

**CONFORMACIÓN MOLECULAR EN AGREGADOS DE COLESTEROL:
ANÁLISIS A TRAVÉS DE LA SIMULACIÓN DE MONTE CARLO**

FREDY MARTIN OCHOA MAYORGA

LUZ YANEIDA JAIMES ORTIZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍA FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

**CONFORMACIÓN MOLECULAR EN AGREGADOS DE COLESTEROL:
ANÁLISIS A TRAVÉS DE LA SIMULACIÓN DE MONTE CARLO**

FREDY MARTIN OCHOA MAYORGA

LUZ YANEIDA JAIMES ORTIZ

**Documento presentado como requisito para optar el título de Ingeniero
Químico**

Director

GIOVANNI MORALES MEDINA

Ingeniero Químico, Ph. D

Codirector

Ramiro Martínez Rey

Ingeniero Químico, Ph. D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE FISICOQUÍMICAS

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

YANEIDA DEDICA A:

Primero que todo le dedico este proyecto a Dios por darme la sabiduría, la fe, la confianza y las fuerzas para seguir adelante por este camino. A mi Mamita Omaira por ser mi fuente de inspiración, mi guía, y por sus oraciones que me permitieron culminar con esta carrera tan hermosa que es la Ingeniería Química. A mis hermanos Jhosman, Geraldine y Mayerly, por ser otra razón de motivación, por su cariño y amistad incondicional y por estar ahí siempre cuando más los necesite. A mi Papá por su confianza en mí y por su ayuda económica. A mi novio Fredy Martin por estar siempre a mi lado apoyándome, por soportar mis terquedades, y por haber emprendido esta carrera juntos sin importar las dificultades que se nos presentaron. A mis amigos y compañeros quienes formaron parte de esta gran experiencia que empezó desde la sede Málaga y culminó en la sede principal (Bucaramanga), que Dios los bendiga y muchos éxitos en sus vidas.

MARTIN DEDICA A:

“Hoy son muchas las personas que recuerdo y marcaron con sus aportes mi vida en esta carrera a cada una de estas personas dedico esta obra”.
En especial a mis padres Ana Mercedes Mayorga Y Pedro Ignacio Ochoa por ser los cimientos de mi personalidad además de brindar su amor, apoyo y consejo a cada paso. Agradezco sus oraciones y entrega incondicional con esta causa. De igual forma a mis hermanos José, Deiby, Jesus, Mafe y carolina su cariño y admiración los llevo en mi corazón.
A mis abuelos que brindaron su apoyo y siempre añoraron este día con grata alegría agradezco el orgullo y pertenencia con la que me mencionan en sus comentarios.

Al Dr. Ernesto Olarte quien fue un gran apoyo en el punto de partida de este sendero. Su ayuda fue esencial para fijar la meta que hoy alcanzo.
A la sede UIS Málaga la cual fue la puerta de entrada. su labor y enseñanza es importante para el futuro de la región.

A mi novia Luz Yaneida gracias por compartir esta etapa del camino, son muchos los recuerdos que quedan y los sueños que faltan por vivir.
A mis amigos y demás familiares que han acompañado de buena fe esta aspiración de ser Ingeniero Químico.

A mis compañeros de trabajo solo ellos saben el sacrificio y entrega necesarios para hacer realidad cada aspiración.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser el pilar y el sustento en este largo y provechoso camino. Por sus grandes bendiciones, por ser el amparo y el confidente en cada dificultad.

A La Universidad Industrial De Santander en especial a la escuela de Ingeniería Química por ser el hogar que aporta los recursos intelectuales necesarios para forjar las herramientas en la vida profesional.

A nuestros profesores que han dejado su huella y enseñanzas en nosotros. Y a todo el personal técnico que hace posible el desarrollo de cada actividad relacionada con el aprendizaje.

Al profesor Giovanni Morales por su labor como director de este proyecto de grado, por sus consejos, orientaciones, tiempo y confianza depositada para sacar adelante esta investigación. A nuestro codirector Ramiro Martínez Rey por su tiempo y recomendaciones en la ejecución del presente escrito.

Al profesor Jorge Quintero Saumeth por su paciencia, enseñanza y consejos al comienzo de esta iniciativa por ser ese amigo siempre dispuesto a orientar con su conocimiento, así como una vela comparte su luz.

A nuestras familias que nunca perdieron la esperanza y siempre nos apoyaron de la mejor manera posible.

Y cada persona cercana que aportó su grano de arena a lo largo de esta carrera. Sus enseñanzas y recuerdos estarán siempre vigentes.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1.1 Campos de fuerza.	20
1.1.2 Charmm27.	22
1.2 SIMULACIÓN DE MONTE CARLO	23
1.2.1. Towhee:	24
2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	26
2.1 OBTENCIÓN DE UNA CONFIGURACIÓN INICIAL DEL COLESTEROL:	27
2.2. VERIFICACIÓN DE LA GEOMETRÍA TEÓRICA	28
2.3. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE AGREGADOS: 2 MOLÉCULAS ...	28
2.4. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE AGREGADOS: 3 MOLÉCULAS. ...	28
2.5. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE AGREGADOS: 4 MOLÉCULAS. ...	28
2.6. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE AGREGADOS: 5 MOLÉCULAS. ...	29
2.7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	29
3. RESULTADOS	30
3.1. CONFIGURACIÓN INICIAL	30
3.2. VERIFICACIÓN TEÓRICA DE LA GEOMETRÍA	30
3.3. OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA DE AGREGADOS: 2 MOLÉCULAS	35
3.4 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA DE AGREGADOS: 3 MOLÉCULAS	39
3.5 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA DE AGREGADOS: 4 MOLÉCULAS	43

3.6 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA DE AGREGADOS: 5 MOLÉCULAS	47
3.7 DISCUSIÓN FINAL	50
4. CONCLUSIONES	52
5. RECOMENDACIONES	53
6. CITAS BIBLIOGRÁFICAS	54
BIBLIOGRAFIA	59
ANEXOS	63

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Términos de la ecuación de energía potencial.	23
Tabla 2. Distancia de algunos enlaces presentes en la molécula.	33
Tabla 3. Angulo reportado para algunos enlaces.	34
Tabla 4. Frecuencias vibracionales de menor valor para una molécula.	34
Tabla 5. Distancia intermolecular.	38
Tabla 6. Frecuencias vibracionales de menor valor para 2 moléculas.....	39
Tabla 7. Frecuencias vibracionales de menor valor para 3 moléculas.....	42
Tabla 8. Distancia entre algunos átomos cercanos para 3 moléculas.....	42
Tabla 9. Distancia entre algunos átomos cercanos para 4 moléculas.	45
Tabla 10. Frecuencias vibracionales de menor valor para 4 moléculas.	47
Tabla 11. Distancia entre algunos átomos cercanos para 5 moléculas.	48
Tabla 12. Frecuencias vibracionales de menor valor para 5 moléculas.	49
Tabla 13. Distancia de enlaces en la cadena principal.	66

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura del colesterol. Bidimensional y tridimensional.	18
Figura 2 Celda unitaria de la estructura cristalina del colesterol.	19
Figura 3. Ruta metabólica del colesterol.	21
Figura 4. Descripción global de las etapas desarrolladas.	26
Figura 5. Conformación en 3D. de 1 molécula de colesterol.	31
Figura 6. Perfil de energía obtenido por la simulación.	32
Figura 7. Perfil energético para la simulación de dos agregados.	35
Figura 8. Configuración estructural más estable para dos colesteroles.	36
Figura 9. Cargas de Mulliken para 2 moléculas.	37
Figura 10. Configuración de menor energía para tres moléculas.	39
Figura 11. Perfil energético para agregados con tres moléculas.	40
Figura 12. Cargas de Mulliken para 3 moléculas.	41
Figura 13. Conformación estructural para agregados de 4 moléculas.	43
Figura 14. Perfil energético para agregados de 4 moléculas.	44
Figura 15. Interposición de la nueva molécula para agregados de 4.	46
Figura 16. Conformación estructural para agregados de 5 moléculas.	47
Figura 17. Perfil energético para agregados de 5 moléculas.	50

Figura 18. Variación de la energía de interacción en los agregados.51
Figura 19. Estructura del colesterol en 2D.65

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A: Instalación De Towhee	63
ANEXO B: Estructura Del Colesterol	65
ANEXO C: Towhee_Input	67
ANEXO D: Towhee_Coords	77

RESUMEN

TITULO: CONFORMACIÓN MOLECULAR EN AGREGADOS DE COLESTEROL: ANÁLISIS A TRAVÉS DE LA SIMULACIÓN DE MONTE CARLO.*

AUTORES: Luz Yaneida Jaimes Ortiz.
Fredy Martin Ochoa Mayorga.**

PALBRAS CLAVE: Colesterol, Towhee, Monte Carlo, agregación, simulación molecular, CHARMM27.

DESCRIPCIÓN:

El colesterol es una molécula que posee gran importancia en la fisiología de los vertebrados ya que es la base para otros compuestos y funciones de importancia celular –síntesis de hormonas y regulación de la fluidez de las células y permeabilización de iones–. Sin embargo, sus niveles deben mantenerse dentro del margen establecido para que no cause daños en la salud; algunos estudios relacionan la deficiencia del colesterol en el organismo con ciertos trastornos mentales. Asimismo, el exceso de colesterol ocasiona el aumento en los niveles de concentración en la sangre desencadenando procesos de aglomeración y posterior precipitación debido a su tendencia a formar agregados.

A pesar de su importancia, se encuentran pocos reportes sobre la agregación de colesterol en la literatura abierta. Por tal motivo, el presente trabajo fue dedicado al análisis de la agregación de moléculas de colesterol en fase gaseosa, con el objetivo de determinar las interacciones predominantes. Para ello se planteó una serie de simulaciones utilizando el software libre *Towhee* mediante el método de Monte Carlo con el campo de fuerza CHARMM27. Las distintas configuraciones fueron analizadas considerando número de moléculas de colesterol entre 2 y 5. Según los resultados, los valores geométricos para el colesterol utilizando *Towhee*, concuerdan con los reportados por mediciones de rayos X y por cálculos con CHARMM36. En los agregados, las interacciones entre átomos con baja polaridad presentan la mayor contribución en la formación de agregados de hasta 5 moléculas de colesterol. Asimismo, la contribución por puente de hidrógeno aumenta con el número de agregados, presentando una interacción apreciable en la estabilización del agregado de cinco átomos de colesterol.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ingenierías Físicoquímica. Escuela de Ingeniería Química. Director: Giovanni Morales, Dr. Ing. Químico

ABSTRACT

TITLE: MOLECULAR CONFORMATION OF CHOLESTEROL AGGREGATES: ANALYSIS THROUGH MONTE CARLO SIMULATION*

AUTHORS: Luz Yaneida Jaimes Ortiz
Fredy Martin Ochoa Mayorga**

KEY WORDS: Cholesterol, Towhee, Monte Carlo, aggregation, Molecular simulation, CHARMM27.

DESCRIPTION:

Cholesterol is a molecule that has great importance in the physiology of vertebrates since it is the basis for other compounds and cell functions -synthesis of hormones and the cell's regulation flow and ion permeabilization-. However, cholesterol levels must be kept within the established range to maintain body's health; some studies associate deficiency of cholesterol in the body with certain mental disorders. Likewise, cholesterol excesses in bloodstream can cause agglomeration and subsequent precipitation processes because of their tendency to form aggregates.

Despite its importance, there are a few open reports that deals with the process of cholesterol aggregation. The current work has been devoted to the analysis of aggregation of cholesterol in gas phase, in order to determine the predominant interactions between cholesterol molecules. For this, several Monte Carlo simulations using CHARMM27 force field were carried out in *Towhee* an open source molecular modeling software. Different configurations were analyzed considering between 2 and 5 cholesterol molecules.

According to the results obtained in this work, the geometry parameters for the cholesterol molecule reported by the simulations using *Towhee*, are consistent with those reported by measurements of X-ray and by theoretical calculations with CHARMM36. With respect to aggregates, intermolecular interactions between nonpolar atoms reported the greatest contribution to the formation of aggregates of up to 5 molecules of cholesterol. In addition, the contribution of hydrogen bond increases with the number of aggregates, presenting an appreciable contribution to the stabilization for the aggregate of 5 cholesterol molecules.

*Degree project

** Chemical Physics engineering faculty. School of chemical engineering. Advisor: Giovanni Morales, Ph.D. Chem. Eng.

INTRODUCCIÓN

El colesterol es un lípido o esteroide esencial para un adecuado desempeño del metabolismo de los vertebrados. Así mismo, este lípido constituye la materia prima para la formación de hormonas esteroideas, como testosterona, estrógenos y otras. Concomitantemente, el colesterol participa en la formación de las sales biliares, en la síntesis de la vitamina D y en el metabolismo del calcio esencial para los huesos (1-3). La ausencia de colesterol en el organismo se ha asociado con la depresión, la ansiedad, la bipolaridad y otros trastornos mentales¹ (3).

De otro lado, el exceso de colesterol en el organismo promueve la formación de ateromas o placas en los vasos sanguíneos, aumentando el riesgo de experimentar eventos cardiovasculares –*e.g.* infarto y derrame cerebral– (3). El colesterol puede iniciar un proceso de auto-agregación y agregación en forma esterificada y no esterificada, con fosfolípidos y otros compuestos, mientras es transportado por las lipoproteínas a través de los torrentes sanguíneos (2). Concentraciones elevadas de colesterol en la sangre conllevan diversos procesos de interacción molecular que favorecen su agregación y precipitación, lo cual afecta el correcto funcionamiento de las vías sanguíneas²; un aumento en la concentración del colesterol daría lugar a un mayor número de interacciones moleculares. La comprensión de estas fuerzas de interacción puede colaborar con el desarrollo de diferentes procedimientos dirigidos a la prevención y a la destrucción de depósitos de colesterol.

¹ El cerebro es el órgano del cuerpo más rico en colesterol; el colesterol es el componente primario para la síntesis de la mielina, la cual es una sustancia que envuelve y protege las células nerviosas además de aumentar la velocidad de impulso nerviosos.

² Aunque algunos estudios recientes han sugerido fuertemente que reducir el colesterol no garantiza una larga vida (3), lo ideal es siempre mantener un equilibrio en los niveles estándar de concentración de esta sustancia.

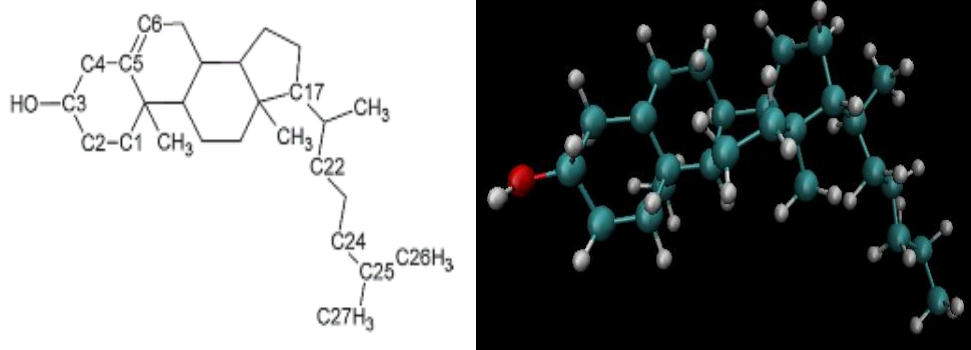
Adicionalmente, se ha demostrado por métodos cristalográficos la incidencia del solvente en la estructura cristalina del colesterol influyendo directamente en las interacciones de los compuestos de la solución dando como posible resultado la separación de fases o la formación de cristales. (4) Así mismo, se observó la inhibición de la cristalización causada por disolventes con presencia de fosfolípidos (5).

El presente trabajo de grado se dirige al análisis de las conformaciones de las moléculas de colesterol en agregados de 2 hasta 5 moléculas; se omite el efecto de un medio en las interacciones internas de los agregados (fase gaseosa). El análisis se efectúa por medio de simulaciones a nivel molecular con el campo de fuerza CHARMM27 (6-7). Las simulaciones aplican el método de Monte Carlo, según el paquete de uso libre *Towhee*, para explorar la superficie de energía definido por las diferentes conformaciones moleculares (8). Los resultados de las diferentes simulaciones presentan un panorama de la geometría más estable y las interacciones moleculares al aumentar el número de moléculas que conforman el agregado. Finalmente, se extrapola el comportamiento en un número mayor de partículas conformando el agregado, el cual eventualmente conllevará a la precipitación del colesterol.

1. MARCO TEÓRICO

Los lípidos corresponden a una clase de sustancia que abarca las grasas (lípidos sólidos) y los aceites (líquido). A nivel de los organismos, los lípidos incluyen las moléculas de triglicéridos, esteroides, fosfolípidos y ácidos grasos libres (2). El colesterol, miembro de la familia de los esteroides, es un componente esencial de las membranas biológicas –influye en la regulación de la fluidez y en la permeabilización de iones– y desempeña un papel importante en una variedad de procesos biológicos y bioquímicos –síntesis de hormonas y de otras moléculas importantes– (9). Estas funciones importantes del colesterol se deben a que en su estructura se encuentran presentes tanto zonas hidrofóbicas como hidrofílicas implicando fuerzas de dispersión y puentes de hidrógeno (10). La estructura molecular del colesterol es presentada en la Figura 1.

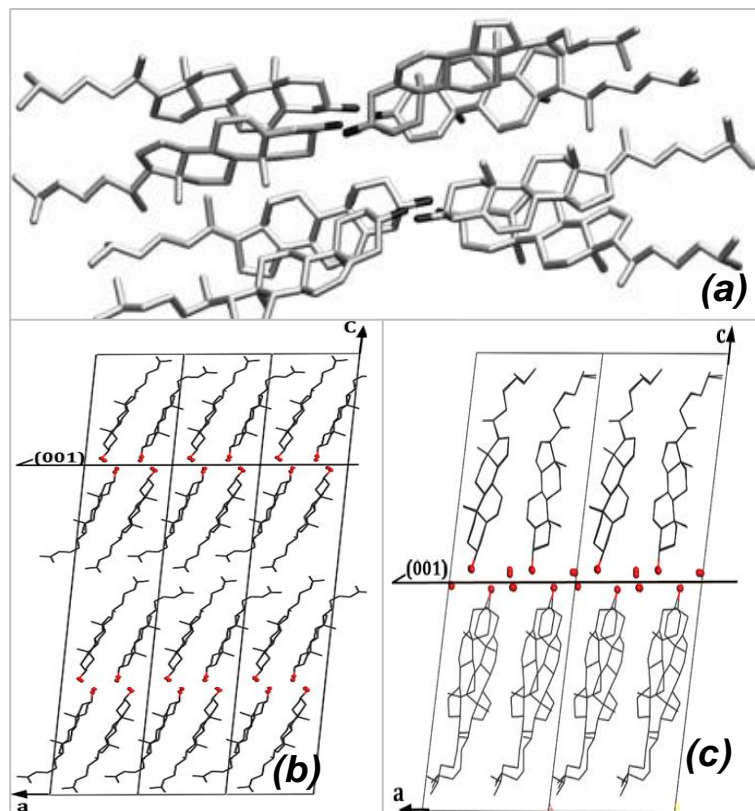
Figura 1. Estructura del colesterol. Bidimensional (izquierda) y tridimensional (derecha); oxígeno en color rojo.



La estructura molecular del colesterol influye también en las formas cristalinas de su estado sólido dependiendo del medio inicial de cristalización (11). Análisis de rayos X de la estructura cristalina del colesterol reportan la presencia de

apilamientos de bicapas en estructuras monoclinica y triclinica (12) estabilizadas por las fuerzas de dispersión entre los cuerpos de hidrocarburos y por arreglos de puentes de hidrógeno formados por el grupo hidroxilo (Figura 2). Estas mismas fuerzas rigen la agregación entre moléculas de colesterol en diversos medios (13) (2).

Figura 2. (a) Celda unitaria de la estructura cristalina del colesterol. (b) Representación de tres celdas de un cristal monoclinico de colesterol monohidratado; oxígenos en color rojo. (c) Representación de dos celdas unitarias de un cristal con estructura triclinica de colesterol monohidratado; oxígenos en color rojo.



Fuente: (a) Shieh HS et. al. Crystal structure of anhydrous cholesterol. Nature 1977. (b, c) Varsano Neta and et. al formation of 3D cholesterol crystals from 2D nucleation sites in lipid bilayer membranes: implications for atherosclerosis. J. Am. Chem. Soc. 2015.

En los mamíferos, la agregación de las moléculas de colesterol puede conllevar a riesgos en la salud (14). Esta agregación es promovida por la liberación³ de colesterol no esterificado desde las lipoproteínas LDL que –junto con las HDL– son las encargadas del transporte interno de lípidos y triglicéridos en la sangre (2). Las lipoproteínas LDL liberan colesterol debido a su interacción con las proteínas del tejido conectivo que conforman las paredes de las arterias⁴.

Aunque en realidad no se mida directamente la concentración de colesterol, es posible inferir su exceso en el torrente sanguíneo con la medición de las proteínas lipídicas; un aumento en la cantidad de lipoproteínas LDL significa un aumento de colesterol en la sangre⁴. El metabolismo del colesterol en el organismo puede ser analizado en la Figura 3 (15).

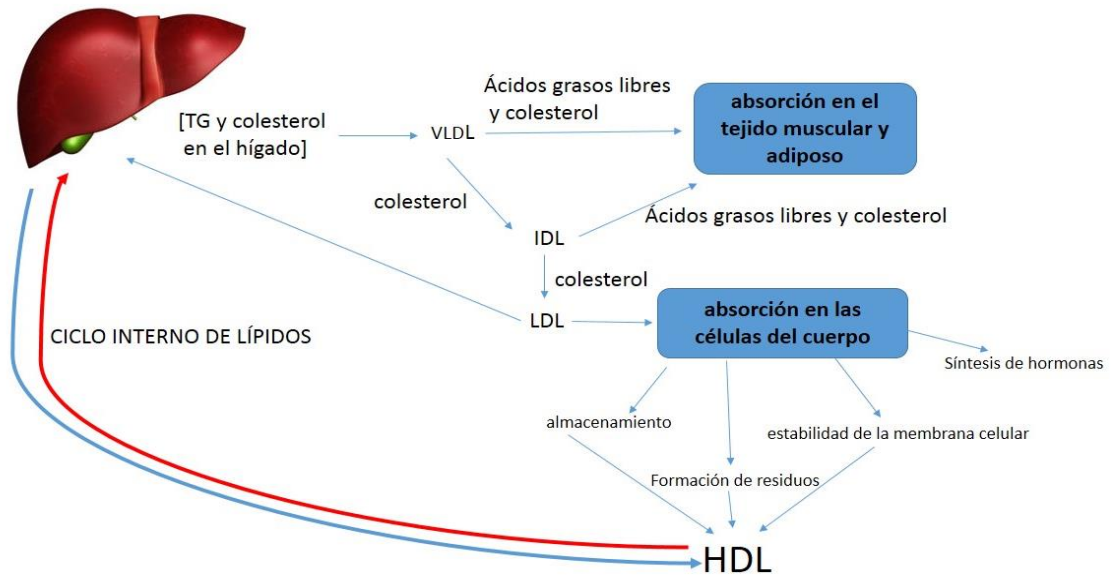
1.1.1 Campos de fuerza. La mecánica molecular considera a las moléculas como si fueran un conjunto de puntos en el espacio gobernados por una serie de potenciales clásicos denominados campos de fuerza. La energía total de una molécula se calcula como la suma de energías de los diferentes movimientos atómicos (16). En términos generales, la forma funcional básica de un campo de fuerza divide las energías en energías de enlace o covalentes, y de no enlace o no covalentes (fuerzas electrostáticas y de van der Waals), según la siguiente ecuación (17):

$$E_{TOTAL} = E_{Covalente} + E_{no\ covalente} \quad (Ec. 1)$$

³ Esta alteración recibe el nombre de dislipidemia que representa el aumento de las concentraciones lipídicas en la sangre.

⁴ Las proteínas lipídicas HDL tienen mayor afinidad por el colesterol, con lo cual pueden extraerlo del torrente sanguíneo y llevarlo al hígado para su posterior excreción principalmente como ácidos biliares. Debido a lo anterior, el colesterol asociado con las HDL se conoce como colesterol bueno, mientras que el asociado con las LDL se conoce como colesterol malo (15).

Figura 3. Ruta metabólica del colesterol.



Fuente: Casey G. Cholesterol: The Good, The Bad and The Ugly. Continuing Professional Development.2011

La energía covalente considera las fuerzas que dependen directamente de los enlaces químicos. Entre ellas encontramos las fuerzas de tensión, especificadas por una constante de fuerza del enlace; las fuerzas de flexión, relacionadas con el ángulo de enlace, y las fuerzas de torsión, relacionadas con el ángulo diedro. De otro lado, las energías no covalentes consideran las interacciones entre átomos no enlazados por medio de las fuerzas de van der Waals, especificadas por el potencial de Lennard-Jones, y las fuerzas electrostáticas, dadas por las interacciones tipo Coulomb.

Para sistemas analizados por simulación molecular con campos de fuerza, la energía calculada puede ser reportada en términos de la temperatura absoluta; para ello se utilizan la constante de Boltzman y el número de Avogadro. La energía

reportada en unidades de temperatura absoluta es denominada como temperatura equivalente; la conversión energética respectiva está dada por (18):

$$1 \frac{Kcal}{mol} = 503.23K \quad (Ec. 2)$$

1.1.2 Charmm27. CHARMM es el nombre de un conjunto de campos de fuerza ampliamente utilizados en mecánica molecular. El desarrollo y mantenimiento de CHARMM está a cargo de un grupo de investigadores y sus colaboradores en la universidad de Harvard (19-20). CHARMM27 fue creado en 1999, este campo de fuerza es utilizado para moléculas orgánicas complejas como ADN, ARN y lípidos, debido a que incluye funciones de energía empíricas para modelar sistemas macromoleculares. La ecuación 3 (21) de energía potencial de este campo se presenta a continuación (22-23); la Tabla 1 describe los términos de la energía potencial.

$$\begin{aligned}
 V = & \sum_{enlasantes} K_b(b - b_o)^2 + \sum_{angulos} K_\theta(\theta - \theta_o)^2 \\
 & + \sum_{diedros} K_\phi[1 + \cos(n\phi - \delta)] + \sum_{flexión} K_\omega(\omega - \omega_o)^2 + \sum_{Urey-Bradley} K_u(u - u_o)^2 \\
 & + \sum_{Lennard-Jones} \epsilon \left[\left(\frac{R_{minij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{minij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (Ec. 3)
 \end{aligned}$$

Tabla 1. Términos de la ecuación de energía potencial ecuación 3.

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
K_b	Constante de fuerza de enlace.	δ	Cambio de fase relacionado con el ángulo diedro.
$b - b_o$	Distancia desde la posición de equilibrio.	K_ω	Constante de fuerza relacionado con flexión de ángulo fuera del plano.
K_θ	Constante de fuerza de movimiento angular.	$\omega - \omega_o$	Distancia desde la posición de equilibrio del plano.
$\theta - \theta_o$	Distancia desde la posición de equilibrio angular.	K_u	Constante de fuerza relacionada con el componente de Urey-Bradley con flexión de Angulo.
K_ϕ	Constante de fuerza de ángulo diedro.	$u - u_o$	Distancia desde la posición de equilibrio en el potencial armónico.
n	Multiplicidad de la función.	ij	Interacciones no enlazaste.
ϕ	Ángulo diedro.	R_{minij}	Potencial de Lennard-Jones.

1.2 SIMULACIÓN DE MONTE CARLO

El método de Monte Carlo (MC) es una técnica cuantitativa que hace uso de los ordenadores para imitar, por medio de movimientos aleatorios, el comportamiento de sistemas reales no dinámicos; considerando el estudio conformacional, la simulación de Monte Carlo reporta un mejor desempeño que la simulación por dinámica molecular (24) La clave de la simulación MC consiste en crear un modelo matemático del sistema que se quiere analizar, identificando aquellas variables (inputs del modelo) cuyo comportamiento aleatorio determinan el comportamiento global del sistema. Una vez identificados dichos inputs o variables aleatorias (configuración molecular), se lleva a cabo un número grande de experimentos consistentes en generar valores aleatorios para dichos inputs, y determinar el comportamiento del sistema ante los valores establecidos (energía molecular); generalmente, el número de ensayos es dividido en dos: estabilización y

generación. El análisis del sistema será tanto más preciso cuanto mayor sea el número de experimentos efectuados (25).

Para el estudio de la agregación del colesterol, la simulación de Monte Carlo debe generar diferentes configuraciones moleculares, las cuales son el resultado del movimiento al azar de los átomos. Estas configuraciones son rechazadas o aceptadas de acuerdo a la respuesta del sistema obtenida por medio de su energía potencial (campo de fuerza)⁵. Las configuraciones se establecen considerando constante el número de partículas, el volumen y la temperatura del sistema, por lo cual las simulaciones se efectúan utilizando el denominado colectivo canónico (26). La simulación de Monte Carlo puede efectuarse utilizando códigos computacionales de uso libre, como el denominado paquete *Towhee* (8).

1.2.1. Towhee: Es un código libre originalmente diseñado para la predicción de equilibrio de fases fluidas utilizando campos de fuerza con especial atención en los algoritmos que abordan muestreo de la conformación molecular (8).

Este paquete requiere de otros que permitan la visualización molecular y la visualización de resultados numéricos (ver anexos). La ventaja adicional que ofrece a los investigadores es el ahorro de la creación de los algoritmos que son utilizado en el cálculo de las energías y optimización de geometrías –por ejemplo, en la simulación molecular de la agregación de asfáltenos (27)–. Para que *Towhee* sea ejecutado es necesario el uso de compiladores tales como *gcc* o *gcc-fortran* en el caso de un entorno Linux; esto se debe a que *Towhee* ha sido programado en fortran

⁵ Si se produce un descenso en energía potencial, la configuración es aceptada; sino, se compara el número Boltzmann, $\exp(-\Delta E/kT)$, con un número al azar entre 0 y 1, para aceptar la nueva configuración (11).

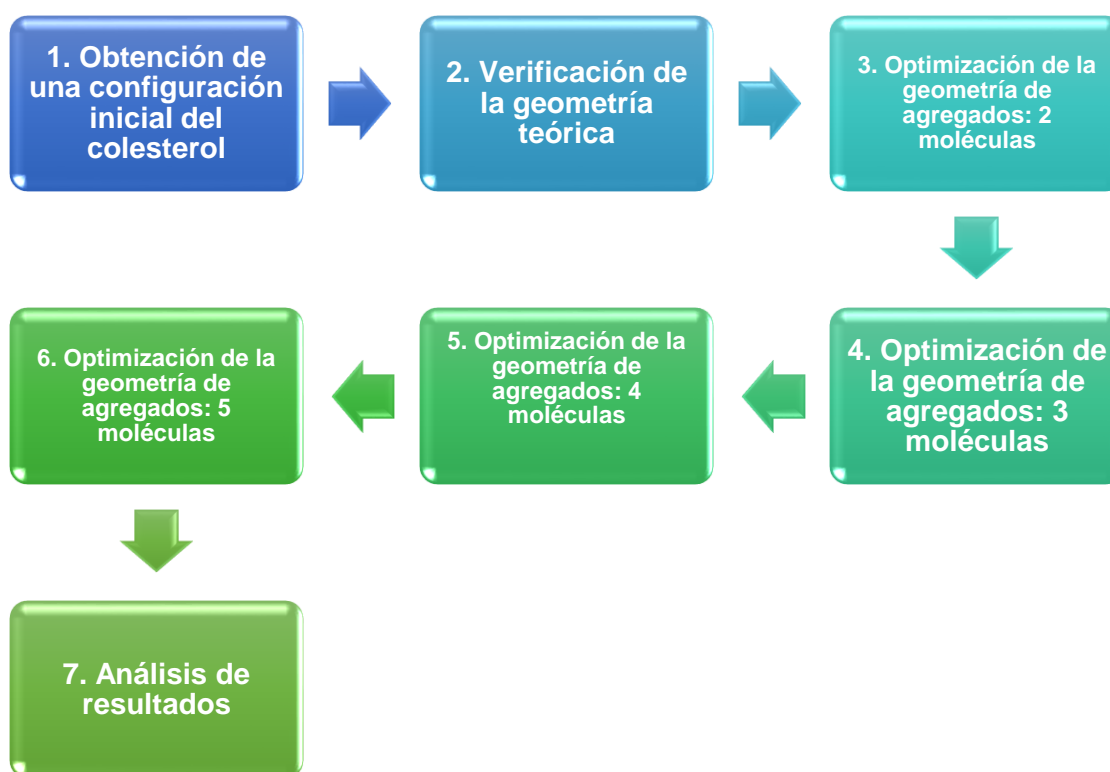
77 (8). Una vez definidas las variables de entrada, su ejecución se hace desde la consola (caso Linux), recordando ubicar la carpeta que posee los inputs relacionados con *Towhee*. Posteriormente, se ejecuta el siguiente comando:

```
towhee > "name_file_out"
```

2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

Las actividades seguidas para analizar la agregación de las moléculas de colesterol pueden ser representadas en la siguiente figura:

Figura 4. Descripción global de las etapas desarrolladas.



Las simulaciones de Monte Carlo fueron aplicadas considerando las energías de la etapa de estabilización, debido a recursos computacionales. Las geometrías resultantes para las conformaciones fueron tomadas de acuerdo con el valor global mínimo de energía según lo expuesto en la referencia (28).

2.1 OBTENCIÓN DE UNA CONFIGURACIÓN INICIAL DEL COLESTEROL:

En esta etapa se construye la molécula de colesterol teniendo en cuenta cada enlace presente en la molécula y numerando los respectivos átomos. Lo anterior se hace con el objetivo de adaptar el colesterol a la configuración del campo de fuerza (charmm27) y para cumplir con los requisitos de entrada especificados en *Towhee*. Para ejecutar *Towhee* es necesario especificar dos archivos de entrada, los cuales son:

- ***Towhee_input***: este archivo representa el soporte principal de la simulación y contiene las instrucciones necesarias para ejecutar el programa. En este archivo se pueden identificar tres zonas. En la primera parte se definen las condiciones de temperatura, presión, número de ciclos tipo y número de moléculas; asimismo se define el número de archivos de salida. En la segunda parte se especifican el campo de fuerza, el tamaño de la caja, el nombre de archivo *Towhee_initial* (*Towhe_coords*) y el número de átomos en cada molécula. En la tercera sección se define cada tipo de átomo de la molécula de acuerdo a los requerimientos del respectivo campo de fuerza (ver anexo).
- ***Towhee_coords***: en este archivo se encuentran las coordenadas iniciales para cada átomo en el mismo orden según la tercera sección del archivo *Towhee_input*.

Una vez especificados los archivos anteriores, se procede a ejecutar la simulación con el método de Monte Carlo, que considera la optimización geométrica de la molécula.

2.2. VERIFICACIÓN DE LA GEOMETRÍA TEÓRICA:

Posteriormente, con los resultados de distancias atómicas y ángulos entre 3 y 4 átomos obtenidos con la geometría optimizada de menor energía, se realiza una comparación con trabajos similares reportados en la literatura.

2.3. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE AGREGADOS: 2 MOLÉCULAS.

El procedimiento descrito en 2.2 es repetido, pero esta vez se especifican dos moléculas de colesterol. La posición relativa entre las dos moléculas no influye en los resultados debido a las características inherentes del método de Monte Carlo. Los resultados del agregado de menor energía son extraídos para análisis de su configuración interatómica y la posición relativa de las moléculas.

2.4. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE AGREGADOS: 3 MOLÉCULAS.

El procedimiento descrito en 2.2 es repetido especificando tres moléculas de colesterol. Los resultados del agregado de menor energía son extraídos para análisis y comparación con el agregado de dos moléculas.

2.5. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE AGREGADOS: 4 MOLÉCULAS.

El procedimiento descrito en 2.2 es repetido especificando 4 moléculas para el agregado. Los resultados geométricos que reportan la menor energía son extraídos para su análisis y comparación con los agregados de menor número de moléculas.

2.6. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE AGREGADOS: 5 MOLÉCULAS.

Los archivos respectivos de *Towhee* son modificados para considerar 5 moléculas en el agregado. Los resultados geométricos con menor energía son analizados y comparados con los agregados de menor tamaño.

2.7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Los resultados geométricos y energéticos de las simulaciones de Monte Carlo para los diferentes agregados son analizados en conjunto para inferir configuraciones en agregados de mayor tamaño.

3. RESULTADOS

La interacción molecular del colesterol fue analizada siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior, simulando las diferentes configuraciones en fase gaseosa.

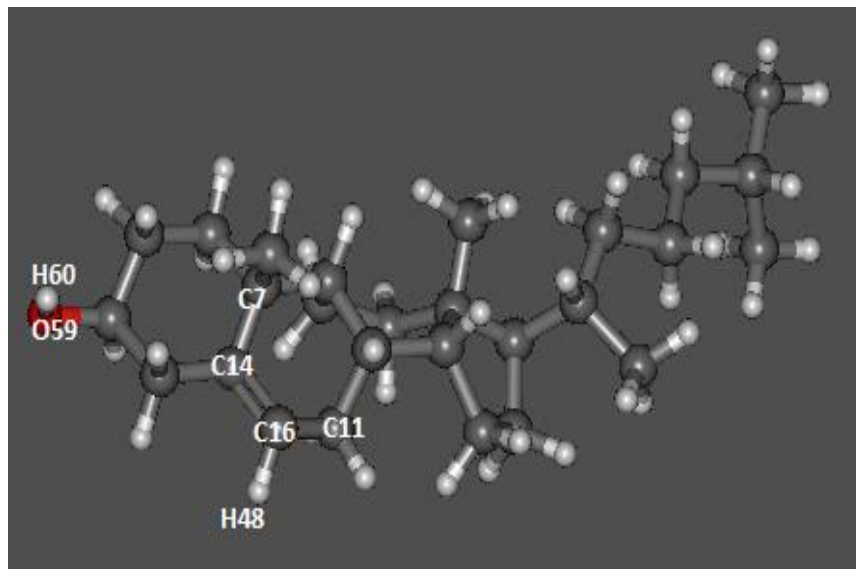
3.1. CONFIGURACIÓN INICIAL

Inicialmente, la configuración geométrica para una molécula de colesterol fue validada con el fin de verificar que la estructura conformacional más estable obtenida en el software *Towhee* corresponda con la reportada en la literatura. Para esto, cada átomo de la estructura fue especificado según el lenguaje del campo de fuerza CHARMM27; el archivo script con las instrucciones necesarias para la ejecución de la simulación en *Towhee* es mostrado en los anexos. Posteriormente, la estructura con menor energía es visualizada para proceder con la verificación de la geometría.

3.2. VERIFICACIÓN TEÓRICA DE LA GEOMETRÍA

Aunque *Towhee* no permita una visualización directa de la estructura resultante si genera archivos en formato “pdb”, para ser visualizados en otro software como *Gabedit* o *vmd*. Por medio de los anteriores paquetes son posibles la visualización y el análisis de la estructura geométrica de los agregados de mayor estabilidad obtenidos por medio de la simulación de Monte Carlo.

Figura 5. Conformación en 3D para la estructura energética de menor energía obtenida con las simulaciones realizadas en Towhee.



Towhee calcula la energía de cada configuración y las reporta en *name_file_out*, permitiendo así discernir cual es la configuración más probable⁶ para las condiciones de simulación.

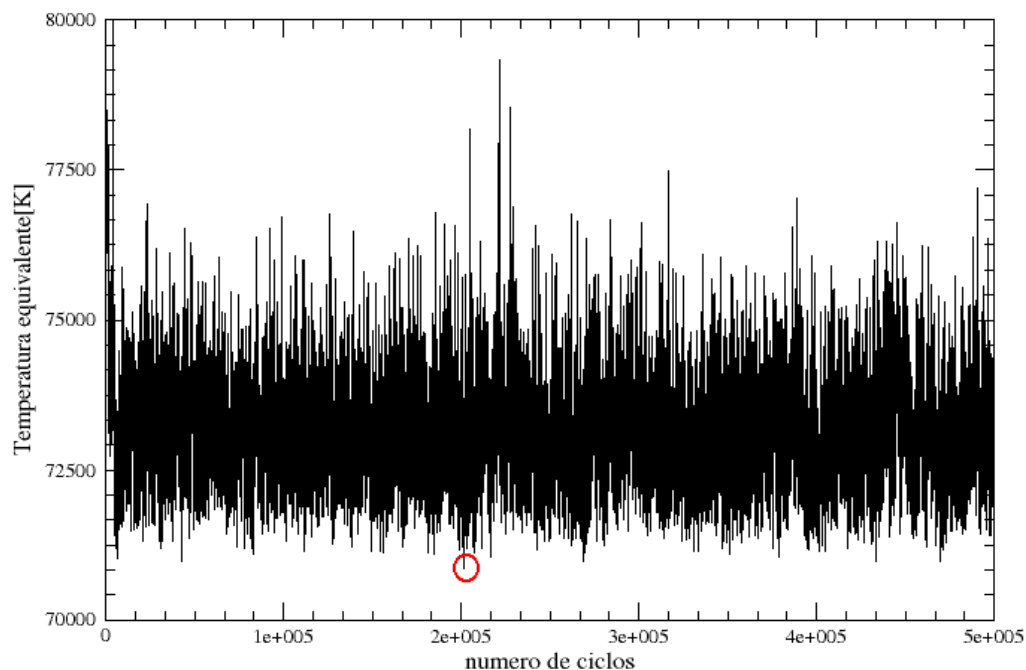
Como se aprecia en la Figura 6 la energía a lo largo de la simulación cambia a medida que se avanza en el muestreo con Monte Carlo⁷. El mínimo obtenido por la simulación en la etapa de estabilización corresponde a (Figura 6):

$$E_{TOTAL1} = E_{T1} = 7.0876 * 10^4 K = 140.83 \frac{Kcal}{mol}$$

⁶ Se toma la energía mínima global como criterio de selección para la configuración más estable en la etapa de estabilización.

⁷ En la figura 6 se aprecia la etapa de estabilización. La estructura denominada por *Towhee* como *box_01_step_0000000201412.pdb* fue tomada como el mínimo global.

Figura 6. Perfil de energía obtenido por la simulación (construida en XMGRACE). Etapa de estabilización; mínimo global en rojo.



Este valor, E_{T1} , corresponde a la energía de la configuración más estable para una molécula de colesterol, según el campo de fuerza CHARMM27. Los datos geométricos para la configuración de estabilización son mostrados en las Tablas 2 y 3. La longitud para el enlace doble entre los átomos C14-C16 resulta particularmente grande respecto a lo esperado y a lo reportado por mediciones de rayos X y por cálculos moleculares con CHARMM36 (Tabla 2). Lo anterior puede deberse a errores en los parámetros para CHARMM27 codificado en *Towhee*. No obstante, en esta medición los resultados geométricos y energéticos representan en gran medida los valores reportados en la literatura (Tabla 2).

Tabla 2. Distancia de algunos enlaces presentes en la molécula.

ENLACES	RESULTADOS				
	TOWHEE	J. OF COMP. CHEM. 2005 May; 26(13): P. 1383- 1399 CHARMM36	Acta Cryst. 1981 Enero; B(37): P. 1538-1543 RAYOS X	ERROR (%)	
	b_0 [Å]	b_0 [Å]	b_0 [Å]	CHARMM36	RAYOS X
C7-C14	1.50	1.50	1.52	0.13	1.33
C14-C16	1.49	1.34	1.33	11.11	11.01
C14-C18	1.59	1.50	1.51	5.67	4.60
C16-C11	1.53	1.50	1.49	2.26	2.28
C16-H48	1.13	1.10	-----	2.81	-----
O59-H60	0.97	0.69	-----	40.14	-----

También, la diferencia en los valores para el enlace O59-H60 en la presente investigación y los datos reportados en la literatura (21) (Tabla 2) se debe a un posible error tipográfico en el artículo de referencia, debido a que la distancia O-H en los alcoholes tales como metanol (30), propanol (31) y ciclohexanol (32), entre otros, presentan un valor promedio de 0.965 Å (33). Las diferencias en las otras medidas se encuentran dentro del margen de error esperado.

Tabla 3. Angulo reportado para algunos enlaces.

ENLACES	RESULTADOS	
	SIMULACIÓN	CAMPO DE FUERZA PARA ESTEROLES BIOLÓGICAMENTE IMPORTANTES: MECÁNICA MOLECULAR (21)
		$\theta_0[deg]$
C18-C14-C7	114.5	116.0
C21-C18-C14	103.4	111.0

Una verificación adicional para la geometría de la configuración más estable fue obtenida por medio del cálculo de las frecuencias vibracionales al nivel AM1 (método cuántico semiempírico) según el software Gaussian03. De acuerdo a los resultados de la Tabla 4, las frecuencias vibracionales son positivas, lo cual sugiere que la configuración obtenida para el colesterol corresponde a una estructura estable.

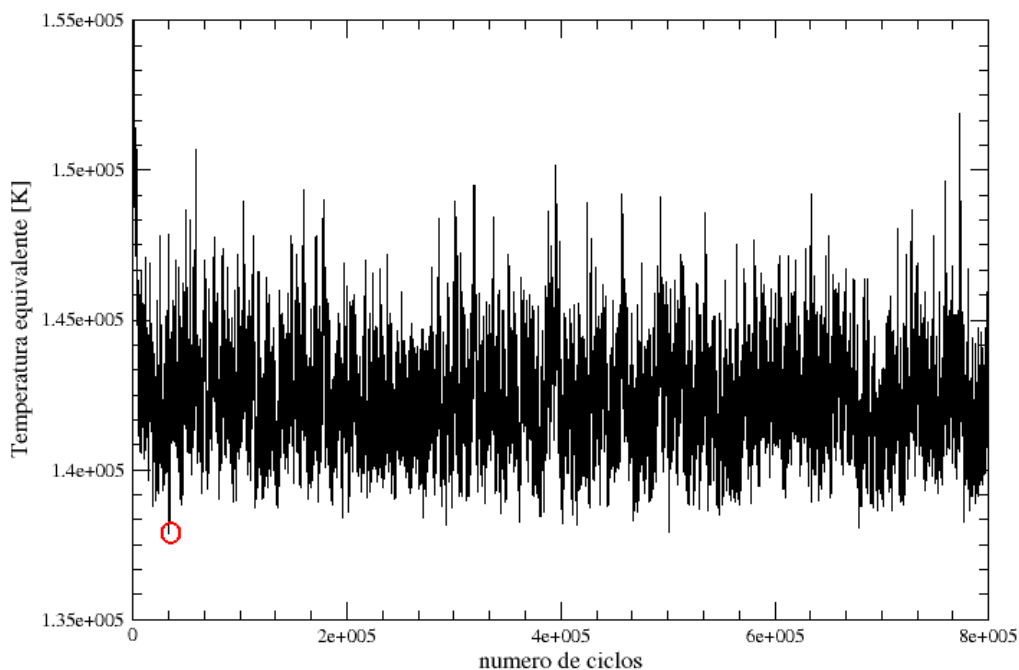
Tabla 4. Frecuencias vibracionales de menor valor para la configuración más estable del colesterol. Cálculo realizado al nivel AM1 utilizando el software Gaussian03.

No	1	2	3	4	5
Frecuencia, cm^{-1}	11.98	15.22	27.55	32.14	45.71

3.3. OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA DE AGREGADOS: DOS MOLÉCULAS

La verificación de la geometría del colesterol obtenida con la simulación en *Towhee* habilita el análisis geométrico de los agregados de esta molécula.

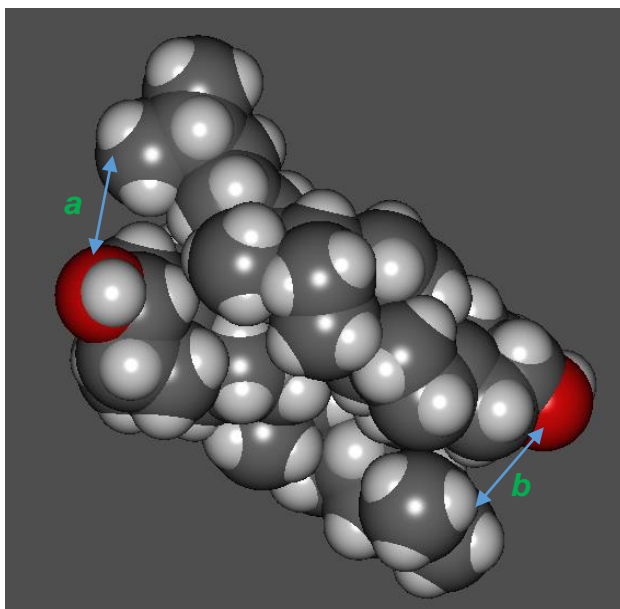
Figura 7. Perfil energético para la simulación de dos agregados (construida en xmgrace a partir de los datos obtenido en Towhee); etapa de estabilización con el mínimo global marcado en rojo.



De acuerdo a los resultados para el agregado de dos moléculas (Figura 8), la estructura obtenida en la etapa de estabilización corresponde a una orientación casi-paralela entre las moléculas de colesterol con orientación opuesta entre los grupos hidroxilo (cabeza-cola), según lo ilustrado en la Figura 8. En la Tabla 5, se presentan las distancias entre las respectivas cabezas y colas.

En la literatura se reporta que la estructura cristalina de los esteroides con el grupo hidroxilo y sus hidratos muestra una organización en capas con orientación de tipo cabeza-cabeza o cabeza-cola dependiendo del solvente en el cual se realizó la cristalización⁸ (10-11); esta orientación puede presentarse desde la aparición de los agregados en fase líquida (10). Cualquiera de las dos arquitecturas concuerda en que las fuerzas de cohesión mayoritarias entre las moléculas de colesterol corresponden a las interacciones entre átomos no polares (van der Waals) debido al tamaño de las cadenas hidrofóbicas (34).

Figura 8. Configuración estructural más estable para dos colesteroles a y b marcan las distancias interatómicas (ver tabla 4).



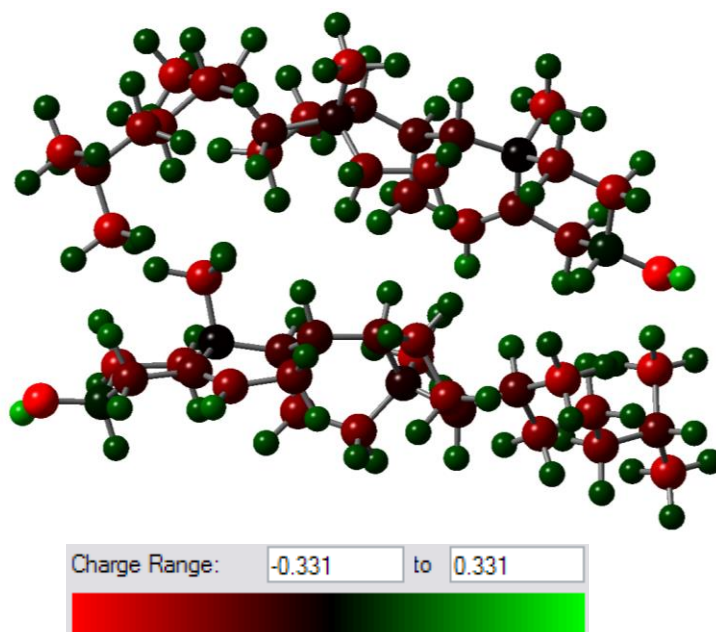
Lo anterior puede ser comprobado por medio del cálculo de las cargas de los átomos en las moléculas (cargas de Mulliken) al nivel AM1 utilizando Gaussian03. La Figura 9 presenta el agregado de 2 moléculas de colesterol con los átomos

⁸ Según la base de datos estructural de Cambridge, la arquitectura cabeza-cola se presenta en los cocrisales denominados MEQKAU y WOMHAI.

coloreados de acuerdo con su valor de carga (cargas mayores corresponden a colores más claros); según esta figura, la interacción tipo Coulomb es apreciable a nivel intramolecular *–i.e.* atracción oxígeno-hidrógeno en cada molécula–, con lo cual, la fuerza de atracción principal que mantiene la configuración del en este agregado corresponde a las de tipo van der Waals.

La organización resultante de la simulación molecular de 2 moléculas de colesterol concuerda con la arquitectura cabeza-cola enunciada anteriormente (Figuras 8 y 9), la cual es reportada como la principal arquitectura mostrada en los cristales de colesterol obtenido en propanol, butano, pentanol y fenol (11).

Figura 9. átomos coloreados según sus respectivas cargas de Mulliken calculadas al nivel AM1 utilizando Gaussian03



Asimismo, la arquitectura del agregado de dos moléculas en fase gaseosa obtenidos en el presente trabajo concuerda con los resultados de la simulación por

dinámica molecular reportados por Cromie y colaboradores (35); infortunadamente, este último trabajo no reporta mediciones cuantitativas para realizar comparaciones geométricas de dos agregados.

Tabla 5. Distancia intermolecular medida en los átomos aparentemente más cercanos.

Átomos relacionados	Distancia	
	Ver en figura 8 como:	Å
O [59] – C [101]	a	5.23
O [133] – C [27]	b	6.38

De otro lado, la energía del agregado más estable reportada por *Towhee* corresponde a:

$$E_{TOTAL2} = E_{T2} = 1.3787 * 10^5 K = 273.98 \frac{Kcal}{mol}$$

Utilizando la energía calculada para la configuración más estable del colesterol (*vide supra*) es posible tener un estimado de la energía de interacción entre las moléculas en dos agregados. La energía de interacción es estimada en:

$$E_{INT_2} = E_{T2} - 2 * E_{T1} = -7.67 \frac{Kcal}{mol}$$

El valor negativo indica que este agregado es formado debido a una interacción favorable –atracción– entre las moléculas de colesterol, lo cual reduce la energía del agregado. La verificación de la estabilidad del agregado es obtenida por el cálculo de las frecuencias vibracionales al nivel AM1 utilizando *Gaussian03* (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias vibracionales de menor valor para la configuración más estable para 2 mol de colesterol. Cálculo realizado al nivel AM1 utilizando el software Gaussian03.

No	1	2	3	4	5
Frecuencia, cm^{-1}	8.56	12.58	13.97	17.39	19.29

3.4 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA DE AGREGADOS: TRES MOLÉCULAS

En la Figura 10 se pueden analizar los resultados obtenidos en la simulación de agregados con tres moléculas de colesterol, mientras que en la Figura 11 se presenta el perfil de conformación en la primera etapa de MC.

Figura 10. Configuración de menor energía para tres moléculas de colesterol.

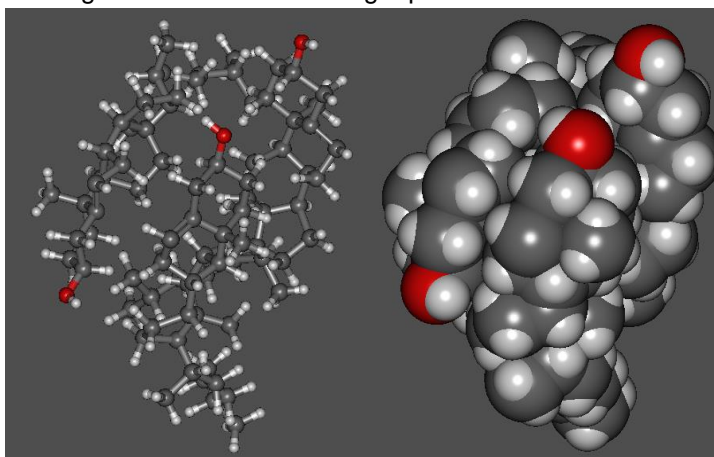
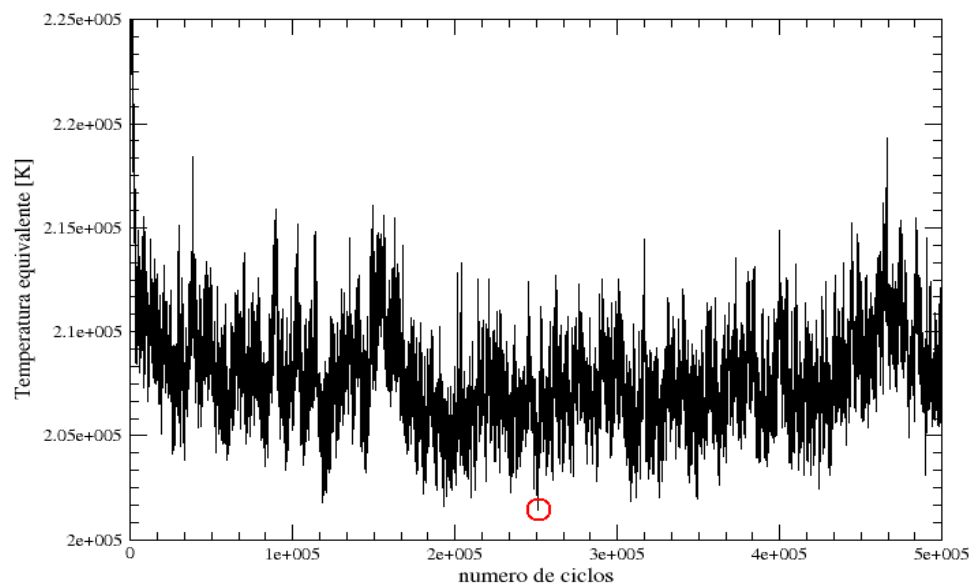


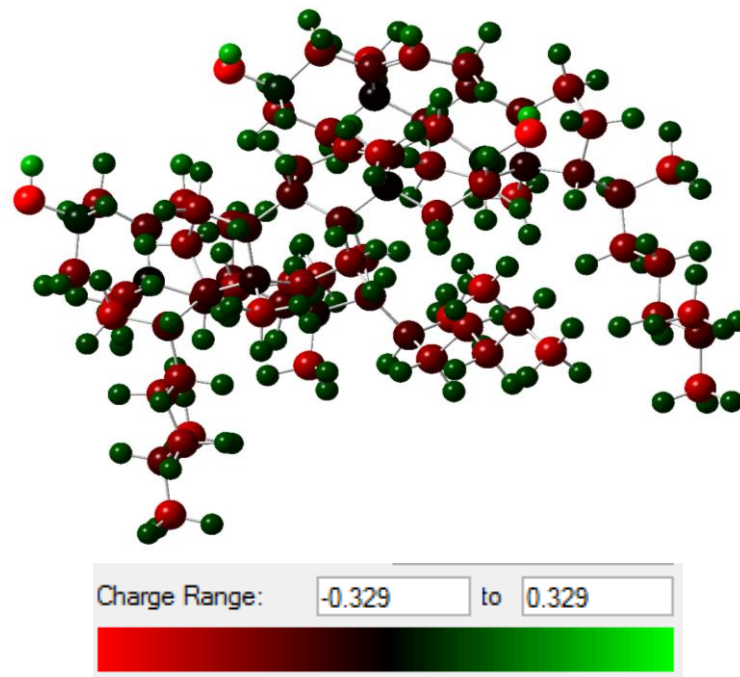
Figura 11. Perfil energético para la simulación de agregados con tres moléculas de colesterol; etapa de estabilización con el mínimo global encerrado en rojo.



Al realizar una comparación entre las estructuras obtenidas para dos y tres agregados (Figuras 8 y 10) es posible inferir que dos moléculas de colesterol presentan la arquitectura cabeza-cabeza, mientras que la tercera se orienta sobre el plano de las otras dos permitiendo una mayor interacción entre las correspondientes partes hidrofóbicas.

Al igual que en el agregado de 2, en de 3 moléculas la interacción puente de hidrógeno es débil y la cohesión molecular se debe principalmente a las demás interacciones tipo van der Waals (la distancia entre los oxígenos –Tabla 7– evidencia una interacción puente de hidrógeno muy débil (36). La Figura 12 ilustra las cargas de Mulliken calculadas al nivel AM1.

Figura 12. Cargas de Mulliken para tres moléculas; cargas al nivel AM1 utilizando Gaussian03.



Diversas formas cristalinas del colesterol conteniendo la estructura cabeza-cabeza han sido reportadas (11;14); la forma triclinica del colesterol presenta 8 moléculas en interacción cabeza-cabeza formando bicapas (34). Según lo anterior, la simulación para tres, moléculas reporta la tendencia del agregado hacia el ordenamiento reportado para los cristales de colesterol. De la misma forma se presenta el valor de la energía correspondiente al mínimo obtenido (Figura 11)

$$E_{TOTAL3} = E_{T3} = 2.0144 * 10^5 K = 400.29 \frac{Kcal}{mol}$$

La energía de interacción entre las moléculas en el agregado de tres moléculas puede ser estimada a partir del valor energético obtenido para la molécula de colesterol, según:

$$E_{INT_3} = E_{T3} - 3 * E_{T1} = -22.18 \frac{Kcal}{mol}$$

Con lo cual se tiene una interacción favorable –atracción– en este agregado. La verificación de la estabilidad del agregado es obtenida por el cálculo de las frecuencias vibracionales al nivel AM1 utilizando *Gaussian03* (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias vibracionales de menor valor para la configuración más estable del tercer agregado de colesterol. Cálculo realizado al nivel AM1 utilizando el software Gaussian03.

No	1	2	3	4	5
Frecuencia, cm ⁻¹	9.83	10.64	11.51	13.96	17.60

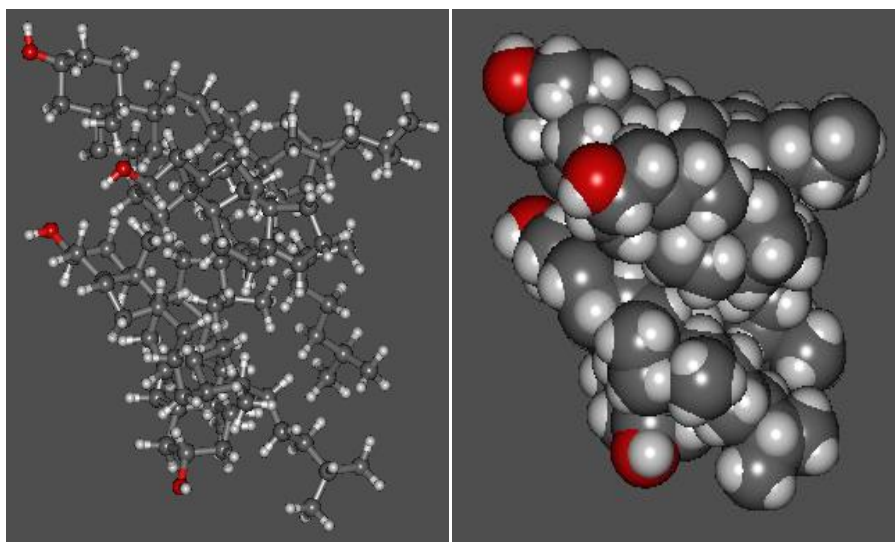
Tabla 8. Distancia entre algunos átomos cercanos entre 3 moléculas.

Átomos relacionados	Distancia [Å]
O [59] – O [133]	5.86
O [207] – C [84]	3.89
H [134]-H [186]	3.27
H [127]-H [180]	4.47
H [110]-H [71]	5.97

3.5 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA DE AGREGADOS: CUATRO MOLÉCULAS

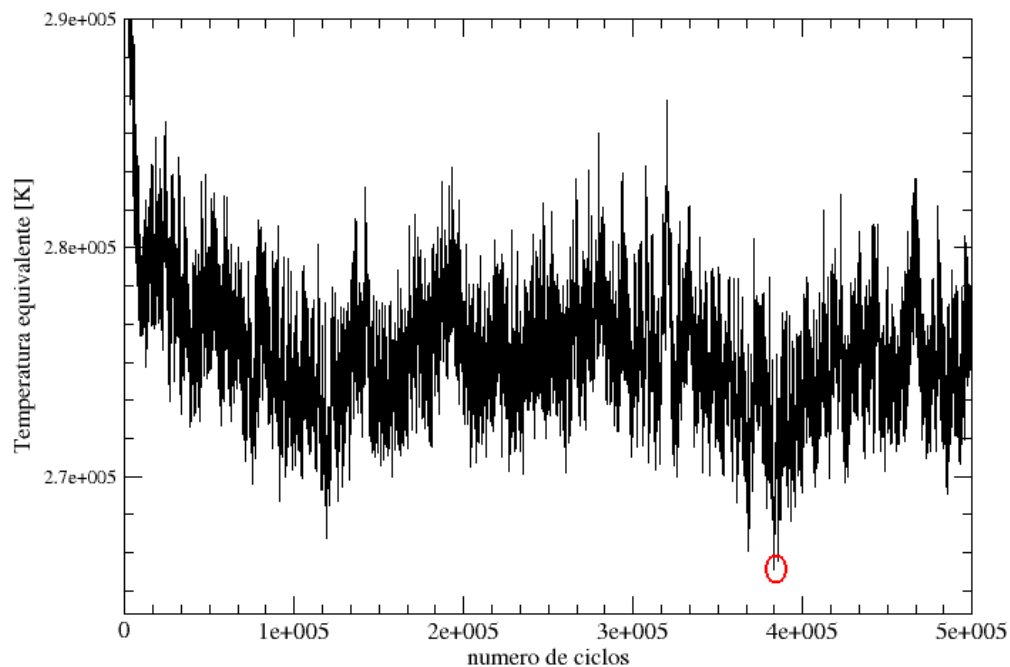
La configuración que se muestra en la Figura 13 corresponde a la estructura más estable para el agregado de 4 moléculas.

Figura 13. Conformación estructural más estable para agregados de 4 moléculas visualizado en Gabedit 2.4.8.



El número total de conformaciones optimizadas en la simulación fue de 500 mil (Figura 14); la Figura 14 presenta el perfil energético para la simulación. Según la estructura más estable, tres moléculas de colesterol presentan una orientación cabeza-cabeza con una tendencia de organización en bicapas (Figura 10), en donde los respectivos planos de dos moléculas de colesterol se alinean casi paralelamente una respecto de la otra. La tercera molécula se ubica a una distancia mayor con una orientación cabeza-cabeza (bicapa), mientras que la cuarta molécula de colesterol se alinea de forma diagonal.

Figura 14. Perfil energético para la simulación de agregados de 4 moléculas de colesterol.



La orientación de la cuarta molécula resulta ser casi perpendicular a la bicapa y a la tercera molécula *–i.e.* el O de la cuarta molécula se ubica casi perpendicular a los O de las otras tres moléculas—. En comparación con el tercer agregado (Figura 10), el cuarto parece formarse por interposición de la nueva molécula entre el segundo agregado con orientación cabeza-cabeza y la tercera molécula (Figuras 8 y 10); en la formación del 4 agregado, aumenta la distancia entre el tercer colesterol y la bicapa para dar paso a la cuarta molécula de colesterol que se posa casi paralela a la bicapa (Figura 15) de esta forma aumenta el área de contacto entre las partes hidrocarbonadas de las moléculas de colesterol⁹.

⁹ Las cargas de Mulliken no fueron obtenidas debido a la exigencia en los recursos computacionales.

De otro lado, debido a la orientación obtenida para el presente agregado, la menor distancia entre las diferentes moléculas se calcula a partir de la parte central hidrocarbonada (Tabla 9).

Tabla 9. Distancia entre algunos átomos cercanos en las distintas moléculas.

Átomos relacionados	Distancia [Å]
O [207] – O [59]	7.20
O [207] – O [133]	9.65
O [59]-O [133]	10.09
O [59] O [281]	11.29
H [125]-H [198]	3.77
C [91]-C [165]	3.81
C [242]-C [158]	4.49
C [9]-C [228]	4.45

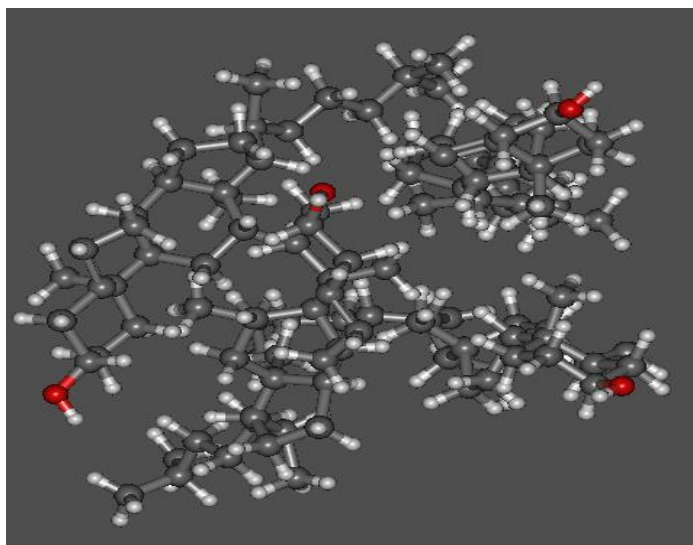
Los resultados de la simulación del agregado de 4 moléculas tienden hacia una organización en bicapas con orientación cabeza-cabeza (10-11) Sin embargo, el número de moléculas resulta insuficiente para presentar una formación completa en bicapas, la cual se aprecia para un número de 8 moléculas de colesterol (10) (Figura 2.). Puede que la formación en bicapa se presenta en el cuarto agregado, por lo cual se recomienda ejecutar la simulación considerando un mayor número de configuraciones¹⁰.

¹⁰ La simulación fue ejecutada utilizando un computador Toshiba L655 procesador Intel Pentium. Debido a las características de hardware, *Towhee* habilitó el análisis solo para 50000 configuraciones en la etapa de estabilización.

La energía mínima reportada para el cuarto agregado más estable corresponde a:

$$E_{TOTAL4} = E_{T4} = 2.8347 * 10^5 K = 528.44 \frac{Kcal}{mol}$$

Figura 15. Interposición de la nueva molécula (parte baja).



Con lo cual, la energía de interacción entre las moléculas de colesterol para el agregado de 4 moléculas corresponde a:

$$E_{INT_4} = E_{T4} - 4 * E_{T1} = -34.87 \frac{Kcal}{mol}$$

Con lo cual se tiene una interacción favorable –atracción– en el agregado de cuatro moléculas. La estabilidad del agregado es comprobada por el cálculo de las

frecuencias vibracionales (Tabla 10). De otro lado, según las distancias mostradas en la Tabla 9, la interacción favorable entre las moléculas de colesterol no involucra una contribución apreciable de los puentes de hidrógeno.

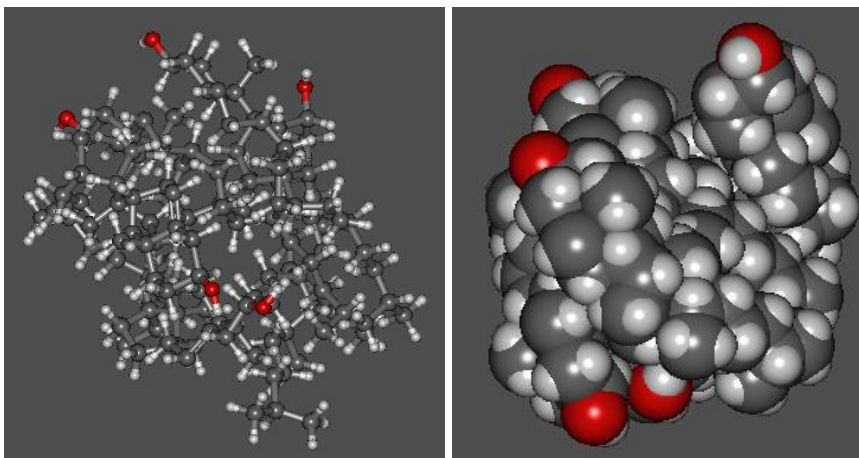
Tabla 10. Frecuencias vibracionales de menor valor para la configuración más estable para 4 moléculas de colesterol. Cálculo realizado con el campo de fuerza UFF utilizando el software gaussian03

No	1	2	3	4	5
Frecuencia, cm^{-1}	10.72	12.25	19.51	20.86	24.16

3.6 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA DE AGREGADOS: CINCO MOLÉCULAS

Los resultados de la simulación MC para el agregado de 5 moléculas de colesterol pueden ser analizados en las Figuras 16 y 17. Según la configuración del agregado, la tendencia de una menor distancia en la parte central se mantiene también para este agregado; la tabla 11 presenta las distancias para la parte central del agregado.

Figura 16. Conformación estructural más estable para agregados de 5 moléculas visualizado en Gabedit 2.4.8.



Este comportamiento en el agregado se debe al aumento del área hidrocarbonada habilitada para las interacciones de tipo van der Waals. Es importante mencionar que en este agregado la distancia entre los oxígenos con etiquetas 355 y 207 involucra un aporte del respectivo puente de hidrógeno a la energía de interacción (Tabla 11).

Tabla 11. Distancia entre algunos átomos cercanos en las distintas moléculas.

Átomos relacionados	Distancia [Å]
O [59] – O [281]	10.36
O [355] – O [207]	3.66
O [133]-O [281]	12.78
O [59] O [133]	9.75
H [111]-H [330]	2.38
H [330]-H [120]	3.19
H [120]-H [331]	4.22
C [8]- C [83]	3.82
C [87] -C [22]	3.69
C [95] – C [304]	4.12
C [21] -C [323]	4.20

El agregado de 5 moléculas muestra una orientación cabeza-cabeza en grupos de a dos moléculas, lo cual coincide con los reportes de literatura de cristales organizados en bicapas. De acuerdo a los resultados del tercer, cuarto y quinto agregado, la adición de nuevas moléculas tiende a realizarse por orientación cabeza-cabeza habilitando la formación de puentes de hidrógeno débiles y mayor área de contacto entre zonas hidrofóbicas.

Por último, la energía estimada para el quinto agregado según la Figura 17 corresponde a:

$$E_{TOTAL5} = E_{T5} = 3.2701 * 10^5 K = 649.83 \frac{Kcal}{mol}$$

Con lo cual, la energía de interacción entre las moléculas de colesterol para la formación del agregado pentamérico corresponde a:

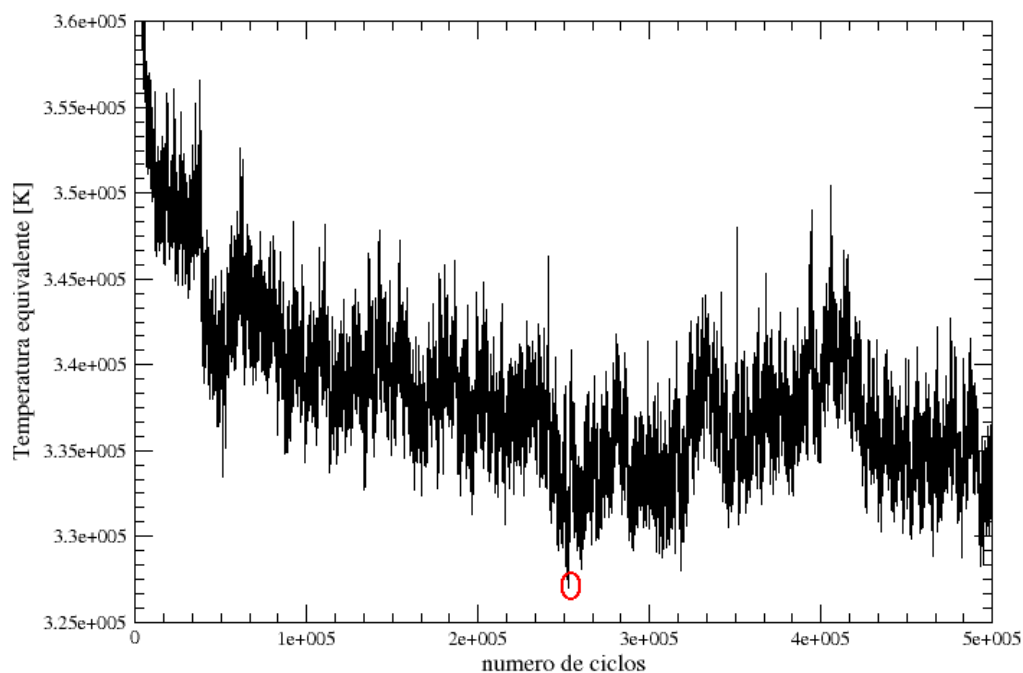
$$E_{INT_5} = E_{T5} - 5 * E_{T1} = -54.30 \frac{Kcal}{mol}$$

La estabilidad del agregado es obtenida por el cálculo de las frecuencias vibracionales (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias vibracionales de menor valor para la configuración más estable 5 mol de colesterol. Cálculo realizado con el campo de fuerza UFF utilizando el software Gaussian03.

No	1	2	3	4	5
Frecuencia, cm ⁻¹	10.72	12.25	19.51	20.86	24.16

Figura 17. Perfil energético para la simulación de agregados de 5 moléculas de colesterol; etapa de estabilización.



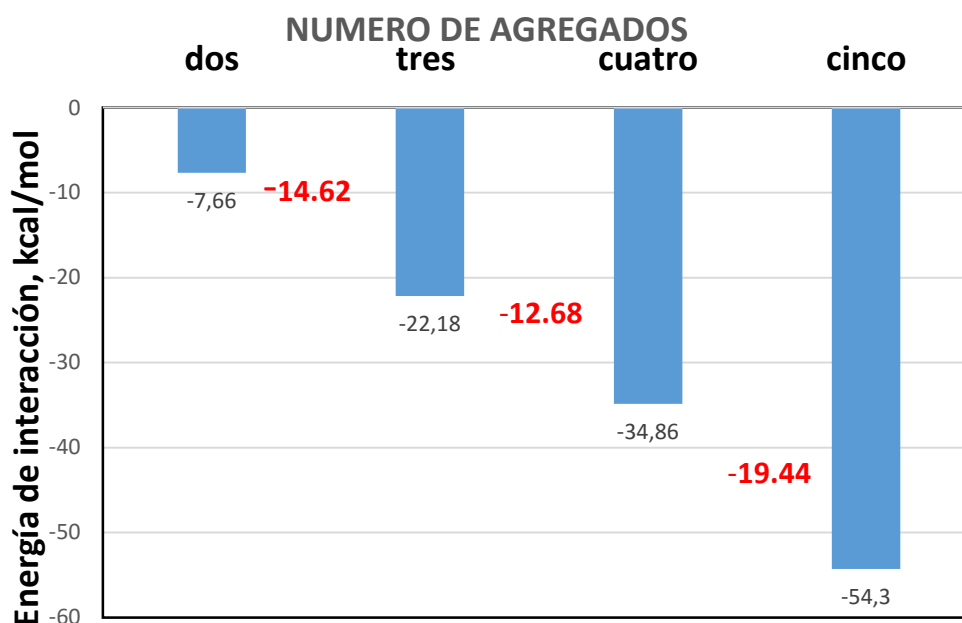
3.7 DISCUSIÓN FINAL

Teniendo presente las condiciones simuladas es posible afirmar que a medida que aumenta el número de moléculas de esterol en el agregado, las distancias en la parte central del agregado tienden a disminuir, reflejando la acción predominante de una fuerza o interacciones de Van der Waals debida a las cadenas hidrofóbicas.

No obstante, las demás interacciones no dejan de ser menos importantes, ya que en estas puede estar la explicación a los diversos comportamientos del colesterol. De acuerdo a los resultados se observó una tendencia a disminuir las distancias entre los oxígenos en agregados de tamaño apreciable, lo cual favorece las interacciones tipo puente de hidrogeno. Es de esperar que la contribución debida a esta interacción se presente decisiva para la estabilidad en la estructura cristalina

de los precipitados del colesterol (29) y en sus agregados con proteínas, lípidos y otros compuestos presentes en la sangre (14;37).

Figura 18. Variación de la energía de interacción en los agregados de colesterol en fase gaseosa.



De otro lado, las conformaciones y las energías obtenidas en el presente trabajo para los diferentes agregados muestran una concordancia con las tendencias reportadas en la literatura (29-35). El aumento en el número de moléculas en el agregado genera un aumento no lineal en la energía de interacción favorable *-i.e.* de dos a tres -14.62 kcal/mol, de tres a cuatro -12.68 kcal/mol, de cuatro a cinco -19.44 kcal/mol- con una contribución creciente del puente de hidrógeno (Figura 18). Para agregados de mayor tamaño, es posible deducir que el orden de bicapas en estructuras monoclinica y triclinica se presente por una combinación entre las interacciones de van der Waals y las interacciones tipo Coulomb.

4. CONCLUSIONES

Los valores geométricos para el colesterol obtenidos utilizando CHARMM27 según lo codificado en *Towhee* concuerdan con los reportados por mediciones de rayos X y por cálculos reportados utilizando CHARMM36.

La organización del agregado de dos moléculas de colesterol obtenida en el presente trabajo concuerda con la arquitectura cabeza-cola reportada para los cristales purificados a partir de alcoholes. Para los agregados con número mayor de 2 moléculas de colesterol, la arquitectura predominante corresponde a la de tipo cabeza-cabeza reportada para diversos cristales con estructura de bicapa en celdas monoclinica y triclinica.

La interacción tipo van der Waals presenta la mayor contribución en la formación de agregados de hasta 5 moléculas de colesterol. La contribución puente de hidrógeno aumenta con el número de agregados, presentando una interacción despreciable hasta el agregado de cuatro moléculas.

5. RECOMENDACIONES

Después del desarrollo de este trabajo se plantean las siguientes recomendaciones:

- ❖ El uso de recursos informáticos tales como software de simulación implica un costo en tiempo y espacio de almacenamiento por tal razón se recomienda utilizar equipos de mayor capacidad tanto de almacenamiento como de procesamiento.

- ❖ Para posteriores estudios similares se recomienda el uso de solventes –como fosfolípidos, triglicéridos y agua–, que permitan observar el desarrollo de nuevas interacciones.

- ❖ Asimismo, la inclusión de un mayor número de moléculas en el agregado es recomendable para la comparación directa con la estructura cristalina.

6. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. QUIMICA Y ALGO MAS. QUIMICA Y ALGO MAS. [Online].; 2014. Available from: <http://www.quimicayalomas.com/salud/colesterol-importancia-y-funciones/>.
2. Casey G. Cholesterol: the good, the bad and the ugly. continuing professional development. 2011;; p. 24-31.
3. Shaw PDW. Cholesterol Deficiency: A Major Factor in Many Chronic Disorders. Lenexa, USA: The Great Plains , Laboratory inc.; 2015.
4. Ziblat R, Leiserowitz L, Addadi L. Crystalline domain structure and cholesterol crystal nucleation in single hydrated DPPC: Cholesterol: POPC bilayers. Journal American chemical. 2010 Mayo; 132: p. 9920-9927.
5. Lafont S, Rapaport H, Somjem GJ, Renault A, howes PB, Kjaer K, et al. Monitoring the Nucleation of Crystalline Films of Cholesterol on Water and in the Presence of Phospholipid. Journal of physical chemistry. 1998 enero; 102(5).
6. Lim B, Rogaski B, Klauda JB. Update of the Cholesterol Force Field Parameters in CHARMM. the journal of physical chemistry. 2011 Diciembre 03; B(116): p. 203-210.
7. Marcus G. M. MCCCSTowhee (charmm27). [Online].; 2014 [cited 2016 01 02. Available from: <http://towhee.sourceforge.net/forcefields/charmm27.html>.
8. Marcus G. Martin. MCCCSTowhee. [Online].; 2014 [cited 2015 10 11. Available from: <http://towhee.sourceforge.net/>.

9. ULLMANN G, SMITH JC, COURNIA Z. A molecular mechanics force field for biologically important sterols. *journal of computational chemistry*. 2005;; p. 1383-1401.
10. Shieh HS, Hoard LG, Nordman CE. crystal structure of anhydrous cholesterol. *Nature*. 1977 mayo; 267: p. 287-289.
11. Galloway RJ, Raza SA, Young RD, Oswald IDH. Tracking the structural changes in series of cholesterol solvates. *Cryst. Growth Des.* 2012; 12: p. 231-239.
12. Varsano N, Fargion I, Wolf SG, Leiserowitz L, Addadi L. Formation of 3D Cholesterol Crystals from 2D Nucleation Sites in Lipid Bilayer Membranes: Implications for Atherosclerosis. *J. Am. Chem. Soc.* 2015; 137: p. 1601-1607.
13. Vattulainen I, Tomasz R. Lipid Simulations: A erspective on lipids in action. *cold spring harbor perspectives in biology*. 2014 september 11;; p. 1-14.
14. Sarig S, Utian WH, Sheean LA, Gorodeski GI. Distribucion of Unesterified Cholesterol-Containing Particles in Human Atherosclerotic Lesions. *American Journal of Patbology*. 1995 enero; 146 (1): p. 140-150.
15. Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RJJ, Jiang Z. Lipoproteins,cholesterol homeostasis and cardiac healt. *Journal of Biological Sciences*. 2009; 5: p. 474-488.
16. Krol M, Borowski T, Piekarska B, Stopa B, Rybarska J, Konieczny L. Force-field parametrization and molecular dynamics simulations of Congo red. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2004;; p. 41-53.
17. Ponder JW, Case DA. Force fields for protein simulations. *Advances in protein chemistry*. 2003;; p. 27-78.

18. Frenkel D, Smith B. Understanding molecular simulation from algorithms to applications. 2nd ed. USA: Academic Press; 2002.
19. Becker OM, Karplus M. a guide to biomolecular simulations. 4th ed. Kaptein R, editor. Netherlands: Springer; 2006.
20. Charmm-gui. Charmm-gui affective simulation input generator and more. [Online].; 2006-2016 [cited 2016 enero 05. Available from: www.charmm-gui.org.
21. Cournia Z, Smith JC, Ullmann GM. A Molecular Mechanics Force Field for Biologically important sterol. *Journal of Computational Chemistry*. 2005 Mayo; 26(13): p. 1383-1399.
22. Brooks B, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. Charmm: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*. 1983 Octubre; 4(2): p. 187-217.
23. MacKerell EA. All-Atom emperical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of Physical chemistry*. 1998 Abril; 102(18): p. 3586-3616.
24. Jorgensen WL, Tirado Rives J. Monte carlo vs molecular dynamics for conformational sampling. *journal Physycal chemistry*. 1996; 100: p. 14508-14513.
25. Faulin J, Juan AA. Simulacion de monte carlo con excel. Barcelona españa;; 2010.
26. Leach AR. MOLECULAR MODELLING. In Leach AR. chapter eight: Monte Carlo simulation Methods. second edition ed. Edinburgh : Prentice Hall; 2001. p. 410-454.

27. Zhang L, Greenfield L. Molecular Orientation in Model Asphalts Using Molecular Simulation. *Energy & Fuels*. 2007 diciembre; 21(2).
28. Leach AR. *molecular modelling principles and applications*. primera ed. london: longman; 1996.
29. SHIEH HS, HOARD , NORDMAN C. The Structure of Cholesterol. *Acta Cryst*. 1981 enero; B(37): p. 1538-1543.
30. Venkateswarlu P, Gordy W. Methyl Alcohol. II. Molecular Structure. *The journal of chemical Physics*. 2004 diciembre; 23(7): p. 1200.
31. Abdurahmanov AA, Rahimova RA, Imanov LM. Microwave spectrum of normal propyl alcohol. *Physics Letters A*. 1970 junio; 32(2): p. 123-124.
32. CHEMSPIDER. CHEMSPIDER search and share chemistry (Cyclohexanol C₆H₁₂O). [Online]. [cited 2016 enero 15. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7678.html?rid=baa40b04-aea9-41c8-8313-b268e17d6546>.
33. Merker T, Guevara Carrion , Vrabec J, Hasse H. Molecular Modeling of Hydrogen Bonding Fluids: New Cyclohexanol Model and Transport Properties of Short Monohydric Alcohols. In.; 2009. p. 529-541.
34. Curtin university. NANOCHEMISTRY INSTITUTE. [Online].; 2014. Available from: <https://nanochemistry.curtin.edu.au/gulp/>.
35. Cromie SRT, Del Popolo MG, Ballone P. Amphiphilic character and aggregation properties of small cholesterol islands on water a simulation study. *Phys Chem*. 2009; B(113): p. 4674-4687.

36. Morales G, Martinez R. Thermochemical properties and contributions groups for ketene dimer and related structures from theoretical calculations. Journal physical chemistry. 2009; 113: p. 8683-8703.
37. Kruth HS. Localization of unesterified cholesterol Demonstration Of Filipin-Positive, Oil-Red-O-Negative Particles. Am J Pathol. 1984; 114: p. 201-208.
38. Ballone P, Cromie SRT. Structural motifs of cholesterol nanoparticles. THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS. 2009;; p. 131-143.
39. GROMACS. GROMACS.ORG. [Online].; 2014. Available from: http://www.gromacs.org/About_Gromacs.
40. LAMMPS. LAMMPS. [Online].; 2014. Available from: <http://lammmps.sandia.gov/>.

BIBLIOGRAFIA

ABDURAHMANOV, A. RAHIMOVA, R. y IMANOV, L. Microwave spectrum of normal propyl alcohol. En: Physics Letters A. June, 1970. Vol. 32, no. 2, p. 123-124.

BROOKS, B. BRUCCOLERI, R. OLAFSON, B. STATES, D. SWAMINATHAN, S. y KARPLUS, M. Charmm: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. En: Journal of Computational Chemistry. October, 1983. vol. 4, no. 2, p. 187-217.

CASEY, G. Cholesterol: the good, the bad and the ugly. En: Continuing Professional Development. November, 2011. vol. 17, no.10, p. 24-31.

CHARMM-GUI. affective simulation input generator and more. [Online].; 2006 [cited 2016 January 05. Available from internet:<URL:<http://www.charmm-gui.org>>.

COURNIA, Z. Smith, J. y ULLMANN, G. A Molecular Mechanics Force Field for Biologically important sterol. En: Journal of Computational Chemistry. May, 2005. vol. 26, no. 13, p. 1383-1399.

CROMIE, S. POPOLO, M. y BALLONE, P. Amphiphilic character and aggregation properties of small cholesterol islands on water a simulation study. En: Phys Chem. 2009, vol. B, no. 113, p. 4674-4687.

DANIELS, T. KILLINGER, K. MICHAL, J. WRIGHT, R. y JIANG, Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. En: Journal of Biological Sciences. June, 2009. vol. 5, no.5, p. 474-488.

FRENKEL, D. y SMITH, B. Understanding molecular simulation from algorithms to applications. 2nd ed. USA.: Academic Press, 2002.

GALLOWAY, R. RAZA, S. YOUNG, R. y OSWALD, I. Tracking the structural changes in series of cholesterol solvates. En: Cryst. Growth Des. December, 2012. vol. 12, no. 1, p. 231-239.

JORGENSEN, W. y TIRADO-RIVES, J. Monte Carlo vs molecular dynamics for conformational sampling. En: Journal Physical Chemistry. August, 1996. vol. 100, no. 34, p. 14508-14513.

KROL, M. BOROWSKI, T. PIEKARSKA, B. STOPA, B. RYBARSKA, J. y KONIECZNY, L. Force-field parametrization and molecular dynamics simulations of Congo red. En: Journal of Computer-Aided Molecular Design. January, 2004. vol. 18, no. 1, p. 41-53.

LAFONT, S. RAPAPOR, T. SOMJEM, G. RENAULT, A. HOWES, P. y KJAER, K. et al. Monitoring the Nucleation of Crystalline Films of Cholesterol on Water and in the Presence of Phospholipid. En: Journal of physical chemistry. January, 1998. vol. 102, no.5, p. 761-765.

LEACH, A. Molecular Modelling Principles and Applications. primer ed. London.: Longman; 1996.

LEACH A. Monte Carlo simulation Methods. En: Molecular Modelling. second edition ed. Edinburgh: Prentice Hall, 2001. p. 410-454.

LIM, B. ROGASKI, B. y KLAUDA, J. Update of The Cholesterol Force Field Parameters in Charmm. En: The Journal of Physical Chemistry. December, 2011. vol. B, no. 116, p. 203-210.

MARCUS G, Martin. MCCC'S Towhee. [Online].; 2014 [cited 10 November 2015] Available from I internet:<URL: <http://towhee.sourceforge.net/>.>

MORALES, G. y MARTINEZ R. Thermochemical properties and contributions groups for ketene dimer and related structures from theoretical calculations. En: Journal Physical Chemistry. July, 2009. vol. 113, no. 30, p. 8683-8703.

SARIG, S. UTIAN, W. SHEEAN, L. y GORODESKI, G. Distribution of unesterified cholesterol-containing particles in human atherosclerotic lesions. En: American Journal of Pathology. January, 1995. vol. 146, no. 1, p. 140-150.

SHIEH, H. HOARD, L. y NORDMAN C. The Structure of Cholesterol. En: Acta Cryst. January, 1981. vol. B, no. 37, p. 1538-1543.

ULLMANN, G. SMITH, J. y COURNIA, Z. A molecular mechanics force field for biologically important sterols. En: Journal of Computational Chemistry. May, 2005. vol. 26, no. 13, p. 1383-1401.

VARSANO, N. FARGION, I. WOLF, S. LEISEROWITZ, L. y ADDADI, L. Formation of 3d cholesterol crystals from 2d nucleation sites in lipid bilayer membranes: Implications for Atherosclerosis. En: J. Am. Chem. Soc. January, 2015. vol. 137, p. 1601-1607.

VATTULAINEN, I. y TOMASZ, R. Lipid Simulations: A respective on lipids in action. En: Cold Spring Harbor Perspectives In Biology. September, 2014. vol. 11, p. 1-14.

VENKATESWARLU, P. GORDY, W. y Methyl Alcohol, II. Molecular Structure. En: The journal of chemical Physics. December, 2004. vol. 23, no. 7, p.1200.

ZHANG, L. y GREENFIELD, L. Molecular orientation in model asphalts using molecular simulation. En: Energy & Fuels. December, 2007. vol. 21, no. 2, p.1102-1111.

ZIBLAT, R. LEISEROWITZ, L. y ADDADI, L. Crystalline domain structure and cholesterol crystal nucleation in single hydrated DPPC: Cholesterol: POPC bilayers. En: Journal American Chemical. May, 2010. vol. 132, p. 9920-9927.

ANEXOS

ANEXO A: Instalación De Towhee

Para instalar *Towhee* dirijase a la siguiente página y siga las instrucciones de descarga <http://towhee.sourceforge.net/code/download.html>. *Towhee* está diseñado para ser ejecutado en un entorno Linux por tal motivo se obtiene un mejor rendimiento en este sistema operativo; aunque también se puede copilar en *Windows* con ayuda de otros softwares¹¹ (8).

En la versión de Linux distribuida por *opensuse*¹² la instalación se hace de la siguiente manera:

1. Vaya a inicio y lance la aplicación correspondiente a la consola.
2. Active los privilegios de súper usuario con el siguiente comando, seguido de Intro (o enter ↵):

su:

Esta acción le pedirá su contraseña.

3. Instale¹³ los siguientes compiladores con el comando

¹¹ Para mayor información dirijase a http://towhee.sourceforge.net/code/code_manual.html

¹² Sistema operativo disponible en <https://www.opensuse.org/#>

¹³ Para realizar estas acciones es necesario tener conexión a internet

zypper install gcc ↵

zypper install gcc – fortran ↵

4. Así mismo instale los siguientes paquetes

zypper install autoconfig ↵

zypper install automake ↵

5. Ubique la carpeta de descarga de Towhee la cual debe llamarse *Towhee-7.1.0.tar.gz* y descomprímala con ayuda de ARK.

6. Vuelva a la consola y ubique desde allí la carpeta en la que descomprimió a Towhee y acceda a la carpeta denominada *Towhee-7.1.0.tar*.

7. Una vez dentro digite:

./configure ↵

8. Ahora escriba en la consola lo siguiente.

cd Source ↵

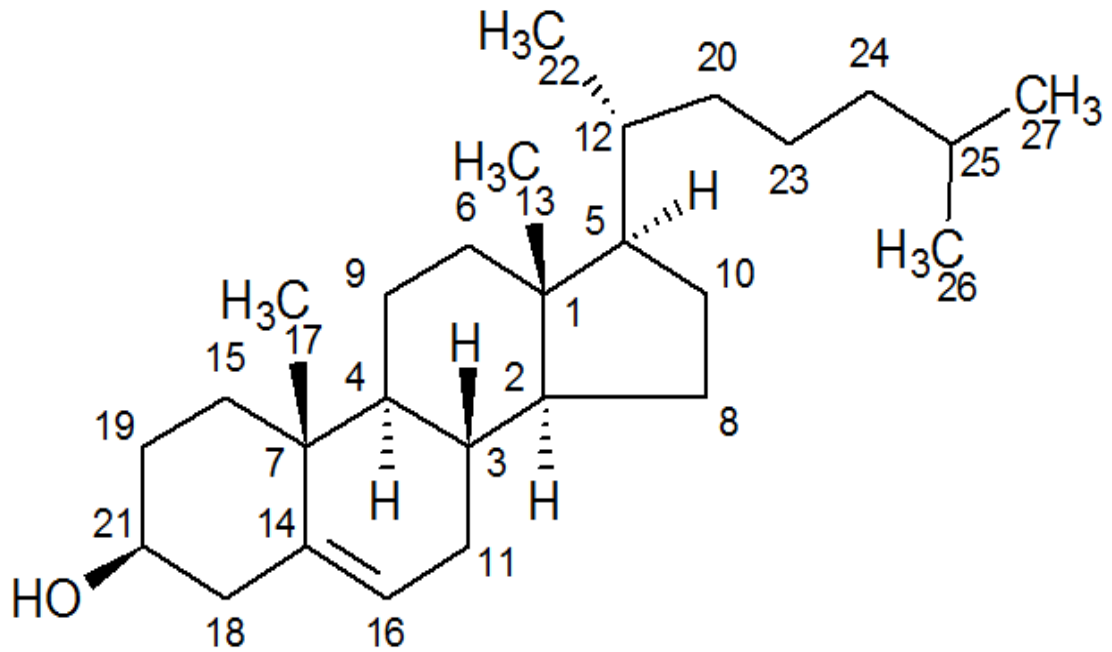
9. Por ultimo

make towhee ↵

make install ↵

ANEXO B: Estructura Del Colesterol

Figura 19. Estructura del colesterol en 2D.



El orden numérico en la estructura del colesterol no tiene ninguna incidencia en los resultados.

Tabla 13. Distancia de enlaces en la cadena principal.

Enlace	Distancia [Å]	Enlace	Distancia [Å]
C1-C2	1.54	C8-C10	1.55
C1-C5	1.47	C11-C16	1.53
C1-C6	1.54	C12-C20	1.50
C1-C13	1.53	C12-C22	1.59
C2-C3	1.54	C14-C16	1.49
C2-C8	1.66	C14-C18	1.59
C3-C4	1.53	C15-C19	1.48
C3-C11	1.54	C18-C21	1.61
C4-C7	1.45	C19-C21	1.55
C4-C9	1.60	C20-C23	1.52
C5-C12	1.54	C21-O59	1.42
C5-C10	1.58	C23-C24	1.52
C6-C9	1.55	C24-C25	1.55
C7-C14	1.50	C25-C26	1.55
C7-C15	1.55	C25-C27	1.56
C7-C17	1.48	O59-H60	0.97

ANEXO C: Towhee_Input

Este es el archivo de entrada principal para Towhee y generalmente es el único archivo que necesita ser editado en una base regular. Las variables se describen en el orden en que aparecen en este archivo (8).

```
inputformat                1
'Towhee'                   moviefreq
random_number_generator    1000
'RANLUX'                   backupfreq
random_luxlevel            1000
3                           runoutput
random_seed                'full'
12345                      pdb_output_freq
ensemble                   1
'nvt'                      pressurefreq
temperature                1000
300.0d0                    trmaxdispfreq
nmolty                     1000
1                           volmaxdispfreq
nmolectyp                  1000
1                           potentialstyle
numboxes                   'internal'
1                           fnumber
stepstyle                  2
'cycles'                   ff_filename
nstep                       /home/martin8a/bin/ForceFields
500000                      /towhee_ff_Charmm27
printfreq                  /home/martin8a/bin/ForceFields
1000                       /towhee_ff_TIP3P
blocksize                   classical_potential
```

```

'Lennard-Jones'          0.0d0 50.0d0 0.0d0
classical_mixrule        0.0d0 0.0d0 50.0d0
'Lorentz-Berthelot'     pmpivot
lshift                   1.0d0
.false.                  pmpivmt
ltailc                   1.0d0 0.0d0
.true.                   cbmc_formulation
rmin                      'Martin and Frischknecht 2006'
1.0d0                    cbmc_setting_style
rcut                     'Martin and Thompson FPE 2004'
20.0d0                   #cholesterol
rcutin                   input_style
20.0d0                   'basic connectivity map'
electrostatic_form       nunit
'coulomb'                74
coulombstyle             nmaxcbmc
'minimum image'         74
dielect                  lpdbnames
1.0d0                    F
linit                    forcefield
T                        'Charmm27'
initboxtype              charge_assignment
'dimensions'            'manual'
initstyle                unit ntype qqatom
'coords'                 1      'CT1' 0.0d0
initlattice              vibration
'none'                   4
initmol                  2 5 6 13
1                        improper torsion
inix iniy iniz           0
4 4 4                   unit ntype qqatom
hmatrix                  2      'CT1' -0.09d0
50.0d0 0.0d0 0.0d0      vibration

```

```

4
1 3 8 28
improper torsion
0
unit ntype qqatom
3 'CT1' -0.09d0
vibration
4
2 4 11 29
improper torsion
0
unit ntype qqatom
4 'CT1' -0.09d0
vibration
4
3 7 9 30
improper torsion
0
unit ntype qqatom
5 'CT1' -0.09d0
vibration
4
1 10 12 31
improper torsion
0
unit ntype qqatom
6 'CT2' -0.18d0
vibration
4
1 9 32 33
improper torsion
0
unit ntype qqatom
7 'CT1' 0.0d0
vibration
4
4 14 15 17
improper torsion
0
unit ntype qqatom
8 'CT2' -0.18d0
vibration
4
2 10 34 35
improper torsion
0
unit ntype qqatom
9 'CT2' -0.18d0
vibration
4
4 6 36 37
improper torsion
0
unit ntype qqatom
10 'CT2' -0.18d0
vibration
4
5 8 38 39
improper torsion
0
unit ntype qqatom
11 'CT2' -0.18d0
vibration
4
3 16 40 41
improper torsion

```

0	11 14 48
unit ntype qqatom	improper torsion
12 'CT1' -0.09d0	0
vibration	unit ntype qqatom
4	17 'CT3' -0.27d0
5 20 22 42	vibration
improper torsion	4
0	7 49 50 51
unit ntype qqatom	improper torsion
13 'CT3' -0.27d0	0
vibration	unit ntype qqatom
4	18 'CT2' -0.18d0
1 43 44 45	vibration
improper torsion	4
0	14 21 52 53
unit ntype qqatom	improper torsion
14 'CT1' 0.0d0	0
vibration	unit ntype qqatom
3	19 'CT2' -0.18d0
7 16 18	vibration
improper torsion	4
0	15 21 54 55
unit ntype qqatom	improper torsion
15 'CT2' -0.18d0	0
vibration	unit ntype qqatom
4	20 'CT2' -0.18d0
7 19 46 47	vibration
improper torsion	4
0	12 23 56 57
unit ntype qqatom	improper torsion
16 'CT1' -0.15d0	0
vibration	unit ntype qqatom
3	21 'CT2' 0.14d0

```

vibration
4
18 19 58 59
improper torsion
0
unit ntype qqatom
22 'CT3' -0.27d0
vibration
4
12 61 62 63
improper torsion
0
unit ntype qqatom
23 'CT2' -0.18d0
vibration
4
20 24 64 65
improper torsion
0
unit ntype qqatom
24 'CT2' -0.18d0
vibration
4
23 25 66 67
improper torsion
0
unit ntype qqatom
25 'CT1' -0.09d0
vibration
4
24 26 27 68
improper torsion
0
unit ntype qqatom
26 'CT3' -0.27d0
vibration
4
25 69 70 71
improper torsion
0
unit ntype qqatom
27 'CT3' -0.27d0
vibration
4
25 72 73 74
improper torsion
0
unit ntype qqatom
28 'HA' 0.09d0
vibration
1
2
improper torsion
0
unit ntype qqatom
29 'HA' 0.09d0
vibration
1
3
improper torsion
0
unit ntype qqatom
30 'HA' 0.09d0
vibration
1
4

```

improper torsion	1
0	8
unit ntype qqatom	improper torsion
31 'HA' 0.09d0	0
vibration	unit ntype qqatom
1	36 'HA' 0.09d0
5	vibration
improper torsion	1
0	9
unit ntype qqatom	improper torsion
32 'HA' 0.09d0	0
vibration	unit ntype qqatom
1	37 'HA' 0.09d0
6	vibration
improper torsion	1
0	9
unit ntype qqatom	improper torsion
33 'HA ' 0.09d0	0
vibration	unit ntype qqatom
1	38 'HA' 0.09d0
6	vibration
improper torsion	1
0	10
unit ntype qqatom	improper torsion
34 'HA' 0.09d0	0
vibration	unit ntype qqatom
1	39 'HA' 0.09d0
8	vibration
improper torsion	1
0	10
unit ntype qqatom	improper torsion
35 'HA' 0.09d0	0
vibration	unit ntype qqatom

40	'HA' 0.09d0	0
	vibration	unit ntype qqatom
1		45 'HA' 0.09d0
11		vibration
	improper torsion	1
0		13
	unit ntype qqatom	improper torsion
41	'HA' 0.09d0	0
	vibration	unit ntype qqatom
1		46 'HA' 0.09d0
11		vibration
	improper torsion	1
0		15
	unit ntype qqatom	improper torsion
42	'HA' 0.09d0	0
	vibration	unit ntype qqatom
1		47 'HA' 0.09d0
12		vibration
	improper torsion	1
0		15
	unit ntype qqatom	improper torsion
43	'HA' 0.09d0	0
	vibration	unit ntype qqatom
1		48 'HA' 0.15d0
13		vibration
	improper torsion	1
0		16
	unit ntype qqatom	improper torsion
44	'HA' 0.09d0	0
	vibration	unit ntype qqatom
1		49 'HA' 0.09d0
13		vibration
	improper torsion	1

17
improper torsion
0
unit ntype qqatom
50 'HA' 0.09d0
vibration
1
17
improper torsion
0
unit ntype qqatom
51 'HA' 0.09d0
vibration
1
17
improper torsion
0
unit ntype qqatom
52 'HA' 0.09d0
vibration
1
18
improper torsion
0
unit ntype qqatom
53 'HA' 0.09d0
vibration
1
18
improper torsion
0
unit ntype qqatom
54 'HA' 0.09d0

vibration
1
19
improper torsion
0
unit ntype qqatom
55 'HA' 0.09d0
vibration
1
19
improper torsion
0
unit ntype qqatom
56 'HA' 0.09d0
vibration
1
20
improper torsion
0
unit ntype qqatom
57 'HA' 0.09d0
vibration
1
20
improper torsion
0
unit ntype qqatom
58 'HA' 0.09d0
vibration
1
21
improper torsion
0

unit ntype qqatom	improper torsion
59 'OH1' -0.66d0	0
vibration	unit ntype qqatom
2	64 'HA' 0.09d0
21 60	vibration
improper torsion	1
0	23
unit ntype qqatom	improper torsion
60 'H' 0.43d0	0
vibration	unit ntype qqatom
1	65 'HA' 0.09d0
59	vibration
improper torsion	1
0	23
unit ntype qqatom	improper torsion
61 'HA' 0.09d0	0
vibration	unit ntype qqatom
1	66 'HA' 0.09d0
22	vibration
improper torsion	1
0	24
unit ntype qqatom	improper torsion
62 'HA' 0.009d0	0
vibration	unit ntype qqatom
1	67 'HA' 0.09d0
22	vibration
improper torsion	1
0	24
unit ntype qqatom	improper torsion
63 'HA' 0.09d0	0
vibration	unit ntype qqatom
1	68 'HA' 0.09d0
22	vibration

1	unit ntype qqatom
25	72 'HA' 0.09d0
improper torsion	vibration
0	1
unit ntype qqatom	27
69 'HA' 0.09d0	improper torsion
vibration	0
1	unit ntype qqatom
26	73 'HA' 0.09d0
improper torsion	vibration
0	1
unit ntype qqatom	27
70 'HA' 0.09d0	improper torsion
vibration	0
1	unit ntype qqatom
26	74 'HA' 0.09d0
improper torsion	vibration
0	1
unit ntype qqatom	27
71 'HA' 0.09d0	improper torsion
vibration	0
1	
26	
improper torsion	
0	

ANEXO D: Towhee_Coords

Este archivo se utiliza cuando se está configurando la ejecución de arranque de *Towhee* y desea que el código lea directamente las coordenadas iniciales (initstyle = 'coords'). El código leerá un conjunto de átomos de coordenadas de cada línea (x, y, z). Este archivo es más útil cuando se tiene un archivo de coordenadas de otra fuente (como un archivo pdb) las coordenadas guardaran el mismo orden asignado a cada átomo en towhee_input (8).

14.600	14.210	16.280	12.750	11.390	13.340
14.110	13.760	17.670	13.750	10.560	12.560
15.110	13.920	18.830	14.070	11.170	11.170
16.550	13.760	18.330	15.380	10.580	10.580
13.500	14.630	15.400	12.790	11.090	10.290
15.610	15.370	16.410	13.750	12.700	17.590
17.410	13.830	19.490	14.860	13.220	19.610
12.760	14.720	17.740	16.760	12.760	17.730
16.760	15.040	17.390	13.830	15.210	14.500
12.570	15.440	16.380	15.080	16.280	16.770
14.980	15.270	19.570	16.190	15.650	15.500
12.760	13.380	14.900	12.800	15.500	18.550
15.210	13.040	15.510	11.940	14.100	18.010
17.060	14.950	20.430	17.570	14.880	16.770
18.860	14.080	18.990	16.920	15.930	18.020
15.650	14.940	20.910	12.730	16.530	16.350
17.320	12.520	20.170	11.490	15.160	16.280
17.990	15.050	21.710	15.530	16.120	19.050
19.740	14.060	20.180	13.970	15.410	19.920
13.460	12.660	13.780	12.700	12.650	15.730
19.460	15.280	21.090	15.210	13.330	14.460
11.270	13.780	14.480	14.660	12.080	15.670

16.200	12.800	15.920	10.690	13.990	15.300
18.910	15.050	18.470	11.350	14.640	13.740
19.300	13.300	18.300	11.910	11.570	12.690
15.360	15.840	21.530	12.420	10.820	14.200
17.800	11.760	19.570	13.340	9.610	12.290
16.290	12.250	20.390	14.690	10.310	13.090
17.830	12.520	21.140	14.320	12.270	11.350
18.010	14.110	22.380	15.330	9.490	10.520
17.710	16.000	22.250	16.170	10.830	11.240
20.800	14.270	19.870	15.690	10.920	9.640
19.680	13.170	20.780	12.070	11.820	10.580
13.530	13.260	12.830	12.470	9.990	10.240
14.450	12.270	14.200	13.060	11.340	9.280
19.300	16.230	20.590	14.600	14.210	49.380
20.420	15.310	22.130	14.110	13.760	50.770
21.190	15.830	21.860			
10.890	12.940	13.950			