de una celda computacional de tamaño  $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$  (122 moléculas), se realizan los cálculos para las proporciones de DAcPC:Agua que se muestran en la Tabla 1.

### **Escribir Topología del sistema DAcPC:Agua [1:0]**

La topología de un sistema es un archivo necesario para iniciar una simulación, y contiene información sobre la estructura del sistema molecular. Para este caso, se escribe manualmente en un archivo tipo `.top`, como se muestra a continuación:

```
#include "gromos54a7_atb.ff/forcefield.itp"
#include "dacpc.itp"
[ system ]
dacpc
[ molecules ]
;molecule name    nr.
```

La primera línea indica el uso del archivo *forcefield.itp*, que contiene información detallada sobre los parámetros de interacción entre átomos, así como las fuerzas que actúan en el sistema. La siguiente línea se refiere al archivo que incluye los parámetros específicos de la molécula de DAcPC, como longitudes de enlace, ángulos, torsiones, interacciones de pares de Lennard-Jones, masas atómicas, entre otros.

La sección [*system*] indica el nombre del sistema, que en este caso es solo la molécula de DAcPC. En la última línea, se describe el nombre asignado a la molécula de DAcPC y el número máximo de moléculas dentro de la caja computacional creada en el paso de configuración inicial. Este paso se repite tres veces más para tener un total de cuatro archivos .top, correspondientes a la topología de los sistemas DAcPC:Agua [1:0].

### **Configuración inicial de sistemas DAcPC:Agua [1:0] a [1:16] y generación de sus topologías**

A partir de los archivos de salida tipo .gro de la configuración inicial del sistema DAcPC:Agua [1:0], se construyen los sistemas DAcPC:Agua [1:4], [1:8] y [1:16], que contienen un número específico de moléculas de agua.

Para introducir las moléculas de agua en cada sistema, se utilizan los siguientes comandos para la proporción [1:4], [1:8] y [1:16], respectivamente:

```
>gmx solvate -cp ${solvente}.gro -cs spc216.gro -maxsol 488
```

```
-o ${solvente}_4water.gro -p topol4.top
```

```
>gmx solvate -cp ${solvente}.gro -cs spc216.gro -maxsol 976
```

```
-o ${solvente}_8water.gro -p topol8.top
```

```
>gmx solvate -cp ${solvente}.gro -cs spc216.gro -maxsol 1952
```

```
-o ${solvente}_16water.gro -p topol16.top
```

Estos comandos permiten introducir el número específico de moléculas de agua (488, 976 y 1952) en cada sistema DAcPC:Agua [1:4], [1:8] y [1:16], respectivamente. Se generan archivos tipo .gro y .top para cada sistema, que contienen la configuración inicial y la topología necesaria para iniciar las simulaciones de dinámica molecular.

La instrucción *gmx solvate* permite agregar moléculas de agua al sistema. Las banderillas indican lo siguiente: *-cp* se refiere a las coordenadas de entrada, que en este caso son las del sistema con 122 moléculas de DAcPC; *-cs* son las coordenadas del solvente que se va a introducir al sistema, en este caso, son moléculas de agua del modelo SPC; *-maxsol* establece el número de moléculas de agua a introducir al sistema; *-o* indica el nombre del archivo de salida; y *-p* es el archivo de topología generado después de la ejecución de *gmx solvate*, cuyo contenido es el siguiente:

```
#include "gromos54a7_atb.ff/forcefield.itp"
```

```
#include "dacpc.itp"
```

```
#include "gromos54a7_atb.ff/spc.itp"
```

```

[ system ]
dacpc in water
[ molecules ]
;molecule name    nr.
Q40T                122
SOL                  488

```

La estructura es similar a la topología del sistema DAcPC:Agua [1:0], con la diferencia en la tercera y la última línea. En la tercera línea de comando, se refiere al archivo .ITP de la molécula de Agua, el cual contiene los parámetros de interacciones atómicas del modelo de agua SPC. En la última línea, *SOL* es la notación para las moléculas de agua. Este archivo se genera automáticamente, pero es importante revisar su contenido para verificar la correcta escritura de los nombres de las moléculas presentes en el sistema y asegurarse de que el número de moléculas concuerde con la proporción establecida en la Tabla 1.

### **Minimización de energía y relajación de los sistemas DAcPC:Agua**

Para realizar la minimización de energía del sistema, se utilizó el algoritmo *steepest descent*, con 50,000 pasos. Los archivos de entrada son los archivos de salida del paso anterior, es decir, los cuatro sistemas con proporciones [1:0], [1:4], [1:8] y [1:16], cada uno con sus respectivos archivos de topología. La minimización se llevó a cabo para evitar choques o geometrías inapropiadas de los átomos de las moléculas de agua [43].

Para realizar la minimización de energía del sistema DAcPC:Agua [1:0], se

utilizó el siguiente comando:

```
>gmx grompp -f min.mdp -c ${solvente}.gro -p topol.top  
-o em.tpr -maxwarn 1  
>gmx mdrun -v -deffnm em
```

La instrucción *gmx grompp* permite preparar la ejecución de una simulación, utilizando archivos de entrada para generar un archivo de parámetros de simulación tipo tpr. Las banderillas que se escriben en el comando hacen referencia a lo siguiente: *-f* especifica el archivo con los parámetros para realizar la optimización de las posiciones de los átomos, *-c* indica el archivo de entrada .gro, *-p* es la topología que se está utilizando en el sistema y *-o* es el archivo de salida tipo .tpr, el cual contiene toda la información necesaria para iniciar la simulación. La siguiente línea de comando *gmx mdrun* inicia el proceso de minimización, *-v* permite visualizar el progreso de la simulación y *-deffnm* se usa para especificar la ubicación y nombre del archivo de entrada para el inicio de la simulación.

Para iniciar la relajación de los sistemas DAcPC:Agua, es necesario utilizar los archivos finales del paso de minimización de energía. Se utilizará el termostato V-rescale con un número de pasos de 2,500,000 (equivalente a 5 ns) y el Barostato C-rescale con un número de pasos de 25,000,000 (equivalente a 50 ns). A continuación, se escriben los siguientes comandos en la terminal:

```
>gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -p topol.top -o nvt.tpr  
>gmx mdrun -v -deffnm nvt
```

```
>gmx grompp -f npt.mdp -t nvt.cpt -c em.gro -p topol.top  
-o npt.tpr  
>gmx mdrun -v -deffnm npt
```

Las banderillas utilizadas en este paso indican lo mismo que se mencionó en el paso de la minimización, con la adición de la banderilla *-t*, que permite utilizar las velocidades que se asignaron en el paso NVT para el siguiente paso correspondiente a la relajación de NPT. Los archivos de salida serán sistemas DAcPC:Agua relajados.

### 3.2. Elección de solutos para el proceso de solvatación

Basándonos en un estudio previo sobre el coeficiente de partición octanol-agua, se cuenta con una lista de valores experimentales para 600 compuestos orgánicos [9]. De esta lista, se seleccionaron moléculas representativas de cada clase de compuesto, las cuales se detallan en la Tabla 2.

Con el propósito de comparar el comportamiento de los solutos en el modelo experimental y en el MMPSM, se ha llevado a cabo la elección de solutos siguiendo criterios determinados. Se buscó realizar una selección que abarcara un amplio rango de valores de coeficiente de partición octanol-agua ( $\log P$ ), incluyendo valores altos (moléculas lipofílicas), valores bajos (moléculas hidrofóbicas) y un valor cercano a 1. Asimismo, se consideró la disponibilidad de campos de fuerza que describan las interacciones para las moléculas seleccionadas.

<b>Clase</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>CAS#</b>	<b>log<i>P</i> exp.</b>
<b>Alcano</b>	Hexano	$C_6H_{14}$	110-54-3	+4.00 (0.25)
<b>Aromático</b>	Benceno	$C_6H_6$	71-43-2	+2.13 (0.10)
<b>Cicloalcano</b>	Ciclohexano	$C_6H_{12}$	110-82-7	+3.44 (0.35)
<b>Compuestos de azufre</b>	Propanotiol	$C_3H_8S$	107-03-9	+1.81(0.15)
<b>Amina</b>	Anilina	$C_6H_7N$	62-53-3	+0.90 (0.05)
<b>Éster</b>	Éster propílico del ácido metanoico	$C_4H_8O_2$	110-74-7	+0.83 (0.15)
<b>Aldehído</b>	Propenal	$C_3H_4O$	107-02-8	-0.01 (0.25)
<b>Cetona</b>	Acetona	$C_3H_6O$	67-64-1	-0.24 (0.10)
<b>Éter</b>	Epoxietano	$C_2H_4O$	75-21-8	-0.30 (0.20)
<b>Nitro</b>	Nitrometano	$CH_3NO_2$	75-52-5	-0.33 (0.05)
<b>Ácido</b>	Metanoico	$CHO_2^-$	64-18-6	-0.54 (0.20)
<b>Alcohol</b>	Metanol	$CH_4O$	67-56-1	-0.74 (0.07)
<b>Amida</b>	Formamida	$CH_3NO$	75-12-7	-1.51 (0.30)

**Tabla 2:** Valores de coeficientes de partición octanol-agua (con incertidumbre) de compuestos orgánicos simples. De izquierda a derecha, la clase y nombre del compuesto, fórmula química, su identificador del Chemical Abstracts Service (CAS), y el coeficiente de partición con la incertidumbre en su medición.

### 3.3. Optimización del protocolo de integración termodinámica

Con el objetivo de optimizar el protocolo de integración termodinámica aplicable a los sistemas solvente\_soluto, se utilizó el sistema Agua\_Agua como referencia. Se enfocó en el cálculo computacional del cambio de la energía libre de solvatación ( $\Delta G_{Solv}$ ) de una molécula de agua en un solvente acuoso. El valor experimental del cambio de la energía libre de solvatación de agua ya ha sido reportado, lo que proporciona una base confiable para la optimización. Además, el modelo de agua SPC y su campo de fuerza han sido ampliamente estudiados, lo que garantiza resultados precisos en el cálculo [44, 45].

Este sistema nos permitió ajustar los valores del parámetro  $\lambda$  en el rango de 0-1, su distribución y el tamaño de muestreo. La optimización de estos parámetros es esencial para realizar de manera precisa, convergente y eficiente la integración termodinámica.

Para la simulación, se obtuvo el archivo de coordenadas y el campo de fuerza para la molécula de agua del modelo SPC a través del servidor web ATB, utilizando el conjunto de parámetros de fuerza GROMOS53A7.

#### 3.3.1. Simulación de dinámica molecular del sistema Agua\_Agua

Aquí se detallan los procesos computacionales realizados en el sistema Agua\_Agua para el cálculo del  $\Delta G_{solv}$ .

## Construcción inicial de una celda computacional con moléculas de agua

Primero, se construye una celda computacional con un volumen de  $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$  y se llena con moléculas de agua. Esto se logra utilizando el siguiente comando:

```
>gmx solvate -cs spc216.gro -box 4.0 4.0 4.0 -o water.gro
```

El archivo de salida obtenido contiene la celda computacional llena de moléculas de agua. Para determinar la cantidad de moléculas presentes en el sistema, se accede al archivo .gro y se observa la penúltima línea, donde se muestra el número total de moléculas. En este caso, la celda computacional con un volumen de  $64 \text{ nm}^3$  contiene 2165 moléculas de agua. Esta información es fundamental para escribir el archivo topol.top, que debe estructurarse de la siguiente manera:

```
; The force field files to be included
#include "gromos54a7_atb.ff/forcefield.itp"
#include "gromos54a7_atb.ff/spc.itp"
[ system ]
water
[ molecules ]
;molecule name    nr.
SOL                2165
```

## Minimización de energía y relajación del sistema Agua

A continuación, se procede con la etapa de minimización de energía para evitar los choques estéricos entre los átomos de las moléculas de agua. Luego, se realiza

una relajación en dos pasos: el primero se relaciona con un aumento de temperatura de 0 a 310 K (Relajación NVT), y en el segundo paso, se relaja el sistema para alcanzar una densidad específica de acuerdo con el sistema de agua (Relajación NPT). La simulación de relajación se realizó con un tiempo de simulación de 100 ns.

### **Selección de una molécula de Agua como soluto a partir del sistema AGUA**

Una vez completada la etapa de relajación, se obtiene el archivo de salida correspondiente al sistema Agua relajado. El siguiente paso consiste en seleccionar una molécula de agua de las 2165 presentes en el sistema para que actúe como soluto, mientras que las 2164 moléculas restantes servirán como solvente.

Para lograr esto, se requiere un archivo .itp específico para la molécula de soluto. Para ello, se copia el archivo spc.itp, que describe las interacciones atómicas del modelo de agua SPC, ubicado en la carpeta *gromos54a7\_atb*, obtenido del servidor web ATB. A continuación, se le asigna un nuevo nombre, por ejemplo, *wat.itp*, y su contenido se edita manualmente de la siguiente forma: se cambia el nombre de la molécula de agua, que por defecto es SOL, por ejemplo, a WAT, en todo el archivo .itp, y se elimina la sección [settles].

Una vez realizada la edición del archivo .itp, se procede a modificar la topología realizada del sistema Agua de la siguiente forma:

```
#include "gromos54a7_atb.ff/forcefield.itp"  
#include "gromos54a7_atb.ff/wat.itp"  
#include "gromos54a7_atb.ff/spc.itp"
```

```

[ system ]
water
[ molecules ]
;molecule name    nr.
WAT                 1
SOL                 2164

```

Ahora, para poder asignar una molécula de SOL a WAT en el sistema Agua relajado, se crea un archivo index utilizando el comando de GROMACS:

```
>gmx make_ndx -f npt.gro -o index.ndx
```

En este caso, el parámetro  $-f$  se refiere al archivo de entrada, que corresponde al sistema relajado de Agua con las 2165 moléculas, y  $-o$  indica el nombre del archivo de salida. De esta manera, el sistema Agua\_Agua estará preparado para el siguiente paso.

### 3.3.2. Distribución de valores de Lambda y tamaño de muestreo para el sistema Agua\_Agua

Para eliminar gradualmente las interacciones de tipo Coulomb y Van der Waals del soluto con el solvente del sistema Agua\_Agua, se estableció un conjunto de valores para el parámetro  $\lambda$ , en el rango [0-1] tal como se muestra en la Tabla 3.

Para eliminar todas las interacciones atómicas, se utilizan diferentes tamaños de muestreo, que se describen en la Tabla 4

<b>Valores asignados a <math>\lambda</math></b>	
$n$ para interacciones tipo Coulomb	$n$ para interacciones tipo Van Der Waals
<b>10</b> (0,0.1,...,0.9,1)	<b>10</b> (0,0.1,...,0.9,1)
<b>15</b> (0,0.0625,...,0.9375,1)	<b>15</b> (0,0.0625,...,0.9375,1)
<b>10</b> (0,0.1,...,0.9,1)	<b>20</b> (0,0.05,...,0.95,1)
<b>15</b> (0,0.0625,...,0.9375,1)	<b>30</b> (0,0.0333,...,0.9666,1)
<b>30</b> (0,0.033,...,0.966,1)	<b>30</b> (0,0.033,...,0.966,1)

**Tabla 3:** Valores asignados al parámetro  $\lambda$ . Ambas columnas corresponden al muestreo de  $n$  valores de  $\lambda$ , del 0 al 1, donde  $n$  varía entre 10-30. La primera columna es el muestreo para la eliminación de las interacciones tipo Coulomb mientras que la segunda columna corresponde al muestreo para la eliminación de las interacciones tipo van der Waals.

<b>Tamaños de muestreo en nanosegundos</b>	<b>N números de valores de Lambda</b>
1 ns	<b>20, 30, 45, 60</b>
2ns	<b>20, 30, 45, 60</b>
5ns	<b>20, 30, 45, 60</b>

**Tabla 4:** Tamaños de muestreo del parámetro  $\lambda$

La configuración de número y distribución de valores de  $\lambda$ , así como el tamaño de muestreo se realiza modificando el archivo que describe los parámetros de dinámica molecular (mdp). Por ejemplo, en la primera fila de la Tabla 4 se tiene un total de 20 valores para el parámetro de  $\lambda$ . Esto implica que se crearán 20 archivos, cada uno con un valor de Lambda distinto. A continuación, se muestran los parámetros más relevantes que se incluyen en los archivos .mdp para la eliminación de las interacciones inter e intramoleculares.

```

dt                = 0.002
nsteps            = 2500000 ;2500000*0.002 = 5 ns
free_energy       = yes
init_lambda_state = 0
couple-moltype    = WAT ; name of moleculetype to decouple
couple-lambda0    = vdw-q ; all interactions
couple-lambda1    = none ; turn off everything

; Números de valores de Lambda
;
;          0   1   2   3   4   5   6   7   8   9
10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20
coul_lambdas=  0.0  0.1  0.2  0.3  0.4  0.5  0.6  0.7  0.8  0.9
1.0  1.0  1.0  1.0  1.0  1.0  1.0  1.0  1.0  1.0  1.0
vdw_lambdas=  0.0  0.0  0.0  0.0  0.0  0.0  0.0  0.0  0.0  0.0  0.0
0.0  0.1  0.2  0.3  0.4  0.5  0.6  0.7  0.8  0.9  1.0

```

La primera línea indica el tamaño del paso. Este valor se multiplica por el número de pasos (*nsteps*), que es *2500000 ps*, lo que resulta en un tamaño de muestreo de 5 nanosegundos. La tercera línea indica que se realizará el cálculo del cambio de la energía libre. El parámetro *init\_lambda\_state* permite controlar qué valor de  $\lambda$  se asignará al archivo de parámetros. En el ejemplo anterior, *init\_lambda\_state* es 0, por lo que el valor inicial de  $\lambda$  es 0,00. La molécula o soluto de estudio, a la cual se eliminan las interacciones, está asignado al parámetro *couple\_moltype*, siendo en este caso el soluto WAT. El parámetro *couple\_lambda0* se refiere al estado inicial de las interacciones del soluto con el solvente, lo que implica que el soluto tendrá todas las interacciones de Coulomb y de Van der Waals

en este estado. La siguiente línea indica el estado final, en el cual el soluto no tendrá ninguna interacción inter e intramolecular. Los parámetros *coul\_lambdas* y *vdw\_lambdas* son los que se modificarán para asignar el número total de valores al parámetro Lambda. Al utilizar *n* valores del muestreo de  $\lambda$ , se generan *n* archivos con estos valores, realizando el paso de la integración termodinámica, como se ve en la sección 4.3.3, mediante el algoritmo llamado *BAR*. Este cálculo se realiza con el siguiente comando:

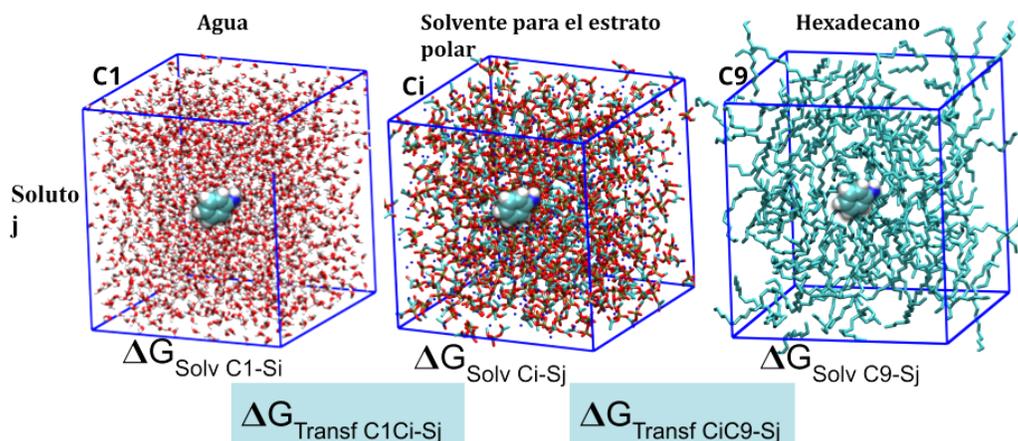
```
>gmx bar -f {nombre}*.xvg -o
```

La banderilla *-f* especifica los archivos de entrada, que se refieren al resultado final de cada simulación realizada para todas las *n*, mientras que *-o* indica que el resultado del cálculo de energía libre se guardará en un archivo de salida.

El resultado de este proceso es el cambio de la energía libre al eliminar todas las interacciones de un soluto en un solvente, tal como se describe en la Figura 4. A partir de este dato, es posible utilizar la ecuación 3 para calcular el  $\Delta G_{Solv}$ . El ejemplo anterior muestra cómo calcular el cambio de la energía libre de solvatación con 20 valores de  $\lambda$ , 10 para la eliminación de interacciones de Coulomb y 10 para las interacciones de tipo Van der Waals, con un tamaño de muestreo de 5 nanosegundos. Este procedimiento se repite para todos los valores asignados, cada uno con los tres tamaños de muestreo: 1, 2 y 5 ns. Esto se realiza con el fin de observar los efectos que producen la variabilidad de estos parámetros e identificar los óptimos para el cálculo del cambio de la energía libre de solvatación, buscando que sea convergente, preciso y eficiente para el sistema Agua\_Agua.

### 3.4. Construcción del modelo de membrana de solvatación multifase original y modificado

El diseño experimental del modelo de solvatación multifase, utilizado para el cálculo de las variables termodinámicas, se muestra en la Figura 5. Para ello, primero es necesario llevar a cabo la construcción de sistemas computacionales solvante\_soluto.



**Figura 5:** Celdas computacionales de sistemas moleculares, con un soluto  $j$  solvatado en el centro, llenas de moléculas de un solvente, agua en C1, hexadecano en C9 y una variación del solvente en Ci ( $i=2,3,\dots,8$ ). Para el cálculo del cambio de la energía libre de solvatación, de C1, Ci y C9, seguido del cálculo del cambio de la energía libre de transferencia, de C1 a Ci y de Ci a C9.

En la Tabla 5 se detallan los sistemas de las celdas computacionales utilizadas para la simulación de dinámica molecular. En primer lugar, se configuran 9 sistemas de solventes relajados (C1-C9). En cada uno de estos sistemas relajados, se solvatan los solutos seleccionados, uno hidrofílico, otro anfipático y otro hidrofóbico. De esta manera, se obtienen 27 celdas computacionales con solutos solvatados en C1 – C9, lo que resulta en un total de 36 sistemas a construir e iniciar las

simulaciones de dinámica molecular.

Las coordenadas atómicas y los campos de fuerza que describen las interacciones atómicas de las moléculas correspondientes a los solutos y solventes a utilizar, se obtuvieron del servidor web ATB, utilizando el conjunto de parámetros de fuerza GROMOS53A7. A continuación, se describen con más detalle los pasos para la configuración y construcción de estos sistemas.

Celda	Solventes	Soluto hidrofílico	Soluto anfipático	Soluto hidrofóbico
C2	octanol	C2-S1	C2-S2	C2-S3
C1	agua	C1-S1	C1-S2	C1-S3
C3	AMP	C3-S1	C3-S2	C3-S3
C4	HTC	C4-S1	C4-S2	C4-S3
C5	DAcPC:Agua[1:0]	C5-S1	C5-S2	C5-S3
C6	DAcPC:Agua [1:4]	C6-S1	C6-S2	C6-S3
C7	DAcPC:Agua[1:8]	C7-S1	C7-S2	C7-S3
C8	DAcPC:Agua[1:16]	C8-S1	C8-S2	C8-S3
C9	hexadecano	C9-S1	C9-S2	C9-S3

**Tabla 5:** Sistemas computacionales para las simulaciones de dinámica molecular. Cada color hace referencia a una fase específica de la bicapa fosfolipídica, en azul la fase acuosa, en violeta, la fase fosfolipídica del modelo bifásico, la celda de C3-C8 son los solventes representativos del estrato polar y por último en amarillo se indica el solvente representativo de las colas hidrofóbicas. Los sistemas solvente\_soluto está representado por Ci-Sj

### 3.4.1. Construcción, minimización y relajación de los sistemas con solventes representativos de los estratos fosfolipídicos

Los pasos de configuración inicial, escritura de topología, minimización de energía y relajación NVT y NPT se realizan nueve veces, una vez para cada solvente. Para facilitar y automatizar este proceso, se escribió un script llamado *solvente.sh*, que contiene los pasos de minimización y relajación del sistema. Este script puede ser ejecutado desde la terminal del computador con el comando *./solvente.sh*.

**Construcción del sistema:** Se inicia definiendo la dimensión de la celda computacional del sistema solvente, con un volumen de  $4 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ . Luego, se inserta un número  $N$  de moléculas del solvente en esta celda, utilizando el siguiente comando en la terminal:

```
>gmx insert-molecules -ci {solvente}.pdb -nmol N -box  
4.0 4.0 4.0 -o {solvente}.gro
```

**Escritura de la topología del sistema:** Se escribe el archivo de topología para el sistema con  $N$  moléculas, de acuerdo al número de moléculas definidas para cada solvente. Este proceso se detalla en el capítulo 5.1 de la topología DACPC:Agua.

**Minimización de energía del sistema:** A continuación, se inicia el proceso de minimización de energía para evitar superposiciones entre átomos durante la simulación de relajación. Se utiliza el siguiente comando dentro del script *./solvente.sh*:

```
>gmx grompp -f min.mdp -c ${solvente}.gro -p topol.top
```

```
-o em.tpr -maxwarn 1
>gmx mdrun -v -deffnm em
```

El comando *gmx gromp* permite unir posiciones, interacciones y parámetros de simulación, que se encuentran en el archivo de Anexos (*minimización.mdp*). Con el comando *gmx mdrun*, se inicia el proceso de minimización de energía, obteniendo como resultado un sistema con una configuración de energía mínima.

**Relajación del sistema:** El siguiente paso consiste en iniciar el proceso de relajación, donde el sistema debe alcanzar y mantener una temperatura promedio de 310°K y una presión de 1 atmósfera. Esto se logra mediante los siguientes comandos, que están incluidos en el script *.solvente.sh*.

```
>gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -p topol.top -o nvt.tpr
-maxwarn 1
>gmx mdrun -v -deffnm nvt
>gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -t nvt.cpt -p topol.top
-o npt.tpr -maxwarn 1
>gmx mdrun -v -deffnm npt
```

Aquí, el archivo de preprocesamiento realizado por el comando *gmx grompp* combina las posiciones del sistema minimizado, las interacciones atómicas y los parámetros de dinámica molecular correspondientes al ensamble NVT. Luego, se inicia el primer proceso de relajación con el comando *gmx mdrun*. A continuación, se repite el proceso para el ensamble NPT, pero en esta ocasión se agrega la banderilla *-t*, que hace referencia al archivo de salida de velocidades *nvt.cpt* generado

durante el paso NVT. Los archivos con los parámetros de simulación para NVT y NPT se encuentran en el apartado de Anexos (*nvt.mdp* y *npt.mdp*). El resultado es un sistema minimizado y relajado, configurado con condiciones experimentales biológicas estándar.

### **3.4.2. Solvatación de los solutos en los tres solventes**

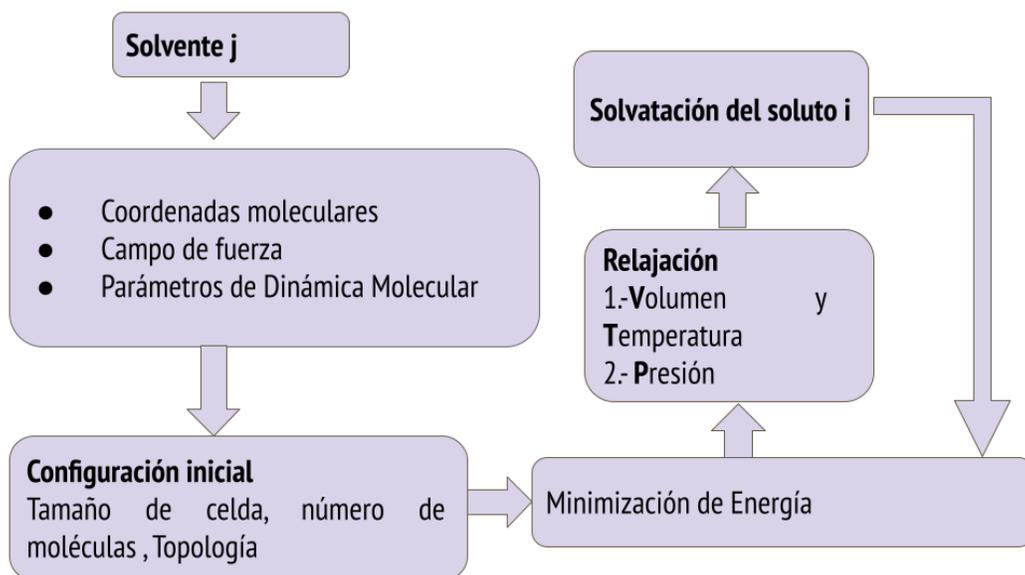
A partir de la selección de las tres moléculas como solutos, se procede a solvatar cada soluto en el centro de las nueve celdas computacionales con los solventes relajados. Es decir, el proceso de solvatación se realiza 27 veces, tal como se muestra en las columnas 3 – 5 de la Tabla 5. Para llevar a cabo este proceso de manera automatizada, se escribió el script *solvatación.sh* (ver script en Anexos). El proceso de solvatación se lleva a cabo mediante un algoritmo diseñado para eliminar las moléculas del solvente que se traslapen con el soluto, de manera que al colocar esta última adentro de la celda computacional, no se superponga con átomos de las moléculas del solvente. El resultado será un conjunto de 27 sistemas, cada uno con un soluto solvatado en el centro de la celda computacional.

### **3.4.3. Minimización de energía y relajación de los sistemas solvente\_soluto (Ci-Sj)**

Los sistemas *Ci-Sj* ahora contienen un número diferente de moléculas de solvente y una molécula de soluto, por lo tanto, los archivos de topología deben reescribirse de acuerdo al número de moléculas presentes en cada sistema. Se procede nuevamente a realizar el proceso de minimización y relajación de los 27 sistemas,

tal como se describió en 5.5.1. Este proceso se lleva a cabo con el mismo script *solventes.sh*, pero se cambia el nombre del sistema de solvente a *solvente\_soluto*.

De manera general, se presenta un esquema de los pasos de la simulación de dinámica molecular descrita previamente en la Figura 6.



**Figura 6:** Esquema general del proceso de simulación de dinámica molecular de los sistemas solvente y *solvente\_soluto*.

#### 3.4.4. Cálculos para determinar $\Delta G_{solv}$ y $\Delta G_{transf}$

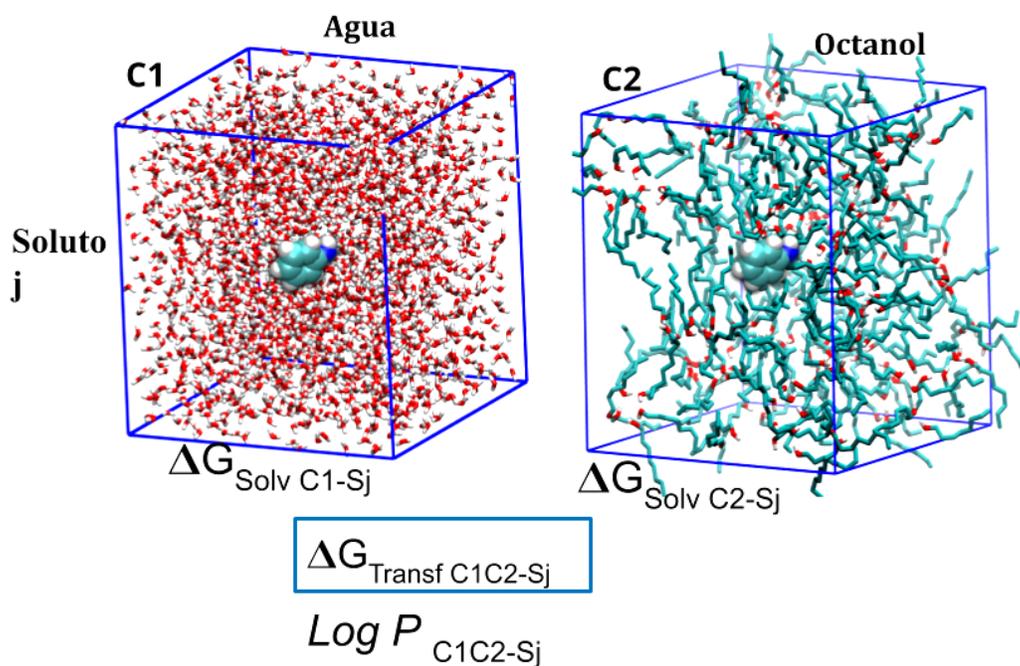
Para el cálculo de  $\Delta G_{Solv}$ , se implementa el protocolo optimizado para la integración termodinámica. Este resultado permite calcular el cambio de energía libre de transferencia a partir de la ecuación 3 en los sistemas que se muestran en el diseño experimental de la Figura 5. Estos datos nos proporcionan información sobre el costo energético de transferir el soluto de un solvente a otro.

### 3.4.5. Validación del protocolo optimizado para la IT a partir del modelo octanol\_agua

Para validar el modelo implementado, es posible evaluar la lipofilidad de los solutos seleccionados mediante la construcción del modelo bifásico octanol\_agua, como se muestra en la Figura 7. En este modelo, se calcularán las variables termodinámicas utilizando el protocolo optimizado para la integración termodinámica:

$\Delta G_{solv}$  y  $\Delta G_{transf}$ .

Además,  $\Delta G_{transf}$  está relacionado con el coeficiente de partición, como se muestra en la ecuación 2. Despejando la ecuación, es posible conocer el coeficiente de partición (Log P) de los solutos a través del sistema octanol\_agua.



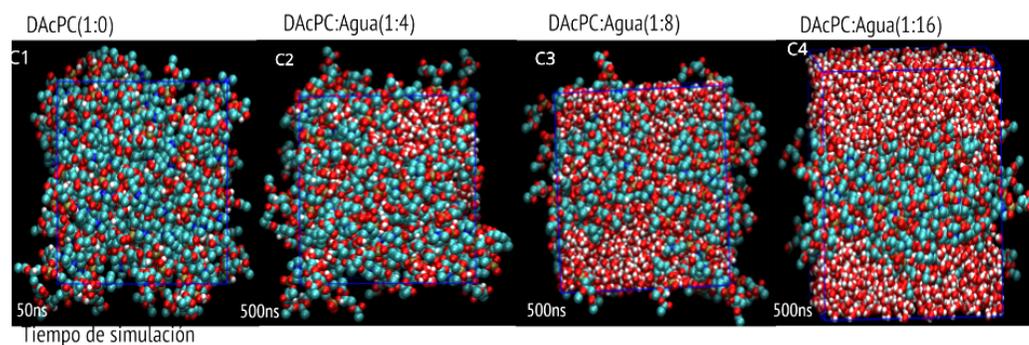
**Figura 7:** Modelo de solvatación de dos fases. Celdas computacionales con un solvente, agua y octanol, para la celda *C1* y celda *C2*, respectivamente, con un soluto *j* solvatado en el centro de ellas. Se realiza el cálculo del cambio de la energía libre de solvatación de *j* en la celda computacional *C1* y en la celda computacional *C2*, a partir de la implementación del protocolo para la integración termodinámica y el camino termodinámico descrito en la Figura 4. Luego se estima el cambio de la energía libre de transferencia de la celda *C1* a la celda *C2* y el coeficiente de partición entre ambas celdas.

## 4. Resultados

### 4.1. Efecto de la proporción de agua en DAcPC

Se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular para diferentes proporciones de DAcPC:Agua, como se muestra en la Tabla 1. Para la proporción [1:0] de DAcPC:Agua, es decir, *C1*, se realizó una simulación de 50 ns. En contraste, las siguientes celdas computacionales, *C2-C4*, se simularon durante 500 ns, con el fin de observar el comportamiento de las moléculas de DAcPC en interacción con las moléculas de agua.

El último cuadro de las simulaciones se presenta en la Figura 8. En ella, es posible observar una separación de fases en los sistemas DAcPC:Agua con proporciones de [1:8] y [1:16], correspondientes a las celdas *C3* y *C4*.

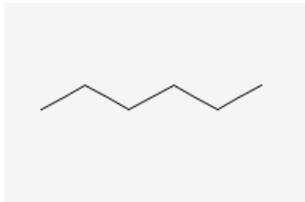
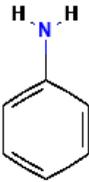
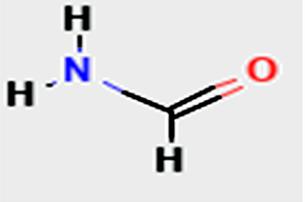


**Figura 8:** Simulación de dinámica molecular de celdas computacionales independientes con cuatro proporciones diferentes de DAcPC:Agua. La primera celda *C1* no contiene moléculas de agua y se simuló durante 50 ns. Para las proporciones de las celdas *C2-C4*, la simulación de dinámica molecular se realizó con un tiempo de simulación de 500 ns.

## 4.2. Selección de solutos para el proceso de solvatación

De todos los compuestos orgánicos de la Tabla 2, seleccionamos el hexano, la anilina y la formamida como solutos de estudio en la implementación del MMPSM original y modificado, debido a que sus valores de coeficiente de partición cubren un rango amplio.

El hexano es una molécula no polar y tiene el coeficiente de partición más alto de la Tabla 2. Es decir, es una molécula que debe tener una mayor preferencia por la región no polar de una membrana biológica. La molécula de anilina tiene una región polar que permitirá interacciones con la región hidrofílica y una región no polar favorable para el estrato hidrofóbico, esto es, es una molécula anfipática. Por último, la formamida es una molécula polar, por lo que se espera que permanezca en el estrato polar de la membrana.

<b>Hexano CID:8058</b>	<b>Anilina CID:7847</b>	<b>Formamida CID:713</b>
<b>LogP=4,00 ± 0,25</b>	<b>LogP=0,90 ± 0,05</b>	<b>Log P=-1,51 ± 0,30</b>
		

**Tabla 6:** Estructura molecular de compuestos seleccionados como solutos para la implementación del modelo MMPSM. La molécula de hexano, anilina y formamida, exhiben las siguientes propiedades, el Hexano es de naturaleza lipofílico, Anilina es una molécula anfipática y la Formamida es hidrofílico.

### 4.3. Protocolo para la integración termodinámica

#### 4.3.1. Efecto de la distribución de valores del parámetro $\lambda$ en el cálculo de

$$\Delta G_{solv}$$

Con la finalidad de caracterizar el efecto del parámetro de acoplamiento  $\lambda$  y optimizar el protocolo de la integración termodinámica, se escogió un sistema de referencia agua en agua, que ha sido muy estudiado. Así, se realizaron simulaciones de dinámica molecular del sistema Agua\_Agua para calcular  $\Delta G_{solv}$ . Se utilizó un rango de 20-30 valores para el parámetro  $\lambda$ , como se muestra en la primera columna de la Tabla 7. Se implementaron distribuciones simétricas y asimétricas de los valores de  $\lambda$  para la eliminación de interacciones coulomb y Van der Waals, mostradas en la segunda columna de la Tabla 7. Se llevaron a cabo los pasos de minimización de energía, relajación NVT y NPT, con una duración de 0.1 ns para cada paso, lo que suma un total de 0.2 ns de relajación. Se analizaron las simulaciones del paso de producción (simulación de 1 ns) para la integración termodinámica. Los resultados del cálculo de  $\Delta G_{solv}$  se muestran en la última columna de la Tabla 7, y en la última fila se incluye el valor de  $\Delta G_{solv}$  de una molécula de agua en el solvente agua, reportado experimentalmente [44]. Los resultados muestran que al utilizar 30 valores del parámetro  $\lambda$  distribuidos de manera simétrica, se obtiene una mayor precisión en el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  en comparación con el valor experimental reportado.

<b>Cambio en la energía libre de solvatación de agua en agua</b>				
A	B	C	D	E
20	10/10	0.2 ns	1 ns	$-26,70 \pm 0,18$
30	15/15	0.2 ns	1 ns	$-26,40 \pm 0,10$
30	10/20	0.2 ns	1 ns	$-27,25 \pm 0,12$
$\Delta G_{solv}$ calculado experimentalmente				$-26,40 \pm 0,8$

**Tabla 7:** Caracterización del parámetro de acoplamiento  $\lambda$ . De izquierda a derecha: **A)** Cantidad de puntos de muestreo en el rango  $[0,1]$  para valores de  $\lambda$ , **B)** distribución de los puntos de muestreo entre las interacciones de Coulomb y de van der Waals, **C)** tiempo de simulación considerando las fases de minimización y relajación NVT y NPT para cada punto de muestreo en  $\lambda$ , **D)** tiempo de simulación en la fase de producción para cada punto de muestreo en  $\lambda$  en la integración termodinámica, **E)** predicción del valor de  $\Delta G_{solv}$ . Los datos marcados en verde indican el protocolo más exacto y preciso para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  utilizando como referencia el valor reportado de manera experimental (en amarillo).

#### 4.3.2. Efecto del tamaño de muestreo en el cálculo de $\Delta G_{solv}$

Una vez determinado que utilizando 30 valores de  $\lambda$  distribuidos de manera simétrica entre interacciones de Coulomb y van der Waals se obtiene una predicción precisa y exacta de  $\Delta G_{solv}$  para el agua en agua, ahora queremos evaluar cómo el tamaño de muestreo afecta la convergencia del cálculo de  $\Delta G_{solv}$ . Las simulaciones para este cálculo se realizaron con diferentes tiempos de relajación NPT, que se muestran en la tercera columna de la Tabla 8. El tiempo de simulación de producción se estableció en 1 ns. Los resultados del cálculo de  $\Delta G_{solv}$  se muestran en la quinta columna y en la última columna se incluye el costo computacional en horas para el cálculo realizado en un nodo de 24 núcleos de un cluster. Los datos

calculados indican que el tamaño de muestreo más eficiente para cada valor de  $\lambda$  es de 2 ns, ya que permite obtener el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  de manera eficiente y precisa.

La línea marcada con color verde en la Tabla 8 indica el tamaño de muestreo más óptimo. Es posible observar que al aumentar el tamaño de muestreo, también aumenta la convergencia y precisión del cálculo de  $\Delta G_{solv}$ . Sin embargo, este aumento en la precisión conlleva un incremento en el costo computacional. Aunque el costo computacional se duplica al aumentar el tamaño de muestreo de 1 ns a 2 ns, el beneficio en la precisión es alto. Sin embargo, la diferencia entre hacer una relajación de 2 ns o 4 ns no es conveniente debido al incremento del costo computacional sin que aumente la precisión del cálculo. Se concluye que el tamaño de muestreo más óptimo para obtener un cálculo de  $\Delta G_{solv}$  eficiente es de 2 ns.

<b>Cambio en la energía libre de solvatación de agua en agua</b>					
A	B	C	D	E	F
30	15/15	1 ns	0 ns	$-32,20 \pm 2,50$	12
30	15/15	1 ns	1 ns	$-26,85 \pm 0,15$	24
30	15/15	4 ns	1 ns	$-26,80 \pm 0,13$	60
$\Delta G_{solv}$ calculado experimentalmente				$-26,40 \pm 0,84$	

**Tabla 8:** Caracterización del tamaño de muestreo estudiando el sistema agua en agua. De izquierda a derecha: **A)** Cantidad de puntos de muestreo en el rango [0,1] para valores de  $\lambda$ , **B)** distribución de los puntos de muestreo entre las interacciones de Coulomb y de van der Waals, **C)** tiempo de simulación de relajación NPT para cada punto de muestreo en  $\lambda$ , **D)** tiempo de simulación en la fase de producción para cada punto de muestreo en  $\lambda$  en la integración termodinámica, **E)** predicción del valor de  $\Delta G_{solv}$ , **F)** costo computacional en horas. Los datos marcados en verde indican el protocolo más eficiente para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  utilizando como referencia el valor calculado de manera experimental (en amarillo).

Para corroborar esta conclusión, se analizó un segundo sistema de referencia: el sistema anilina en octanol. En esta simulación para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$ , se aplicaron los pasos de dinámica molecular descritos en la sección 5.5 al sistema. Se realizaron simulaciones con diferentes valores para el parámetro de acoplamiento  $\lambda$ , que se muestran en la primera columna de la Tabla 9, utilizando distribuciones simétricas y asimétricas, y un tamaño de muestreo de 1 ns para la relajación NPT y producción.

Estas simulaciones se llevaron a cabo para observar la contribución del aumento en el número de valores y la distribución del parámetro  $\lambda$  y caracterizar su efecto en la convergencia, precisión y eficiencia del cálculo de  $\Delta G_{solv}$ , de manera similar al sistema agua en agua. Los resultados refuerzan la conclusión de que el protocolo óptimo para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  mediante la integración termodinámica consiste en utilizar 30 valores del parámetro  $\lambda$  distribuidos de manera simétrica para la eliminación de interacciones tipo Coulomb y van der Waals. Además, se encontró que un tamaño de muestreo de 2 ns para la integración termodinámica proporciona resultados precisos y eficientes, con 1 ns de relajación para el sistema y 1 ns para el análisis de la integración termodinámica. De esta manera, se logra obtener el  $\Delta G_{solv}$  con gran exactitud y eficiencia.

#### 4.4. Cálculo de $\Delta G_{solv}$ , $\Delta G_{transf}$ y coeficiente de partición

Con el protocolo de integración termodinámica optimizado, se llevó a cabo el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  para todos los sistemas solvente\_solute mencionados en la Tabla 5, excepto las proporciones DAcPC:Agua [1:8] y DAcPC:Agua [1:16], lo que resultó en un total de 21 sistemas. Para cada sistema, se realizaron 30 simulaciones,

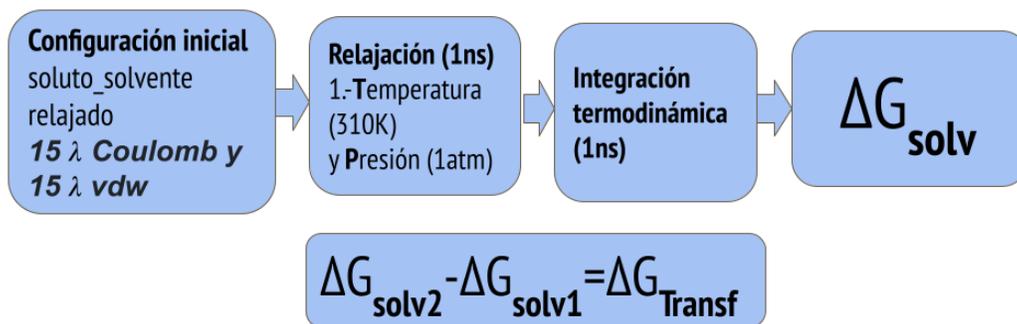
Cambio en la energía libre de solvatación de anilina en octanol					
A	B	C	D	E	F
30	15/15	1 ns	1 ns	$-32,33 \pm 0,36$	10
45	15/30	1 ns	1 ns	$-32,4 \pm 0,18$	15
60	30/30	1 ns	1 ns	$-31,72 \pm 0,42$	20
$\Delta G_{solv}$ calculado experimentalmente				$-28,07 \pm 0,84$	

**Tabla 9:** Caracterización del tamaño de muestreo estudiando el sistema anilina en octanol. De izquierda a derecha: **A)** Cantidad de puntos de muestreo en el rango [0,1] para valores de  $\lambda$ , **B)** distribución de los puntos de muestreo entre las interacciones de Coulomb y de van der Waals, **C)** tiempo de simulación de relajación NPT para cada punto de muestreo en  $\lambda$ , **D)** tiempo de simulación en la fase de producción para cada punto de muestreo en  $\lambda$  en la integración termodinámica, **E)** predicción del valor de  $\Delta G_{solv}$ , **F)** costo computacional en horas. Los datos marcados en verde indican el protocolo más eficiente para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  utilizando como referencia el valor calculado de manera experimental [44] (en amarillo).

con un tamaño de muestreo total de 2 ns (incluyendo relajación y producción), lo que equivale a 630 simulaciones de dinámica molecular para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  de todos los sistemas solvente\_soluto. Para agilizar la realización de estos cálculos, se creó el script IT.sh, el cual automatiza el procedimiento de generar 30 simulaciones para cada sistema (ver Anexos). Así, utilizando el método BAR, se obtuvieron los valores del cálculo de  $\Delta G_{solv}$ .

El siguiente paso fue calcular  $\Delta G_{Transf}$  de los solutos estudiados al pasar de agua al solvente representativo del estrato polar de la bicapa fosfolipídica.

En la Figura 9 se muestra de manera general los procesos realizados para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  y  $\Delta G_{transf}$ .



**Figura 9:** Esquema general de procesos computacionales para el cálculo de  $\Delta G_{\text{solv}}$  y  $\Delta G_{\text{Transf}}$

En la Tabla 10, se presentan los resultados de  $\Delta G_{\text{solv}}$ . Estos datos nos permiten determinar el cambio en la energía libre generado al solvatar un soluto en los diferentes solventes representativos de la bicapa fosfolipídica.

Los resultados de  $\Delta G_{\text{solv}}$  para el hexano, anilina y formamida concuerdan con lo esperado, dada la naturaleza fisicoquímica de cada uno de ellos en el solvente acuoso. El hexano, al ser una molécula menos polar que la formamida, muestra que el proceso de solvatación no es espontáneo, mientras que la formamida, al ser más polar que el hexano y la anilina, presenta un proceso de solvatación favorable.

Por otro lado, en el solvente hexadecano, al ser menos polar que el agua, el proceso de solvatación se ve favorecido para las moléculas de hexano y anilina, en contraste con la formamida.

Es importante mencionar que los valores de  $\Delta G_{\text{solv}}$  para todos los solutos (hexano, anilina y formamida) en los solventes representativos del estrato polar son negativos, lo que indica que el proceso de solvatación ocurre de forma espontánea. Sin embargo, estos valores varían, algunos más negativos que otros, lo que clasifica los procesos de solvatación como más o menos espontáneos. Estas diferencias

se deben a las propiedades fisicoquímicas de cada soluto y solvente, así como a las interacciones y efectos de entropía que ocurren en el proceso de solvatación.

Al comparar los resultados de  $\Delta G_{solv}$  para el solvente DAcPC sin agua [1:0] y con agua [1:4], es posible observar una disminución de estos valores al agregar moléculas de agua al sistema. Esto se relaciona con las interacciones intermoleculares presentes en cada sistema. Para el sistema en presencia de moléculas de agua, se han formado puentes de hidrógeno con la DAcPC, antes de que un soluto sea solvatado y pueda formar interacciones soluto\_solvente. Por lo que el proceso de solvatación de un soluto, es menos espontáneo, en contraste con el sistema sin moléculas de agua, el soluto al ser solvatado por DAcPC las interacciones son más favorables.

En consecuencia, al incorporar moléculas de agua, el resultado se acerca a los valores de  $\Delta G_{solv}$  del agua como solvente puro. Esto indica que las moléculas de agua tienen un efecto estabilizador en el proceso de solvatación, lo que disminuye la energía requerida para solvatar los solutos en el sistema. Esta disminución en los valores de  $\Delta G_{solv}$  refleja la afinidad de los solutos por el agua (con diferente magnitud) y la capacidad del agua para estabilizar las moléculas de soluto en el sistema.

A partir del cálculo de los  $\Delta G_{solv}$  del soluto en dos distintos solventes, se puede realizar el cálculo de  $\Delta G_{transf}$ , como se muestra en la Figura 9.

Los datos calculados del  $\Delta G_{transf}$  que se muestran en la Tabla 11, representan la energía necesaria para transferir un soluto particular entre los solventes implementados en la versión 3 del MMPSM, considerando el efecto de la inclusión de agua en el estrato polar, contrastando las proporciones de DAcPC:Agua [1:0] y

$\Delta G_{solv}$ [kJ/mol]			
Solvente/Soluto	hexano	anilina	formamida
octanol	$-15,36 \pm 0,34^b$	$-32,33 \pm 0,36^e$	$-23,15 \pm 0,25^g$
agua	$9,86 \pm 0,19^a$	$-22,55 \pm 0,22^d$	$-33,89 \pm 0,16$
AMP	$-35,62 \pm 0,73$	$-66,18 \pm 1,06$	$-80,7 \pm 1$
HTC	$-42,45 \pm 0,75$	$-94,17 \pm 1,8$	$-67,75 \pm 0,68$
DAcPC:Agua[1:0]	$-3,23 \pm 1,57$	$-44,97 \pm 1,2$	$-59,8 \pm 0,69$
DAcPC:Agua[1:4]	$0,74 \pm 0,65$	$-29,74 \pm 1,5$	$-35,56 \pm 1,43$
hexadecano	$-17,21 \pm 0,58^c$	$-28,95 \pm 0,23^f$	$-10,24 \pm 0,21^h$

**Tabla 10:** Resultados del cálculo de  $\Delta G_{solv}$  de los sistemas solvente\_soluto estudiados en este trabajo. El solvente AMP se utilizó en la versión 1 del MMPSM, y el HTC en la versión 2, se incluyen con propósito comparativo.  $\Delta G_{solv}$  calculados de manera experimental de los solutos en algunos solventes:  $a = 10,38 \pm 2,51$ ,  $b = -12,59 \pm 0,84$ ,  $c = -15,23 \pm 0,84$ ,  $d = -22,97 \pm 0,84$ ,  $e = -28,07 \pm 0,84$ ,  $f = -22,76 \pm 0,84$ ,  $g = -32,64 \pm 0,84$ ,  $h = -12,18 \pm 0,84$  [44, 46].

[1:4].

Los valores del cambio de la energía libre de transferir los solutos hexano, anilina y formamida del agua al DAcPC puro y del agua al DAcPC con agua son negativos. Esto sugiere que todos los solutos pasarán de la solución acuosa al estrato polar. Aún más, al comparar los resultados de la DAcPC con y sin moléculas de agua, se puede observar que incluir moléculas de agua al solvente DAcPC disminuye el  $\Delta G_{transf}$ .

En el caso del soluto hexano, su transferencia desde el solvente DAcPC, sin o con agua, al solvente hexadecano, resulta en un valor del  $\Delta G_{transf}$  negativo, lo que

indica que este soluto prefiere estar en el estrato no polar de la bicapa fosfolipídica. Este resultado concuerda con la naturaleza fisicoquímica del hexano, al ser una molécula hidrofóbica.

Para los solutos anilina y formamida, los valores son positivos, lo que indica que tienden a quedarse preferentemente en el solvente representativo del estrato polar, DAcPC sin o con agua, aunque en menor grado en el caso de la anilina. Esto se debe a la naturaleza anfipática del anilina y a la polaridad de la formamida, lo que favorece su solvatación en el solvente polar.

MMPSM $\Delta G_{Transf}$ [kJ/mol]			
	hexano	anilina	formamida
W→DAcPC	$-13,09 \pm 1,76$	$-22,42 \pm 1,42$	$-25,91 \pm 0,85$
W→DAcPC:W	$-9,12 \pm 0,84$	$-7,19 \pm 1,72$	$-1,67 \pm 1,59$
DAcPC →H	$-13,98 \pm 2,15$	$16,02 \pm 1,43$	$49,56 \pm 0,9$
DAcPC:W →H	$-17,95 \pm 1,23$	$9,32 \pm 0,99$	$27,07 \pm 1,64$

**Tabla 11:**  $\Delta G_{Transf}$  de los solutos estudiados, en el modelo de solvatación propuesto en este trabajo. En las filas de la celda en color azul se muestra la energía necesaria para poder pasar el soluto del solvente Agua (W) al DAcPC sin o con agua, es decir de la fase acuosa al estrato polar. En las filas de color verde se muestran los valores calculados del  $\Delta G_{Transf}$  de pasar el soluto del estrato polar al estrato no polar, representado por el solvente hexadecano (H).

Como se mencionó en capítulos previos, el cálculo de  $\Delta G_{Transf}$  a partir de la implementación del protocolo para el cálculo de  $\Delta G_{Solv}$ , permite estimar el coeficiente de partición del soluto para dos diferentes solventes, tal como se muestra en la ecuación 2.

Dado que se han reportado mediciones experimentales, y con la finalidad de

generar evidencia que valide al MMPSM, calculamos el valor del coeficiente de partición octanol-agua para el hexano, la anilina y la formamida (ver Tabla 12). Los datos de  $\Delta G_{Solv}$  y  $\Delta G_{Transf}$  se calcularon previamente considerando el modelo bifásico Octanol/Agua, el cual se ha utilizado en mediciones experimentales de la lipofilidad de moléculas. Nuestros resultados se comparan con predicciones calculadas con los algoritmos computacionales Molinspiration [47], rdkit [48] y ALOGPS [49]. Molinspiration es una empresa privada centrada en el desarrollo y la aplicación de técnicas modernas de quimioinformática, la cual proporciona herramientas a través de su sitio web (no da detalles de cómo implementa y realiza los cálculos). rdkit realiza la predicción de parámetros fisicoquímicos basada en contribuciones atómicas. ALOGPS utiliza redes neuronales asociativas para la predicción de la lipofilidad. Todos estos valores se contrastan con mediciones experimentales reportadas en la literatura [9].

Los resultados demuestran que el protocolo para el cálculo de variables termodinámicas utilizado en el modelo MMPSM predice correctamente la lipofilidad de los solutos estudiados. En particular, refleja la naturaleza lipofílica, anfipática e hidrofílica del hexano, la anilina y la formamida, respectivamente. Estos resultados son consistentes con las observaciones experimentales y validan la precisión y confiabilidad de la versión 3 del MMPSM en la predicción de la lipofilidad de solutos en diferentes solventes.

Log P Octanol/Agua					
	A	B	C	D	E
hexano	+3,66	+2,59	+4,02	+4,25 ± 0,53	+4,00 ± 0,25
anilina	+1,01	+1,26	+0,89	+1,65 ± 0,58	+0,90 ± 0,05
formamida	-0,92	-0,90	-1,53	-1,81 ± 0,41	-1,51 ± 0,30

**Tabla 12:** Validación del modelo de solvatación computacional. De izquierda a derecha: **A)** Molinspiration, **B)** rdkit, **C)** ALOGPS, **D)** MMPSM, **E)** medición experimental. El uso del protocolo implementado en el MMPSM predice correctamente la lipofilidad de los solutos aquí estudiados.

## 5. Discusión

Este trabajo de investigación se centró en estudiar el efecto de utilizar una mezcla de diacetilfosfatidilcolina y agua (DAcPC:Agua) como solvente representativo del estrato polar en el modelo de membrana de solvatación multifase (MMPSM), dada la similitud estructural de estas moléculas con dicho estrato en bicapas fosfolipídicas.

Se observó que la proporción crítica para la separación de fases en el sistema DAcPC:Agua se da a partir de [1:8], haciéndose más evidente en [1:16]. A medida que aumenta la proporción de agua en la mezcla, se favorece la separación de fases. La capacidad del campo de fuerza de las moléculas DAcPC y agua para reproducir correctamente el efecto de separación de fases a partir de cierta proporción, es evidencia de la calidad de descripción de interacciones atómicas utilizadas en este estudio.

Sin embargo, este efecto natural tiene implicaciones en nuestro estudio de la

solvatación de solutos. Por ejemplo, cuando se solvatan solutos en mezclas con proporciones DAcPC:Agua mayores a [1:4], la propiedad fisicoquímica de los solutos favorecerán la fase acuosa o la del DAcPC, lo cual no simula bien el comportamiento del soluto dentro del estrato polar de la membrana. Por lo tanto, la mezcla DAcPC:Agua con una proporción mayor a [1:4] no es adecuada como solvente representativo del estrato polar en este modelo. No obstante, observamos que en una proporción DAcPC:Agua [1:4], el sistema se muestra como una mezcla homogénea. En este último caso, el proceso de solvatación de un soluto es más cercano al comportamiento del estrato polar de la membrana fosfolipídica. Así, a pesar que de manera experimental la proporción de moléculas de DAcPC:Agua [1:8-16] se correlaciona con la naturaleza de las bicapas PC [28], nuestros resultados sugieren que la proporción máxima de DAcPC:Agua en la implementación del MMPSM debe ser de [1:4].

Por otro lado, optimizamos de manera sistemática el protocolo implementado para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$ . Encontramos que es más preciso y eficiente si se utilizan 30 valores del parámetro de acoplamiento  $\lambda$  distribuidos de manera simétrica, para la eliminación gradual de las interacciones inter e intramoleculares de Coulomb y van der Waals. Este resultado predice valores cercanos a los datos experimentales reportados para el  $\Delta G_{solv}$  de los solutos analizados en este trabajo. En términos de tamaño de muestreo, se encontró que con un tiempo de 2 ns, en todos los sistemas solvente\_solute (1 ns para realizar la relajación y 1 ns de producción), se obtiene un muestreo adecuado para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$ , dando resultados convergentes.

En concordancia con el MMPSM implementado previamente en el estudio de la Anfotericina B [11] y anestésicos locales [12], el modelo de membrana basado

en fases de solvatación usando el solvente DAcPC:Agua [1:4] como representación del estrato polar, predice correctamente el comportamiento esperado de los solutos estudiados de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, observamos que el efecto de la adición de moléculas de agua en el solvente DAcPC se ve reflejado en una disminución del  $\Delta G_{Solv}$  y por consiguiente de  $\Delta G_{Transf}$ , generando una corrección en las predicciones de solvatación en el sentido correcto. Este es un resultado importante, ya que muestra la relevancia de considerar al agua como componente del estrato polar de la membrana [50, 51, 52].

También generamos evidencia de la confiabilidad de los campos de fuerza de los solutos y solventes utilizados, ya que estos reproducen los efectos entálpicos y entrópicos necesarios para formar una cavidad en los solventes de manera que estas moléculas se reordenen alrededor del soluto. Así mismo, la predicción de los valores del coeficiente de partición octanol-agua para el rango amplio de lipofilicidad estudiado fue correcta. Estos resultados refuerzan la validez del uso del modelo de membrana de solvatación multifase propuesto como herramienta confiable para el cálculo de variables termodinámicas [53, 54, 55].

Es importante tener en cuenta las limitaciones que surgen al interpretar los resultados de este estudio. Reconocer y comprender estas limitaciones nos permitirá identificar áreas de oportunidad para la mejora de futuras investigaciones. El modelo de membrana de solvatación multifase, con el uso de DAcPC:Agua como solvente representante del estrato polar, muestra una capacidad adecuada para predecir la naturaleza fisicoquímica de los solutos estudiados. Sin embargo, hasta el momento no conocemos mediciones experimentales del logP de los solutos estudiados en este trabajo en membranas biológicas reales, esto es, solventes dis-

tintos a octanol. Esto limita evaluar la exactitud de las predicciones del MMPSM. Aún así, los comportamientos relativos de todos los solutos en todos los solventes analizados son como se espera.

Otra limitación importante es la omisión de presencia de iones en el solvente representante de la fase acuosa, ya que la región extracelular además de moléculas de agua contiene iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Cl}^-$ , por lo que se propone para un siguiente refinamiento, seleccionar los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , en una misma proporción, para la fase acuosa ya que ambos iones tienen un impacto en la hidratación y orientación en el grupo fosfato de una bicapa de DPPC [56]. Esto permitiría ver los efectos en el cálculo de las variables termodinámicas al usar la mezcla Agua:iones.

Además, creemos que es posible reducir el tamaño de muestreo para la integración termodinámica y tener una mejora en la convergencia de los datos calculados, disminuyendo el costo computacional, utilizando el método de integración *Accelerated Weight Histogram* (AWH) [57].

Los resultados de la refinación del modelo de membrana de solvatación multifase tienen implicaciones que enriquecen nuestro entendimiento del proceso de la solvatación en sistemas de bicapas lipídicas, que se pudieron visualizar en este estudio. Por lo anterior, podemos decir que el MMPSM versión 3 es una buena aproximación para estudiar las interacciones del soluto con una bicapa fosfolipídica, basándose en el proceso de solvatación, con nuestro protocolo optimizado.

## 6. Conclusión

La modificación del modelo de membrana de solvatación multifase (MMPSM) ha demostrado su eficacia en el cálculo preciso de variables termodinámicas mediante el método de integración termodinámica. Para lograrlo, se optimizó un protocolo que distribuye adecuadamente los valores del parámetro de acoplamiento  $\lambda$ , reproduciendo así datos experimentales reportados previamente con precisión y buena convergencia.

En este trabajo, se propuso refinar el MMPSM mediante el uso de la molécula DAcPC, que presenta una estructura química similar a la región polar del DPPC, además de la incorporación de agua con diferentes proporciones. Los resultados indican que para utilizar DAcPC:Agua como disolvente representativo del estrato polar de una bicapa fosfolipídica, es necesario mantener la proporción en [1:4]. Además, se confirmó la validez de los campos de fuerza utilizados, al observar el efecto natural de separación de fases en proporciones de DAcPC:Agua a partir de [1:8].

Asimismo, el uso del disolvente DAcPC:Agua en el MMPSM predice correctamente el comportamiento de los solutos estudiados en los diferentes estratos de la bicapa. Los resultados obtenidos validan la hipótesis planteada inicialmente; refinar este modelo de membrana con el uso de DAcPC:Agua como disolvente representante de la fase polar mejora la aproximación teórica, generando una herramienta confiable y precisa para el cálculo de variables termodinámicas en sistemas de bicapas fosfolipídicas.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio respaldan la utilidad y

aplicabilidad del MMPSM, mostrando ser una buena plataforma para estudiar las interacciones de solutos con una bicapa fosfolipídica, basándose en el proceso de solvatación. Este trabajo abre nuevas posibilidades para futuras investigaciones en las que se estudien nuevos fármacos, caracterizando su interacción con la membrana en etapas tempranas de desarrollo de manera eficiente y confiable.

## Referencias

- [1] Hewen Li, Tao Zhao, and Zhihua Sun. Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions. *Reviews in Analytical Chemistry*, 37(1), nov 2017.
- [2] J. Vrbanac and R. Slauter. ADME in drug discovery. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, pages 39–67. Elsevier, 2017.
- [3] C. Potamitis, P. Chatzigeorgiou, E. Siapi, K. Viras, T. Mavromoustakos, A. Hodzic, G. Pabst, F. Cacho-Nerin, P. Laggner, and M. Rappolt. Interactions of the at1 antagonist valsartan with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(6):1753–1763, 2011.
- [4] Charalambos Fotakis, Grigorios Megariotis, Dionysios Christodouleas, Efthichia Kritsi, Panagiotis Zoumpoulakis, Dimitrios Ntountaniotis, Maria Zervou, Constantinos Potamitis, Aden Hodzic, Georg Pabst, Michael Rappolt, Gregor Mali, Johanna Baldus, Clemens Glaubitz, Manthos G. Papadopoulos, Antreas Afantitis, Georgia Melagraki, and Thomas Mavromoustakos. Comparative study of the at1 receptor prodrug antagonist candesartan cilexetil with other sartans on the interactions with membrane bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(12):3107–3120, 2012.
- [5] Eva Pebay-Peyroula, Erick J. Dufourc, and Arthur G. Szabo. Location of diphenyl-hexatriene and trimethylammonium-diphenyl-hexatriene in dipal-

- mitoylphosphatidylcholine bilayers by neutron diffraction. *Biophysical Chemistry*, 53(1):45–56, 1994.
- [6] M. Sameer Al-Abdul-Wahid, Chris Neale, Régis Pomès, and R. Scott Prosser. A solution nmr approach to the measurement of amphiphile immersion depth and orientation in membrane model systems. *Journal of the American Chemical Society*, 131(18):6452–6459, May 2009.
- [7] Emiko Okamura and Masaru Nakahara. Nmr study directly determining drug delivery sites in phospholipid bilayer membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(17):3505–3509, 1999.
- [8] Longin N. Lisetski, Olga V. Vashchenko, Natalia A. Kasian, and Liliia V. Sviechnikova. Lyotropic liquid crystal phases of phospholipids as model tools in molecular biophysics and pharmacology. In *Springer Proceedings in Physics*, pages 85–111. Springer International Publishing, sep 2021.
- [9] James Sangster. Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 18(3):1111–1229, jul 1989.
- [10] Jin Zhang, Haiyang Zhang, Tao Wu, Qi Wang, and David van der Spoel. Comparison of implicit and explicit solvent models for the calculation of solvation free energy in organic solvents. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(3):1034–1043, mar 2017.
- [11] J. M. Falcón-González, G. Jiménez-Domínguez, I. Ortega-Blake, and M. Carrillo-Tripp. Multi-phase solvation model for biological membranes:

- Molecular action mechanism of amphotericin b. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(7):3388–3397, jun 2017.
- [12] José Marcos Falcón-González, Lucía Guadalupe Cantú-Cárdenas, Alcione García-González, and Mauricio Carrillo-Tripp. Differences in the local anaesthesia effect by lidocaine and bupivacaine based on free energy analysis. *Molecular Simulation*, 48(9):745–751, mar 2022.
- [13] Jeannine Milhaud. New insights into water–phospholipid model membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1663(1):19–51, 2004.
- [14] Takeshi Harayama and Howard Riezman. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5):281–296, feb 2018.
- [15] Gerrit van Meer, Dennis R. Voelker, and Gerald W. Feigenson. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2):112–124, feb 2008.
- [16] Doralicia Casares, Pablo V. Escribá, and Catalina Ana Rosselló. Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9):2167, may 2019.
- [17] Yanbo Yang, Minhyoung Lee, and Gregory D. Fairn. Phospholipid sub-cellular localization and dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 293(17):6230–6240, apr 2018.

- [18] Gerrit van Meer. Cellular lipidomics. *The EMBO Journal*, 24(18):3159–3165, sep 2005.
- [19] Pavol Balgavý, Martina Dubničková, Norbert Kučerka, Mikael A Kiselev, Sergey P Yaradaikin, and Daniela Uhríková. Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1512(1):40–52, 2001.
- [20] Norbert Kučerka, Stephanie Tristram-Nagle, and John F. Nagle. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *The Journal of Membrane Biology*, 208(3):193–202, Jan 2006.
- [21] Stephen H. White and William C. Wimley. MEMBRANE PROTEIN FOLDING AND STABILITY: Physical principles. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28(1):319–365, jun 1999.
- [22] Catarina Rodrigues, Paula Gameiro, Salette Reis, J.L.F.C Lima, and Baltazar de Castro. Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in water/dimyristoyl-1--phosphatidylglycerol (dmpg) liposomes. *Biophysical Chemistry*, 94(1):97–106, 2001.
- [23] E Overton. Osmotic properties of cells in the bearing on toxicology and pharmacology. *Z. Physik. Chem*, 22:189–209, 1897.
- [24] H Meyer. On the theory of alcohol narcosis i. which property of anesthetics gives them their narcotic activity? *arch. Exp. Pathol. Pharmacol*, 42:109–118, 1899.

- [25] Mauricio Carrillo-Tripp and Scott E. Feller. Evidence for a mechanism by which -3 polyunsaturated lipids may affect membrane protein function. *Biochemistry*, 44(30):10164–10169, 2005. PMID: 16042393.
- [26] James G. Speight. 3 - water chemistry. In James G. Speight, editor, *Natural Water Remediation*, pages 91–129. Butterworth-Heinemann, 2020.
- [27] Viera Lukacova, Ming Peng, Roman Tandlich, Anne Hinderliter, and Stefan Balaz. Partitioning of organic compounds in phases imitating the headgroup and core regions of phospholipid bilayers. *Langmuir*, 22(4):1869–1874, jan 2006.
- [28] Rajesh Subramaniam, Sandra Lynch, Yana Cen, and Stefan Balaz. Polarity of hydrated phosphatidylcholine headgroups. *Langmuir*, jun 2019.
- [29] B. J. Alder and T. E. Wainwright. Phase Transition for a Hard Sphere System. *The Journal of Chemical Physics*, 27(5):1208–1209, 08 2004.
- [30] B. J. Alder and T. E. Wainwright. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. *The Journal of Chemical Physics*, 31(2):459–466, 08 2004.
- [31] Mark Abraham, Andrey Alekseenko, Cathrine Bergh, Christian Blau, Eliane Briand, Mahesh Doijade, Stefan Fleischmann, Vytautas Gapsys, Gaurav Garg, Sergey Gorelov, Gilles Gouaillardet, Alan Gray, M. Eric Irrgang, Farzaneh Jalalypour, Joe Jordan, Christoph Junghans, Prashanth Kanduri, Sebastian Keller, Carsten Kutzner, Justin A. Lemkul, Magnus Lundborg, Pascal Merz, Vedran Miletić, Dmitry Morozov, Szilárd Páll, Roland Schulz, Michael Shirts, Alexey Shvetsov, Bálint Soproni, David van der Spoel, Philip Turner, Carsten Uphoff, Alessandra Villa, Sebastian Wingbermhühle, Artem

Zhmurov, Paul Bauer, Berk Hess, and Erik Lindahl. Gromacs 2023.1 manual, April 2023.

- [32] Chris Oostenbrink, Alessandra Villa, Alan E. Mark, and Wilfred F. Van Gunsteren. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53a5 and 53a6. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13):1656–1676, 2004.
- [33] Jeffery B. Klauda, Richard M. Venable, J. Alfredo Freites, Joseph W. O’Connor, Douglas J. Tobias, Carlos Mondragon-Ramirez, Igor Vorobyov, Alexander D. MacKerell, and Richard W. Pastor. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: Validation on six lipid types. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(23):7830–7843, may 2010.
- [34] Melissa L. P. Price, Dennis Ostrovsky, and William L. Jorgensen. Gas-phase and liquid-state properties of esters, nitriles, and nitro compounds with the OPLS-AA force field. *Journal of Computational Chemistry*, 22(13):1340–1352, 2001.
- [35] Krzysztof Murzyn, Maciej Bratek, and Marta Pasenkiewicz-Gierula. Refined OPLS all-atom force field parameters for in/i-pentadecane, methyl acetate, and dimethyl phosphate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(51):16388–16396, dec 2013.
- [36] Callum J. Dickson, Benjamin D. Madej, Åge A. Skjevik, Robin M. Betz, Knut Teigen, Ian R. Gould, and Ross C. Walker. Lipid14: The amber lipid force field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(2):865–879, jan 2014.

- [37] Marta Pasenkiewicz-Gierula, Krzysztof Baczynski, Michal Markiewicz, and Krzysztof Murzyn. Computer modelling studies of the bilayer/water interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(10):2305–2321, oct 2016.
- [38] Fang-Yu Lin and Alexander D. MacKerell. Force fields for small molecules. In *Methods in Molecular Biology*, pages 21–54. Springer New York, 2019.
- [39] Alpeshkumar K. Malde, Le Zuo, Matthew Breeze, Martin Stroet, David Poger, Pramod C. Nair, Chris Oostenbrink, and Alan E. Mark. An automated force field topology builder (ATB) and repository: Version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(12):4026–4037, nov 2011.
- [40] Wilfred F van Gunsteren, SR Billeter, AA Eising, PH Hünenberger, PKHC Krüger, AE Mark, WRP Scott, and IG Tironi. Biomolecular simulation: the gromos96 manual and user guide. *Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich*, 86:1–1044, 1996.
- [41] Chris Oostenbrink, Alessandra Villa, Alan E. Mark, and Wilfred F. Van Gunsteren. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The gromos force-field parameter sets 53a5 and 53a6. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13):1656–1676, 2004.
- [42] Joseph E. Basconi and Michael R. Shirts. Effects of temperature control algorithms on transport properties and kinetics in molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(7):2887–2899, 2013. PMID: 26583973.

- [43] Qia Ke, Xiaoting Gong, Shouwei Liao, Chongxiong Duan, and Libo Li. Effects of thermostats/barostats on physical properties of liquids by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Liquids*, 365:120116, 2022.
- [44] Aleksandr V Marenich, Casey P Kelly, Jason D Thompson, Gregory D Hawkins, Candee C Chambers, David J Giesen, Paul Winget, Christopher J Cramer, and Donald G Truhlar. Minnesota solvation database (mnsol) version 2012. 2020.
- [45] William L. Jorgensen, Jayaraman Chandrasekhar, Jeffrey D. Madura, Roger W. Impey, and Michael L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2):926–935, 07 1983.
- [46] Robert C. Rizzo, Tiba Aynechi, David A. Case, and Irwin D. Kuntz. Estimation of absolute free energies of hydration using continuum methods: accuracy of partial charge models and optimization of nonpolar contributions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2(1):128–139, 2006. PMID: 26626387.
- [47] Molinspiration Cheminformatics. Molinspiration Cheminformatics free web services. <https://www.molinspiration.com>. Slovensky Grob, Slovakia.
- [48] Scott A. Wildman and Gordon M. Crippen. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 39(5):868–873, August 1999.
- [49] Igor V. Tetko and Vsevolod Yu. Tanchuk. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *Journal*

*of Chemical Information and Computer Sciences*, 42(5):1136–1145, August 2002.

- [50] T. E. Thompson and C. Huang. THE WATER PERMEABILITY OF LIPID BILAYER MEMBRANES. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 137(2 Biological Me):740–744, July 1966.
- [51] J. P. Reeves and R. M. Dowben. Water permeability of phospholipid vesicles. *The Journal of Membrane Biology*, 3(1):123–141, December 1970.
- [52] Kianoush Khosravi-Darani. Liposome vesicle cannot be formed in non-aqueous phase. *Food Chemistry*, 430:136824, January 2024.
- [53] E. Wimmer. Future in biomolecular computation. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1(4):283–290, January 1988.
- [54] Charles L Brooks. Methodological advances in molecular dynamics simulations of biological systems. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(2):211–215, April 1995.
- [55] Michael E. Wall, Gaetano Calabró, Christopher I. Bayly, David L. Mobley, and Gregory L. Warren. Biomolecular solvation structure revealed by molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 141(11):4711–4720, March 2019.
- [56] Nadia N. Casillas-Ituarte, Xiangke Chen, Hardy Castada, and Heather C. Allen. Na<sup>+</sup> and ca<sup>2+</sup> effect on the hydration and orientation of the phosphate group of dppc at airwater and airhydrated silica interfaces. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(29):9485–9495, 2010. PMID: 20614879.

[57] M. Lundborg, J. Lidmar, and B. Hess. The accelerated weight histogram method for alchemical free energy calculations. *The Journal of Chemical Physics*, 154(20):204103, 05 2021.

## ANEXO 1

### Anexo 1: Archivos con parámetros de Dinámica molecular

#### Parámetros para la minimización de energía

##### min.mdp

```
; PARAMETROS DE CONTROL DE CORRIDA
integrator = steep
nsteps = 50000
; Frecuencias de salida para energías para archivo log y archivo de energía
nstlog = 1
nstenergy = 1
; Opciones de minimización de energía
; Tolerancia de fuerza y tamaño de paso inicial
emtol = 10 ; Stop minimization when the maximum force < 1000.0 kJ/mol/nm
emstep = 0.01 ; Minimization step size
; Número máximo de iteraciones en "relax-shells"
niter = 20
; PARAMETROS DE BUSQUEDA DE VECINOS
```

```

cutoff-scheme          = Verlet
; Frecuencia de actualización de nblast
nstlist = 1
; Algoritmo de búsqueda de vecinos (simple o grid)
ns_type = grid
; Condiciones de frontera periódicas (XYZ o ninguna)
pbc = xyz
; Radio de corte de nblast
rlist = 1.2
; OPCIONES PARA ELECTROSTATICA Y VDW
; Método para hacer electrostática
coulombtype = PME
; rcoulomb-switch = 0
rcoulomb = 1.2
; Constante dieléctrica (DC) para radio de corte o DC de campo de reacción
epsilon-r = 1
; Método para hacer VDW
vdw-type = cut-off
; Longitudes de corte
rvdw = 1.2
; Aplicar correcciones de dispersión de largo alcance para energía y presión
DispCorr = EnerPres
; Espaciamiento para la rejilla PME/PPPM FFT
fourierspacing = 0.12
; Tamaño de rejilla FFT, cuando un valor es 0 se usará fourierspacing

```

```

fourier_nx = 0
fourier_ny = 0
fourier_nz = 0
; Parámetros EWALD/PME/PPPM
pme_order = 6
ewald_rtol = 1e-06
epsilon_surface = 0
;optimize_fft = no
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = lincs

```

## **Parámetros para la relajación NVT**

### **nvt.mdp**

```

; RUN CONTROL PARAMETERS =
integrator = md
; start time and timestep in ps =
tinit = 0
dt = 0.002
nsteps = 25000000 ; 5ns
; number of steps for center of mass motion removal =
nstcomm = 100
; OUTPUT CONTROL OPTIONS =
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f) =

```

```

nstxout          = 0
nstvout          = 0
nstfout          = 0
; Output frequency for energies to log file and energy file =
nstlog           = 500
nstenergy        = 100
; Output frequency and precision for xtc file =
nstxout-compressed = 5000
compressed-x-precision = 1000
; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS =
; nblast update frequency =
nstlist          = 10
;OPTIONS FOR TEMPERATURE COUPLING
tcoupl = V-rescale
tc_grps          = System
tau_t            = 1
ref_t            = 310
; OPTIONS FOR BONDS =
constraints      = hbonds
; Type of constraint algorithm =
constraint-algorithm = lincs
; Do not constrain the start configuration =
continuation     = no
; Relative tolerance of shake =
shake-tol        = 0.0001

```

```

; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix =
lincs-order          = 4
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond =
; rotates over more degrees than =
lincs-warnangle      = 30
; Periodic boundary conditions: xyz or none =
pbc                  = xyz
; nblast cut-off      =
rlist                = 1.0
; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW =
; Method for doing electrostatics =
coulombtype          = pme
rcoulomb              = 1.2
; Dielectric constant (DC) for cutoff or DC of reaction field =
epsilon_r            = 1
; Method for doing Van der Waals =
vdw-type              = cut-off
; cut-off lengths     =
rvdw_switch          = 0
rvdw                  = 1.2
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure =
DispCorr              = EnerPres
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid =
fourierspacing        = 0.1
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used =

```

```
fourier_nx          = 0
fourier_ny          = 0
fourier_nz          = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters =
pme_order           = 6
ewald_rtol          = 1e-06
epsilon_surface     = 0

; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN =
gen_vel             = yes
gen_temp            = 310
gen_seed            = -1
```

## **Parámetros para la relajación NPT**

### **npt.mdp**

```
; RUN CONTROL PARAMETERS =
integrator          = md
; start time and timestep in ps =
tinit              = 0
dt                 = 0.002 ; ps=2fs
nsteps             = 25000000 ; 5ns
; number of steps for center of mass motion removal =
nstcomm            = 100
```

```

; OUTPUT CONTROL OPTIONS =
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f) =
nstxout          = 0
nstvout          = 0
nstfout          = 0
; Output frequency for energies to log file and energy file =
nstlog           = 500
nstenergy        = 100
; Output frequency and precision for xtc file =
nsthout-compressed = 50000
compressed-x-precision = 1000
; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS =
; nblast update frequency =
nsthlist         = 10

;OPTIONS FOR TEMPERATURE COUPLING
tcoupl = V-rescale
tc_grps          = system
tau_t            = 1
ref_t            = 310
;OPTIONS FOR PRESSURE COUPLING
Pcoupl          = c-rescale
tau_p            = 0.5
compressibility  = 5e-05
ref_p            = 1.0

```

```

; OPTIONS FOR BONDS      =
constraints              = hbonds
; Type of constraint algorithm =
constraint-algorithm     = lincs
; Do not constrain the start configuration =
continuation            = yes
; Relative tolerance of shake =
shake-tol               = 0.0001
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix =
lincs-order             = 4
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond =
; rotates over more degrees than =
lincs-warnangle         = 30
; Periodic boundary conditions: xyz or none =
pbc                    = xyz
; nblast cut-off        =
rlist                  = 1.0

; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW =
; Method for doing electrostatics =
coulombtype            = pme
rcoulomb               = 1.2
; Dielectric constant (DC) for cutoff or DC of reaction field =
epsilon_r              = 1
; Method for doing Van der Waals =

```

```

vdw-type                = cut-off
; cut-off lengths      =
rvdw_switch             = 0
rvdw                    = 1.2
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure =
DispCorr                = EnerPres
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid =
fourierspacing          = 0.1
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used =
fourier_nx              = 0
fourier_ny              = 0
fourier_nz              = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters =
pme_order               = 6
ewald_rtol              = 1e-06
epsilon_surface         = 0

; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN =
gen_vel                 = no
gen_temp                = 310
gen_seed                = -1

```

### **Parámetros para la integración termodinámica**

```

integrator              = sd      ; Langevin dynamics

```

```

tinit                = 0
dt                   = 0.002
nsteps               = 2500000    ; 5 ns
nstcomm              = 100
; Output control
nstxout              = 500
nstvout              = 500
nstfout              = 0
nstxout-compressed   = 0
; Output frequency for energies to log file and energy file =
nstlog               = 500
nstenergy            = 100
; Output frequency and precision for xtc file =
nstxtcout            = 5000
xtc-precision        = 1000

; Neighborsearching and short-range nonbonded interactions
cutoff-scheme        = verlet
nstlist              = 20
ns_type              = grid
pbc                   = xyz
rlist                 = 1.2
; Electrostatics
coulombtype           = PME
rcoulomb              = 1.2

```

```

; van der Waals
vdwtype                = cutoff
vdw-modifier           = potential-switch
rvdw-switch            = 1.0
rvdw                   = 1.2

; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr               = EnerPres

; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing         = 0.12

; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order              = 6
ewald_rtol             = 1e-06
epsilon_surface        = 0

; Temperature coupling
; tcoupl is implicitly handled by the sd integrator
tc_grps               = soluto  solvente
tau_t                 = 1.0    1.0
ref_t                 = 310    310

; Pressure coupling is on for NPT
Pcoupl                =C-rescale
tau_p                 = 1.0
compressibility       = 4.5e-05
ref_p                 = 1.0

; Free energy control stuff
free_energy           = yes

```

```

init_lambda_state      = 0
delta_lambda           = 0
calc_lambda_neighbors = 1      ; only immediate neighboring windows
couple-moltype = soluto
couple-lambda0         = vdw-q   ; only van der Waals interactions
couple-lambda1         = none    ; turn off everything, in this case only
vdW
couple-intramol        = no
; Vectors of lambda specified here
; Each combination is an index that is retrieved from init_lambda_state for
each simulation

```

```

; init_lambda_state      0   1   2   3   4   5   6   7   8   9
10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20  21  22  23  24
25 26          27  28  29  30
coul_lambdas            = 0.00 0.05 0.10 0.15 0.20 0.25 0.30 0.35 0.40 0.50
0.60 0.70 0.80 0.90 0.95 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00
1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.0
vdw_lambdas            = 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.05 0.10 0.15 0.20 0.25 0.30 0.35 0.40 0.50
0.60 0.70 0.710 0.715 0.720 0.725 0.730 0.735 0.74 0.75 0.78 0.80 0.85 0.90
0.95 1.00

```

```

; We are not transforming any bonded or restrained interactions
bonded_lambdas      = 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00

restraint_lambdas   = 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00

; Masses are not changing (particle identities are the same at lambda = 0 and
lambda = 1)
mass_lambdas        = 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00

; Not doing simulated temperting here
temperature_lambdas = 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00

; Options for the decoupling
sc-alpha            = 0.5
sc-coul             = no          ; linear interpolation of Coulomb (none
in this case)
sc-power            = 1
sc-sigma            = 0.3
nstdhdl             = 10

```

```
; Do not generate velocities
gen_vel                = no
; options for bonds
constraints             = h-bonds ; we only have C-H bonds here
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm    = lincs
; Constrain the starting configuration
; since we are continuing from NPT
continuation           = yes
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order            = 12
```

## **ANEXO 2**

### **Anexo 2: Script para la configuración, minimización y relajación de sistemas solvente y solvente-soluto**

#### **solvente.sh**

```
solvente='Octanol'
##CONFIGURACION INICIAL
##MINIMIZACIÓN
gmx grompp -f min.mdp -c ${solvente}.gro -p topol.top -o em.tpr -maxwarn 1
```

```
gmx mdrun -v -deffnm em
##RELAJACION NVT
gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -p topol.top -o nvt.tpr -maxwarn 1
gmx mdrun -v -deffnm nvt
##RELAJACION NPT
gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -t nvt.cpt -p topol.top -o npt.tpr
-maxwarn 1
gmx mdrun -v -deffnm npt
```

## **Script para solvatar un soluto en solvente**

### **solvatación.sh**

```
solvente='agua'
soluto='formamida'
mkdir mix_soluto
./insert_solute_in_solvent.awk solutos/${soluto}$.pdb solventes/${solvente}$.pdb 3
##VISUALIZAR FARMACO-SOLVENTE
vmd mix_formamida/AGUA_formamida.pdb
```

### **IT.sh**

```
#!/bin/bash
gmx="/usr/bin/gmx"
```

```

solvente="DACPC"
soluto="formamida"

#CREAR CARPETA PARA GUARDAR ARCHIVOS DE SALIDA DE LA INTEGRACIÓN TERMODINÁMICA
mkdir it_{$solvente}_{$soluto}

#30 VALORES DE LAMBDA
for (( i=0; i<31; i++ ))
do
    LAMBDA=$i
#CREAR CARPETA it_SOLVENTE_FARMACO
    mkdir it_{$solvente}_{$soluto}/Lambda_$LAMBDA
$gmx grompp -f MDP/it_{$solvente}_{$soluto}/md_$LAMBDA.mdp -c
SIS_CALENT/{$solvente}_{$soluto}_npt.gro -p FF/{$solvente}_{$soluto}.top -t
SIS_CALENT/{$solvente}_{$soluto}_npt.cpt -o
it_{$solvente}_{$soluto}/Lambda_$LAMBDA/md$LAMBDA.tpr -maxwarn 1

    $gmx mdrun -v -deffnm it_{$solvente}_{$soluto}/Lambda_$LAMBDA/md$LAMBDA
done

exit;

```