



TÍTULO

ESTRUCTURA Y ESTABILIZACIÓN DE CLOROSOMAS EN AMBIENTES ACUOSOS

AUTORA

Cristina García Ruiz

	Esta edición electrónica ha sido realizada en 2024
Directores	Dr. D. Juan Luis Aragonés Gómez ; Dr. D. Pablo Llombart González
Instituciones	Universidad Internacional de Andalucía ; Universidad de Huelva
Curso	<i>Máster Universitario en Simulación Molecular (2022/23)</i>
©	Cristina García Ruiz
©	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía
Fecha documento	2023

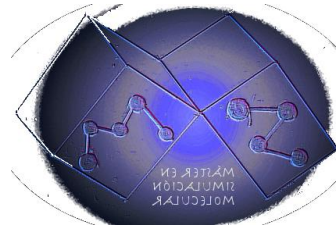


**Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)**

Para más información:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>



Estructura y estabilización de clorosomas en ambientes acuosos

Cristina García Ruiz

Trabajo entregado para la obtención del grado de Master en
Simulación Molecular

Julio / 2023

Directores:

Juan Luis Aragonés

Pablo Llombart

RESUMEN

Los sistemas utilizados en la naturaleza para la captación de luz han inspirado e intrigado a multitud de investigadores, quienes han estudiado durante décadas los principios tras la fotosíntesis. Las estructuras, disposiciones y propiedades químicas de los cromóforos más comunes han sido determinadas experimentalmente (Li *et al.*, 2018), dichas características son cruciales para evitar la disipación de la energía lumínica captada (Nelson *and* Cox, 2014).

En la actualidad, se investiga con la ayuda de la simulación molecular el comportamiento de los excitones y los parámetros tras la transferencia eficiente de energía, tanto en moléculas aisladas (Hashemi *et al.*, 2021) como en fotosistemas completos (Zheng *et al.*, 2021), la simulación de estos sistemas se ve dificultada por la complejidad de las estructuras biológicas (Frederix *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018).

La información otorgada por las simulaciones puede ayudar a diseñar de manera más efectiva dispositivos de captación de luz, que serán útiles para satisfacer las necesidades energéticas de la sociedad de forma más sostenible, y para fabricar dispositivos ópticos que presenten respuesta a estímulos lumínicos (Balaban, 2005; Eisele *et al.*, 2012; Grosso *et al.*, 2009; Harmatys *et al.*, 2018).

En este trabajo, tutorizado por el Dr. Pablo Llombart y el Dr. Juan Luis aragonés, se estudia el comportamiento de los cromóforos de la familia de las clorofilas usando como modelo la bacterioclorofila a.

Se han realizado simulaciones de dinámica molecular con colectivos canónico e isotermodisipativo en GROMACS, con el fin observar la configuración de los componentes de la bacterioclorofila a y la posición que ocupan las bacterioclorofilas en el espacio.

Todas las simulaciones se llevan a cabo en un ambiente que contiene agua, las condiciones de cada simulación vienen dadas, principalmente, por la disposición inicial de las moléculas de bacterioclorofila y en un caso por la presencia de un detergente. Las condiciones son tres: moléculas libres sin disposición concreta y en número creciente de una a diez, 160 moléculas de bacterioclorofila formando un círculo altamente ordenado y una bicapa compuesta por bacterioclorofilas asociadas a moléculas de detergente.

Conocer la dinámica de los pigmentos de la familia de las clorofilas y bacterioclorofilas es de gran utilidad para generar ambientes en los que las estructuras compuestas por cromóforos altamente ordenados, características de los sistemas de captación de luz naturales, se mantengan estables, este es el primer paso hacia la transferencia eficiente de energía.

ABSTRACT

The mechanisms used in nature for light capture have inspired and intrigued lots of scientists, who have studied for decades the principles behind photosynthesis. The structures, placement and chemical properties of the most common chromophores have been experimentally determined (Li *et al.*, 2018), said characteristics are crucial to avoid the dissipation of the captured light energy (Nelson *and* Cox, 2014).

Currently, the behavior of excitons and the parameters after efficient energy transfer are being investigated with the help of molecular simulation, both in isolated molecules (Hashemi *et al.*, 2021) and in complete photosystems (Zheng *et al.*, 2021), the simulation of these systems is hampered by the complexity of the biological structures (Frederix *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018).

The information provided by the simulations can help to more effectively design light-harvesting devices, which will be useful to meet the energy needs of society in a more sustainable way, and to manufacture optical devices that respond to light stimuli (Balaban, 2005; Eisele *et al.*, 2012; Grosso *et al.*, 2009; Harmatys *et al.*, 2018).

In this work, supervised by Dr. Pablo Llombart and Dr. Juan Luis Aragonés, the behavior of chromophores from the chlorophyll family is studied using bacteriochlorophyll *a* as a model.

Simulations of molecular dynamics with canonical and isothermal-isobaric groups have been carried out in GROMACS, in order to observe the configuration of the bacteriochlorophyll *a* components and the position that bacteriochlorophylls occupy in space.

All the simulations are carried out in an environment that contains water, the conditions of each simulation are given, mainly, by the initial arrangement of the bacteriochlorophyll molecules and in one case by the presence of a detergent. There are three conditions: free molecules without a specific arrangement and in increasing number from one to ten, 160 bacteriochlorophyll molecules forming a highly ordered circle, and a bilayer composed of bacteriochlorophylls associated with detergent molecules.

Knowing the dynamics of pigments from the chlorophyll and bacteriochlorophyll family is very useful to generate environments in which the structures composed of highly ordered chromophores, characteristic of natural light-capture systems, remain stable, which is the first step towards efficient energy transfer.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mis tutores Pablo Llombart y Juan Luis Aragonés, por ayudarme y guiarme en este trabajo. Agradezco también a los profesores del master por su trabajo en la enseñanza y por inspirarnos.

Gracias a mis padres por apoyarme en mis estudios y gracias a Lucía y Virginia por estar ahí.

ÍNDICE

Resumen	3
Abstract	5
Agradecimientos.....	7
Capítulo 1. Introducción	11
1.1. Estado del arte.....	11
1.1.1. Importancia y dificultad del problema.....	11
1.1.2. Los estudios más recientes, centrados en el comportamiento de los excitones.....	11
1.1.3. Dispositivos bioinspirados para la captura de luz.....	12
1.2. Estructuras naturales captadoras de luz: los clorosomas y los fotosistemas.....	12
1.2.1. Los clorosomas.....	13
1.2.2. Los fotosistemas.....	13
1.2.3. La bacterioclorofila a como modelo para la familia de las clorofilas y las bacterioclorofilas.....	14
1.3. Objetivos.....	15
Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	17
2.1. Programas utilizados: GROMACS, GRACE y VMD.....	17
2.1.1. GROMACS.....	17
2.1.2. GRACE.....	17
2.1.3. VMD.....	17
2.2. Procedimiento de simulación.....	17
2.2.1. Bacterioclorofilas libre en medio con agua.....	18
2.2.2. Bacterioclorofilas libres con disposición en anillo.....	18
2.2.3. Bacterioclorofilas formando bicapa.....	18
2.2.4. Obtención de datos.....	18
2.3. Parámetros de la simulación.....	19
2.3.1. Medidas de la caja de simulación, condiciones de contorno periódicas y situación inicial de las moléculas.....	19
2.3.2. Potencial de gromos.....	20
2.3.3. Algoritmo para las ecuaciones de movimiento.....	20
2.3.4. Colectivos utilizados.....	21
2.3.5. Termostato.....	21
2.3.6. Baróstato.....	22
2.3.7. Restricción de enlaces.....	22

2.3.8. Minimización de la energía en GROMACS.....	23
2.3.9. gmx rdf.....	23
2.3.10. gmx density.....	23
Capítulo 3. Resultados y Discusiones.....	25
3.1. Simulación de moléculas de bacterioclorofila a libres en agua.....	25
3.1.1. Distribución radial del agua respecto a las bacterioclorofilas.....	25
3.1.2. Distribución de las bacterioclorofilas en el medio acuoso.....	26
3.2. Simulación de moléculas de bacterioclorofila a formando anillo en agua.....	34
3.2.1. Disposición de las bacterioclorofilas respecto al centro de la caja al cabo de la simulación.....	34
3.2.2. Disposición espacial de las bacterioclorofilas al comienzo y al cabo de la simulación.....	35
3.3. Simulación de moléculas de bacterioclorofila confinadas entre dos bicapas.....	39
3.3.1. Perfil de densidad de la bicapa al cabo de la simulación.....	40
3.3.2. Disposición de la bicapa de bacterioclorofilas al cabo de la simulación.....	41
Capítulo 4. Conclusiones.....	46
Capítulo 5. Referencias.....	48

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estado del arte

1.1.1. Importancia y dificultad del problema

De entre todos los problemas que se pueden tratar con la simulación molecular, uno de los más complejos son las estructuras biológicas, debido a su alto grado de organización y heterogeneidad (Frederix *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018). La simulación molecular puede ampliar el conocimiento difícilmente abarcable por métodos experimentales (De Groot *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018) y así explicar de forma más completa el comportamiento y dinámica de las estructuras biológicas.

Es de especial interés la forma en la que los seres fotótrofos captan la luz, para posteriormente transformarla en energía química. Los mecanismos de transferencia de energía utilizados por las estructuras biológicas ayudarían al diseño de dispositivos optoelectrónicos y de captación de luz (Balaban, 2005; Eisele *et al.*, 2012; Grosso *et al.*, 2009; Harmatys *et al.*, 2018) más eficientes.

En este proyecto nos centramos en la bacterioclorofila a, como representante de la familia de las clorofilas y bacterioclorofilas, los pigmentos fotosintéticos más ampliamente distribuidos en los seres vivos fotótrofos (Nelson *and* Cox, 2014).

1.1.2. Los estudios más recientes, centrados en el comportamiento de los excitones

Las estructuras de los principales sistemas de captura de luz biológicos han sido determinadas experimentalmente por los campos de la biología molecular y la biología estructural, mediante técnicas como la crio-microscopía electrónica y la resonancia magnética nuclear (Li *et al.*, 2018).

Estos datos experimentales sirven de base para las simulaciones más recientes, las cuales se centran en la transmisión de energía y el comportamiento de los excitones. La información obtenida es clave para discernir los detalles que hacen tan eficiente el proceso de captación de luz en los seres vivos.

El estudio de los excitones y de los modelos de simulación molecular más adecuados, los que resulten en la representación fiel de las propiedades determinadas experimentalmente, van desde moléculas aisladas hasta clorosomas completos. Ejemplos de esto son los trabajos de Hashemi *et al.*, en el que exploraron la simulación de excitones en distintos cromóforos de la familia de las bacterioclorofilas (Hashemi *et al.*, 2021), de Zheng *et al.*, en el cual modelaron la

difusión de los excitones en fotosistemas (Zheng *et al.*, 2021) y de Li *et al.*, en el que simularon el comportamiento de los excitones en los clorosomas (Li *et al.*, 2018).

Es conocido que los cromóforos aislados *in vitro*, como la clorofila, al ser excitados vuelven a su estado basal disipando la energía en forma de fluorescencia y calor, es el conjunto de muchos cromóforos el que hace posible la transmisión de energía eficiente (Nelson *and* Cox, 2014). Todos los estudios coinciden en que la disposición espacial y la orientación de los cromóforos es crucial para la correcta transmisión de los excitones.

Interesantemente, en el trabajo de Caycedo-Soler *et al.* se llega a la conclusión de que es necesario tener en cuenta a las proteínas estructurales en el efecto de los excitones, por los estados vibracionales subyacentes a los de las clorofilas, los datos obtenidos en dichas simulaciones se ajustan mejor a los experimentales (Caycedo-Soler *et al.*, 2022).

1.1.3. Dispositivos bioinspirados para la captura de luz

Dado que las estructuras naturales son complejas y no tenemos la tecnología para imitarlas, y no conocemos todos los detalles sobre el comportamiento de los excitones (Linnanto *et al.*, 2013), los dispositivos que existen hoy en día se centran en el objetivo de presentar respuestas a estímulos lumínicos, usando como sensor de dicha señal cromóforos.

Un ejemplo de los dispositivos activados por estímulo lumínico es el creado por Chin *et al.* el cual consiste en nanopartículas de óxido de hierro y clorofilina con el propósito de tratar el cáncer de vejiga (Chin *et al.*, 2022).

Los cromóforos no suelen ser de la familia de las clorofilas, sino péptidos cortos con anillos aromáticos y un espectro de absorción en el rango de luz visible. Estas construcciones no presentan la disposición ordenada de las estructuras biológicas, ni su capacidad de transmisión de excitones (Meneghin *et al.*, 2020).

1.2. Estructuras naturales captadoras de luz: los clorosomas y los fotosistemas

A lo largo de evolución los sistemas de captación de luz han crecido en complejidad y eficiencia. Su capacidad de reaccionar frente a la luz viene dada por los cromóforos, como la clorofila y la bacterioclorofila, moléculas con anillos y enlaces dobles que al ser iluminadas por longitudes de onda características pasan a un estado excitado. Cuando el cromóforo decae a su estado basal la energía resultante puede ser captada por otro cromóforo con una energía de excitación menor, así se

forma un gradiente por el que se transmite la energía en las estructuras de captación de luz biológicas (Nelson *and* Cox, 2014).

A continuación, se explicarán brevemente las características de las estructuras de captación de luz más importantes.

1.2.1. Los clorosomas

Los clorosomas son antenas de captación de luz accesorias formadas por bacterioclorofilas, pueden funcionar a intensidades lumínicas muy bajas y transfieren los excitones de manera altamente eficiente en las bacterias verdes del azufre. (Oostergetel *et al.*, 2010)

El clorosoma en conjunto se encuentra envuelto por una membrana y consta de un cuerpo principal de cilindros concéntricos constituidos de bacterioclorofilas c, d y e. Estos cilindros no necesitan de proteínas estructurales, ya que las interacciones entre las bacterioclorofilas resultan en el autoensamblaje de láminas, que se enrollan dando lugar a los cilindros, la característica del autoensamblaje resulta interesante en el diseño de dispositivos para la captación de luz (Li *et al.*, 2018).

Un complejo de proteínas y bacterioclorofila a forman una base bidimensional que conecta los clorosomas con los siguientes componentes en la cadena de transporte energético. Los niveles de excitación para los pigmentos de las distintas partes del clorosoma están en orden decreciente, creando un gradiente que dirige los excitones hacia el centro de reacción (Dostal *et al.*, 2016; Coles *et al.*, 2017).

1.2.2. Los fotosistemas

Los fotosistemas son conjuntos de cromóforos ordenados espacialmente gracias a proteínas estructurales, su función es captar la luz solar en seres fotosintéticos y conducir dicha energía en forma de excitones hacia un centro de reacción, donde se transforma en energía química (Nelson *and* Cox, 2014). Hay fotosistemas tanto en bacterias como en eucariotas.

Los fotosistemas de bacterias se dividen en dos tipos, los del tipo de las bacterias púrpuras y los del tipo de las bacterias verdes del azufre (Nelson *and* Cox, 2014).

Los fotosistemas de las bacterias púrpuras se caracterizan por tener un recorrido cíclico, la cadena de oxidaciones y reducciones consiguiente se utiliza para la obtención de energía, de forma que se genera un gradiente de protones, este gradiente impulsa la síntesis de ATP (Nelson *and* Cox, 2014).

Los fotosistemas de las bacterias verdes del azufre utilizan la energía captada para producir un gradiente protón-motriz, al ser un recorrido lineal el aceptor final de electrones es el NAD^+ . Para devolver los electrones al centro de reacción se oxida el H_2S a S_0 y finalmente a SO_4^{2-} (Nelson *and* Cox, 2014).

En eucariotas hay dos fotosistemas, con clorofilas y carotenos principalmente, comunicados entre sí por transportadores electrónicos. En el primer fotosistema, el P680, se reúne la energía necesaria para la fotólisis del agua, este fotosistema es análogo al de las bacterias púrpuras. En el segundo fotosistema, el P700, el recorrido de los electrones finaliza con la reducción del NADP^+ a NADPH , este fotosistema es análogo al de las bacterias verdes del azufre (Nelson *and* Cox, 2014).

1.2.3. La bacterioclorofila a como modelo para la familia de las clorofilas y las bacterioclorofilas

Como se ha visto, la base de los clorosomas está constituida de proteínas y bacterioclorofila a, encargada de pasar los excitones al centro de reacción. La bacterioclorofila a no solo está presente en los clorosomas de las bacterias verdes, sino en todas las bacterias fotosintéticas (menos las cianobacterias) y en las bacterias púrpuras es el único pigmento fotosintético (Senge *et al.*, 1995).

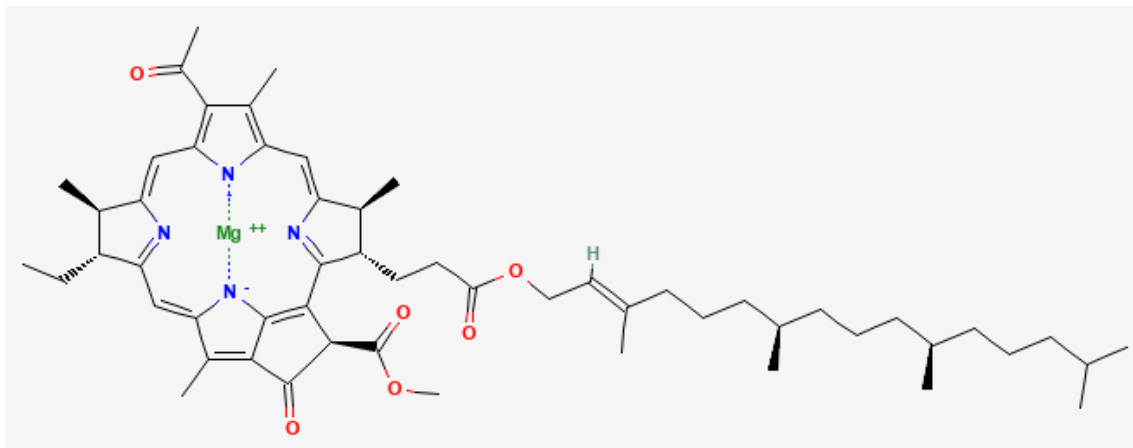


Figura 1. Molécula de bacterioclorofila a. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 11953947, Bacteriochlorophyll a. Retrieved June 25, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bacteriochlorophyll-a>.

La bacterioclorofila a, como el resto de la familia a la que representa en este trabajo, está constituida por un macrociclo derivado de la porfirina con anillos dobles y simples, en el centro del macrociclo (al que nos referiremos como anillo) se encuentra un átomo de magnesio y unido al macrociclo hay una cadena hidrofóbica normalmente de fitol (Senge *et al.*, 1995).

En particular, el macrociclo de la bacterioclorofila a tiene los anillos internos II y IV reducidos y un grupo etilo en carbono 8. A diferencia de la clorofila a, la bacterioclorofila a presenta en su carbono 3 un grupo acetilo en lugar de un grupo vinilo (Senge *et al.*, 1995).

En las bacterioclorofilas el tipo de molécula que constituye la cola hidrofóbica cambia con mayor frecuencia que en las clorofilas, en la bacterioclorofila a una cola de fitol es la más común, en ocasiones es geranilgeraniol (Senge *et al.*, 1995).

1.3. Objetivos

El objetivo de este trabajo es simular el comportamiento de la bacterioclorofila a en distintos medios acuosos para ver cómo su estructura y propiedades afectan a su disposición espacial y comparar los resultados obtenidos con nuestro conocimiento sobre la bacterioclorofila a y con varias estructuras naturales.

Los datos generados serán de utilidad para ampliar los estudios sobre la bacterioclorofila a, entender los sistemas biológicos que la tienen y, a posteriori, realizar simulaciones de estructuras biológicas o sintéticas más complejas, que puedan ayudar en el diseño de antenas de clorofila y dispositivos captadores de luz.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Programas utilizados: GROMACS, GRACE y VMD

2.1.1. GROMACS

GROMACS es un paquete de simulación molecular que realiza simulaciones de dinámica molecular y minimización de la energía. Estas son dos de las muchas técnicas utilizadas en química computacional y modelación molecular (Abraham *et al.*, 2015).

2.1.2. GRACE

GRACE es una herramienta WYSIWYG 2D de libre acceso para graficar, destinada a sistemas operativos Unix. El nombre GRACE son las siglas para *GRaphing, Advanced Computation and Exploration of data*. (Retrieved June 15, 2023 from <https://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>)

2.1.3. VMD

VMD está diseñado para la modelización, visualización y análisis de estructuras biológicas como las proteínas, ácidos nucleicos, bicapas lipídicas, etc. También puede ser utilizado para visualizar moléculas más genéricas, ya que VMD puede leer los archivos estándar PDB (*Protein Data Bank*) y mostrar la estructura que contienen. VMD puede ser utilizado para animar y analizar la trayectoria de una simulación de dinámica molecular. (Retrieved June 15, 2023 from http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/allversions/what_is_vmd.html)

2.2. Procedimiento de simulación

Para estudiar el comportamiento de la bacterioclorofila a en distintos medios se han realizado simulaciones en tres condiciones:

- En una condición las moléculas están libres en un medio con agua (un número creciente, de una a diez moléculas de bacterioclorofila).
- En otra condición un anillo constituido por 160 moléculas de bacterioclorofila se encuentra en un medio con agua.
- En la última condición las moléculas de bacterioclorofila se encuentran ordenadas formando una bicapa, interaccionando con un detergente y rodeadas por el medio con agua.

En ninguno de los casos las bacterioclorofilas forman enlaces entre ellas, las disposiciones del anillo y la bicapa son la configuración de partida de moléculas libres.

Se han realizado las simulaciones con ficheros que han sido proporcionados, estos son: la molécula de bacterioclorofila.gro, el fichero grompp.mdp, con los parámetros de la simulación, el fichero gromos54a7_atb.ff, con el potencial utilizado en las simulaciones y el topol.top, con la topología, ángulos y enlaces de la bacterioclorofila a.

2.2.1. Bacterioclorofilas libres en medio con agua

En las simulaciones de moléculas de bacterioclorofila libres (primera condición), las cajas de simulación son de 5 nanómetros de lado, se han insertado moléculas de bacterioclorofila a utilizando el comando de GROMACS *insert molecules*, en orden creciente de 1 a 10 en dicha caja, posteriormente se han solvatado en agua con el comando *solvate* de GROMACS. De aquí se generan los archivos conf.gro iniciales para realizar la minimización de la energía y posteriormente simular, se ha utilizado el colectivo NVT.

2.2.2. Bacterioclorofilas libres con disposición en anillo

Para el anillo de 160 bacterioclorofilas la estructura inicial fue proporcionada en un archivo de configuración conf.gro, en esta caja de simulación también se insertó el agua con el comando *solvate*. Previa a la simulación, los archivos conf.gro nuevamente generados pasaron por una minimización de la energía. Tras realizar la minimización el confout.gro generado pasa a ser el conf.gro de la simulación principal, se ha utilizado el colectivo NVT.

2.2.3. Bacterioclorofilas formando bicapa

En la simulación de bacterioclorofilas en forma de bicapa se ha incluido el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), un detergente que interacciona con las moléculas de bacterioclorofila. También se ha acoplado un baróstato y se ha simulado a 1 bar de presión constante. En las otras dos condiciones de simulación no se ha acoplado baróstato, ya que al estar la caja de simulación llena de moléculas de agua la distorsión de la caja no afecta a la disposición final de las bacterioclorofilas. Se ha realizado una minimización de la energía previa a la simulación, se ha utilizado el colectivo NPT.

2.2.4. Obtención de datos

Una vez finalizadas las simulaciones se han hecho índices con las moléculas y átomos de interés. En las simulaciones de bacterioclorofilas libres en agua se ha

calculado la función de distribución radial del agua respecto al magnesio de la bacterioclorofila para las diez simulaciones, las funciones de distribución radial se graficaron con el programa GRACE. En las simulaciones de bacterioclorofilas en anillo y en bicapa se han obtenido los perfiles de densidad con el comando *gmx density* de GROMACS, con ellos se elaboraron mediante GRACE gráficas de la densidad de las moléculas de bacterioclorofila en la caja de simulación.

De los archivos *conf.gro* y *confout.gro* se tomaron, usando VMD, imágenes de la configuración espacial de las bacterioclorofilas en las distintas condiciones.

2.3. Parámetros de la simulación

Para las simulaciones realizadas en este trabajo se han utilizado técnicas de Dinámica Molecular, en la cual los movimientos moleculares vienen dados por las ecuaciones clásicas de Newton y las propiedades del sistema que se desean cuantificar se expresan en función de la posición y el momento de las partículas del sistema (Frenkel *and* Smit, 2001).

2.3.1. Medidas de la caja de simulación, condiciones de contorno periódicas y situación inicial de las moléculas

La caja de simulación tiene dimensiones finitas debido al poder de computación limitado del que disponemos. Para solventar las interacciones de las moléculas en los límites de la caja y poder predecir las propiedades del sistema sin las alteraciones provocadas por las moléculas en el límite de la caja se aplican condiciones de contorno periódicas, esto hace que se creen imágenes periódicas de la caja de simulación alrededor de esta y las moléculas al límite de la caja interactúen con las moléculas de la caja periódica adyacente (Frenkel *and* Smit, 2001).

Al iniciar la simulación las moléculas deben de estar repartidas en la caja de sin que las posiciones solapen, esto es importante para evitar errores en la simulación, con este propósito se insertan las moléculas en la caja siguiendo una disposición geométrica ordenada, normalmente en forma de red cúbica (Frenkel *and* Smit, 2001).

En el caso de nuestras simulaciones el comando *gmx insert molecules* inserta las moléculas de bacterioclorofila aleatoriamente y se garantiza que las posiciones no se solapen ya que no se insertan moléculas a una distancia menor a la suma del radio de Van der Waals de los átomos existentes en la caja y los que se insertan. (Retrieved June 17, 2023 from <https://manual.gromacs.org/current/onlinehelp/gmx-insert-molecules.html>)

Al añadir el agua en la caja de simulación con el comando *gmx solvate* se opera de igual forma que con el comando *gmx insert molecules*, el solvente por defecto es una molécula de agua con un punto de carga simple (*Simple Point Charge water*) y las posiciones de inserción viene dadas por una librería de GROMACS `$GMXLIB/spc216.gro`. (Retrieved June 17, 2023 from <https://manual.gromacs.org/current/onlinehelp/gmx-solvate.html>)

2.3.2. Potencial de gromos

El modelo GROMOS 54A7 es un potencial de campo de fuerza para simulaciones de dinámica molecular de sistemas biomoleculares. Fue desarrollado como parte del paquete de simulación GROMOS y, como el paquete de simulación GROMACS, está diseñado específicamente para estudiar proteínas y ácidos nucleicos (Schmid *et al.*, 2011).

El modelo GROMOS 54A7 proviene del campo de fuerza GROMOS 53A6 al que se han aplicado modificaciones. Trabaja en el ámbito de la dinámica molecular, por lo que utiliza las ecuaciones de la mecánica clásica para describir las interacciones entre los átomos en una molécula (Schmid *et al.*, 2011).

El potencial GROMOS 54A7 utiliza el potencial de Lennard-Jones para describir las interacciones de repulsión y atracción entre los pares de átomos y un potencial de Coulomb para describir las interacciones electrostáticas entre las cargas eléctricas (Schmid *et al.*, 2011). Los enlaces covalentes son modelados mediante un potencial armónico, los ángulos de enlace entre tres átomos consecutivos se describen también mediante un potencial armónico. Para describir la rotación alrededor de los enlaces diédricos se utiliza un potencial de torsión periódico (Schmid *et al.*, 2011).

2.3.3. Algoritmo para las ecuaciones de movimiento

El algoritmo Leap Frog, que es equivalente al Verlet, es el que ha sido empleado en las simulaciones de este trabajo. Este algoritmo evalúa las posiciones al final del paso de tiempo y velocidades a mitad del paso de tiempo, las posiciones y velocidades se actualizan usando las fuerzas calculadas con las posiciones en el momento t según las siguientes ecuaciones (Abraham *et al.*, 2015):

$$v(t + 1/2 \Delta t) = v(t - 1/2 \Delta t) + (\Delta t/m) * F(t) \quad (2.1)$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v * (t + 1/2 \Delta t) \quad (2.2)$$

Como el algoritmo Leap Frog viene del Verlet, este da lugar a trayectorias idénticas. Es destacable, sin embargo, que las velocidades no están definidas al mismo tiempo que las posiciones (Frenkel *and* Smit, 2001). Como consecuencia, la energía

potencial y cinética tampoco están definidas al mismo tiempo, y por eso no podemos calcular la energía total directamente en el algoritmo Leap Frog. Al igual que con el algoritmo de Verlet, este es reversible, lo cual quiere decir que al ir atrás en los pasos de simulación se puede llegar a la configuración de partida, esto ocurre porque las ecuaciones de movimiento de Newton en las que se basa el algoritmo Verlet, y por consiguiente el Leap Frog, son reversibles (Frenkel *and* Smit, 2001).

2.3.4. Colectivos utilizados

Colectivo canónico (NVT): En las simulaciones con moléculas de bacterioclorofila libre y formando un anillo se ha utilizado el colectivo canónico, la mayor parte de las propiedades que se suelen cuantificar en simulación molecular forman parte del colectivo canónico (NVT) con número de partículas, volumen y temperatura constante, para mantener la temperatura constante se acopla un termostato (Abraham *et al.*, 2015).

Colectivo isobárico-isotérmico (NPT): En la simulación en la que las bacterioclorofilas forman una bicapa se utiliza el colectivo gran canónico, en el que además de fijarse una temperatura constante, también se fija una presión constante. La presión constante se consigue haciendo que el volumen de la caja de simulación pueda cambiar (Abraham *et al.*, 2015).

2.3.5. Termostato

Con el objetivo de hacer la temperatura constante en las simulaciones se ha utilizado el termostato v-rescale o de re-escalado de la velocidad, este es una variación del termostato de Berendsen, por lo que en este apartado se explicarán ambos termostatos brevemente (Abraham *et al.*, 2015).

Como ya se ha mencionado en la introducción del apartado 2.3. *Parámetros de la simulación*, en dinámica molecular las propiedades físicas son expresadas por el momento y posición de las partículas, así, asignar una temperatura inicial al sistema, como en nuestro caso, es equivalente a asignar una energía cinética inicial a esas partículas (Frenkel *and* Smit, 2001).

El algoritmo de Berendsen imita las interacciones débiles con una cinética de primer orden que tendría el sistema al estar en contacto con un baño térmico a temperatura T_0 . El efecto de este algoritmo es la corrección de las desviaciones de la temperatura en el sistema, lo que hace que la desviación de la temperatura decaiga exponencialmente con el tiempo de acuerdo a la constante τ . En este termostato las fluctuaciones de la energía cinética se suprimen por lo que no se muestrea correctamente el colectivo canónico (Frenkel *and* Smit, 2001).

El termostato de re-escalado de la velocidad es esencialmente un termostato de Berendsen con un término estocástico adicional que asegura una distribución correcta de la energía cinética modificándola de la siguiente manera:

$$dK = (K_0 - K) * (dt/T_T) + 2 \sqrt{(KK_0 / N_f)} (dW/\sqrt{T_T}) \quad (2.3)$$

donde K es la energía cinética, N_f el número de grados de libertad y dW un proceso de Wiener. No hay parámetros adicionales, excepto una semilla/números aleatorios. Este termostato produce un colectivo canónico correcto y aún conserva las ventajas del termostato de Berendsen: decaimiento de primer orden de las desviaciones de la temperatura y sin oscilaciones (Abraham *et al.*, 2015).

En las simulaciones hemos fijado la temperatura a 298.0 K y el valor Tau es igual a 2.

2.3.6. Baróstato

En la simulación con bacterioclorofilas ordenadas en forma de bicapa se ha acoplado el baróstato de Berendsen y se ha simulado a 1 bar de presión.

El baróstato de Berendsen consiste en una relajación de primer orden de las coordenadas hacia una presión P_0 de referencia, para ello reescala las coordenadas y los vectores de la caja de simulación con cada paso de simulación de acuerdo con la siguiente matriz:

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - (n_{PC} * \Delta t / 3 T_P) * \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij}(t)\} \quad (2.4)$$

Donde β es la isoterma de compresibilidad del sistema y n_{PC} son los pasos de simulación tras los cuales se reescalan las coordenadas y vectores (Abraham *et al.*, 2015).

2.3.7. Restricción de enlaces

LINCS es un algoritmo que resetea los enlaces a su longitud correcta tras una actualización sin constricciones (Abraham *et al.*, 2015).

El método no es iterativo, ya que siempre usa dos pasos. Aunque LINCS está basado en matrices, no se necesitan multiplicaciones de matrices. El método es más estable y rápido que SHAKE, pero solo puede usarse con limitaciones en los enlaces y ángulos limitados aislados (Abraham *et al.*, 2015).

El algoritmo consta de dos etapas. En la primera se resetean a cero las proyecciones de los enlaces nuevos sobre los viejos. En la segunda etapa se

corrigen las longitudes de los enlaces alteradas por la rotación (Abraham *et al.*, 2015).

2.3.8. Minimización de la energía en GROMACS

Para minimizar la energía en las simulaciones se ha utilizado el método *Steepest Descent*, en el cual se evalúa la energía en un número de pasos de simulación dados, que son determinados por el simulador (Abraham *et al.*, 2015).

Las coordenadas de todas las partículas vienen dadas por el vector r . Inicialmente se da un valor h_0 para el desplazamiento de las partículas, con estos valores se calculan las primeras fuerzas y energías potenciales (Abraham *et al.*, 2015). A partir de ahí las posiciones se calculan utilizando la siguiente ecuación:

$$r_{n+1} = r_n + (F_n / \max(|F_n|)) * h_n \quad (2.5)$$

Donde h_n es el desplazamiento máximo, F_n es la fuerza, $\max(|F_n|)$ es el mayor valor absoluto de las fuerzas, r_{n+1} es la nueva posición y r_n es la posición de partida (Abraham *et al.*, 2015).

Tras calcular las nuevas posiciones, también se calculan de nuevo las fuerzas y energías potenciales (Abraham *et al.*, 2015):

Si $V_{n+1} < V_n$ se aceptan las nuevas posiciones y $h_{n+1} = 1,2 * h_n$

Si $V_{n+1} \geq V_n$ se rechazan las nuevas posiciones y $h_n = 0,2 * h_n$

2.3.9. gmx rdf

El comando *gmx rdf* calcula la función de distribución radial de un conjunto de posiciones escogidas como referencia. (Retrieved June 25, 2023 from <https://manual.gromacs.org/current/onlinehelp/gmx-rdf.html#gmx-rdf>)

2.3.10. gmx density

El comando *gmx density* calcula las densidades parciales a lo largo de la caja de simulación valiéndose de un archivo con los índices de las partículas. El cálculo a lo largo del eje Z de la caja va desde $-bZ/2$ hasta $bZ/2$ si el centro está en el sistema en conjunto. Las densidades calculadas están en kilogramos / metro³. (Retrieved June 25, 2023 from <https://manual.gromacs.org/current/onlinehelp/gmx-density.html>)

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Simulación de moléculas de bacterioclorofila a libres en agua

3.1.1. Distribución radial del agua respecto a las bacterioclorofilas

En las simulaciones de moléculas de bacterioclorofila libres en agua, se han insertado en una caja un número creciente de moléculas de bacterioclorofila, no tenían ninguna disposición concreta inicial, el único requisito es el de inserción del comando *gmx insert molecules*, visto en el capítulo 2.

Con el objetivo de ver la distribución de las moléculas de agua al final de la simulación se realizó un perfil de la distribución radial de las moléculas de agua respecto al átomo de magnesio presente en el anillo de la bacterioclorofila, posteriormente este perfil fue representado con el programa GRACE. En la figura 2 se muestra dicho perfil.

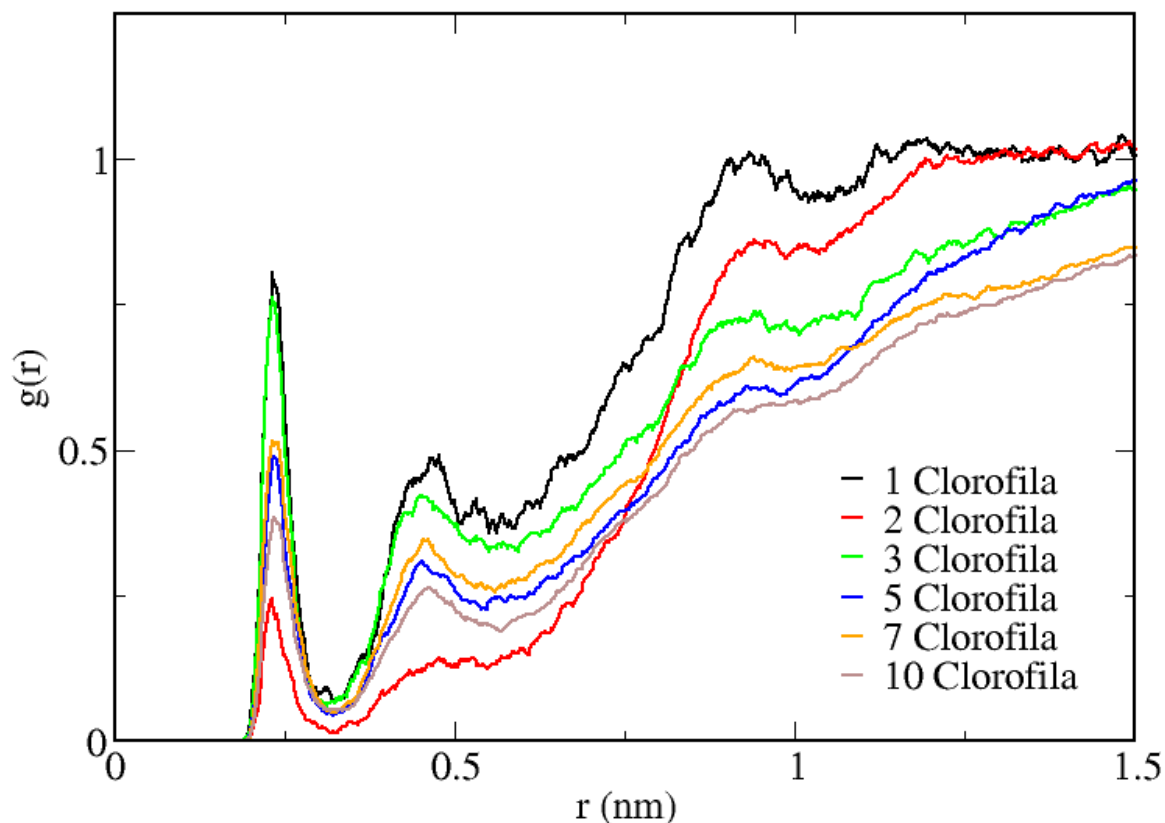


Figura 2. Perfil de distribución radial del agua respecto al magnesio de las moléculas de bacterioclorofila a. En esta gráfica se muestra el perfil de distribución radial tridimensional del agua respecto al átomo de magnesio de la bacterioclorofila a, para mayor claridad sólo se han representado algunos casos. En el eje X r es la distancia en nanómetros desde el átomo de magnesio

hasta las moléculas de agua, en el eje Y $g(r)$ es la distribución radial de moléculas de agua en función de la distancia r .

Como se puede apreciar, al aumentar el número de bacterioclorofilas en la simulación, la distancia a la que se puede encontrar una molécula de agua cerca de un átomo de magnesio aumenta, es decir, las moléculas de agua que rodean a cada molécula de bacterioclorofila disminuyen. Al reducir la relación superficie/volumen el número de moléculas de agua desplazadas también se reduce, por tanto, la agregación de moléculas de bacterioclorofila en el medio acuoso conduce a una disposición con menor energía que si las bacterioclorofilas estuviesen separadas. Se favorecen los agregados de bacterioclorofila. Cabe destacar, que el empaquetamiento de las clorofilas parece óptimo en el caso del dímero, ya que se reduce el primer máximo y esto indicaría que muy pocas moléculas de agua pueden acercarse al entorno del anillo de porfirina.

3.1.2. Disposición de las bacterioclorofilas en el medio acuoso

Para ver en detalle la disposición de las bacterioclorofilas y de sus componentes en el medio con agua se han modelado con el programa VMD los archivos de salida confout.gro de cada simulación.

En la figura 3 se representa la conformación espacial que adopta una molécula de bacterioclorofila en un medio con agua. La cola hidrofóbica se pliega sobre el anillo e interactúa con este en lugar de con el agua.

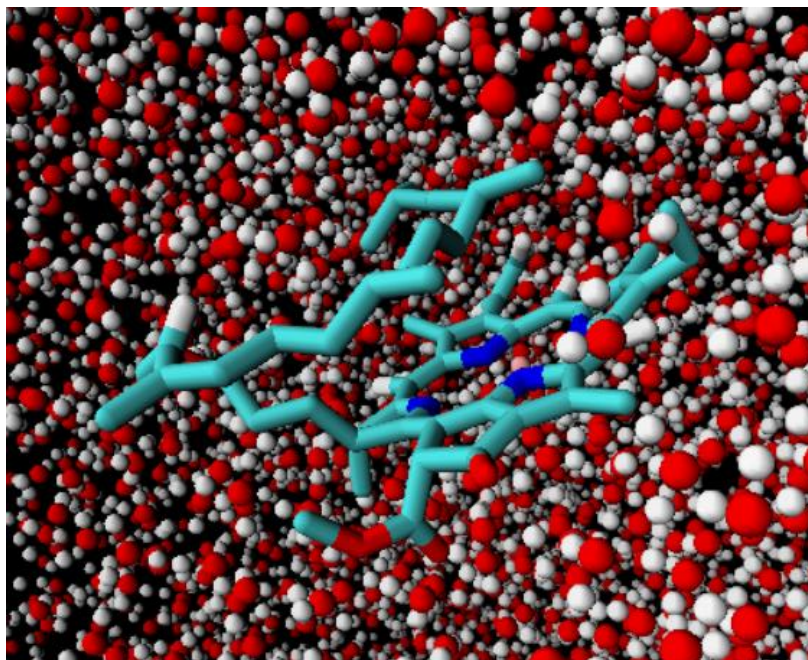


Figura 3. Simulación de una molécula de bacterioclorofila a en agua. Se muestra el resultado de la simulación con una única molécula de bacterioclorofila. Figuras realizadas con el software VMD

(Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AChalky.

En la figura 4 se representa el resultado de simular dos moléculas de bacterioclorofila en agua. Los anillos se disponen de forma escalonada y las cadenas hidrofóbicas se curvan sobre estos, minimizando su contacto con el agua.

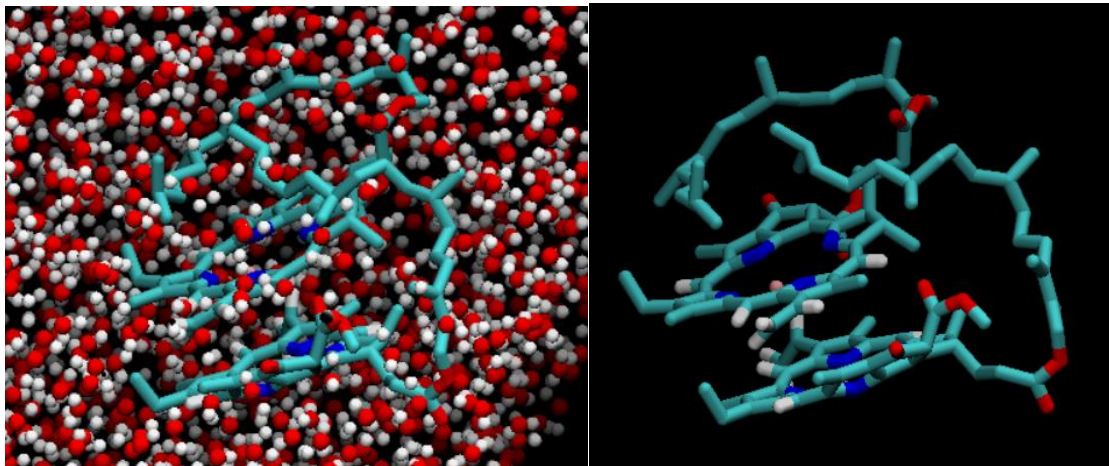


Figura 4. Simulación de dos moléculas de bacterioclorofila a en agua. A la izquierda se muestra el resultado de la simulación completa, a la derecha se ha ocultado el agua para mejor visualización de la disposición de las bacterioclorofilas. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AChalky.

En la figura 5 se muestra la simulación de tres bacterioclorofilas en agua. Las colas apolares se orientan hacia el interior, interactuando entre ellas mientras que los anillos las rodean formando un triángulo.

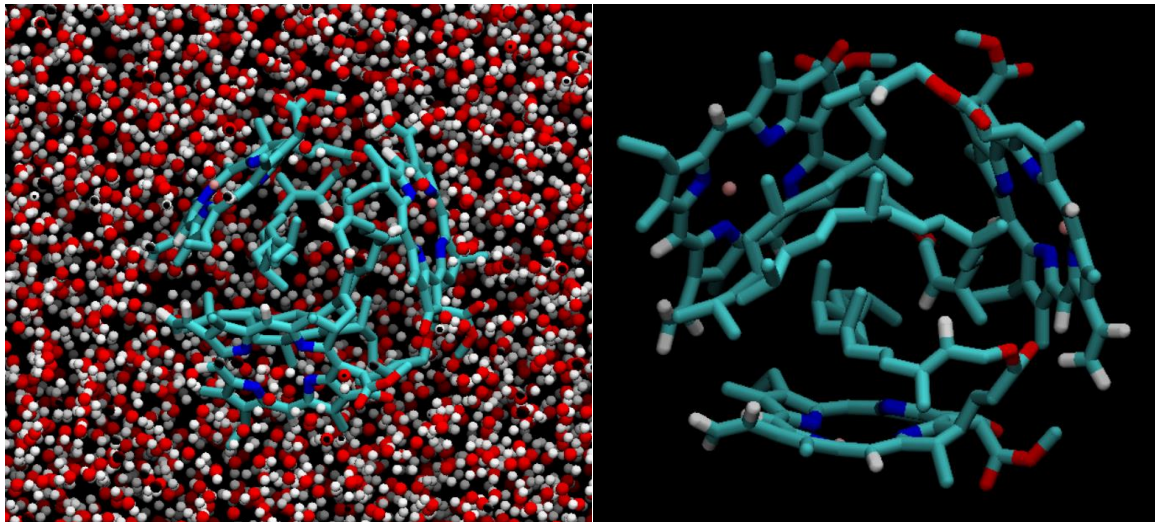


Figura 5. Simulación de tres moléculas de bacterioclorofila a en agua. A la izquierda se muestra el resultado de la simulación completa, a la derecha se ha ocultado el agua para mejor visualización de la disposición de las bacterioclorofilas. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOCchalky.

En la figura 6 se ve la simulación con cuatro clorofilas en medio con agua. Las cadenas aporares se orientan hacia el centro, más alejadas del agua, hay apilamiento de dos anillos de bacterioclorofila y las cadenas también interactúan con los anillos. Se distingue que los anillos que rodean las cadenas forman un triángulo.

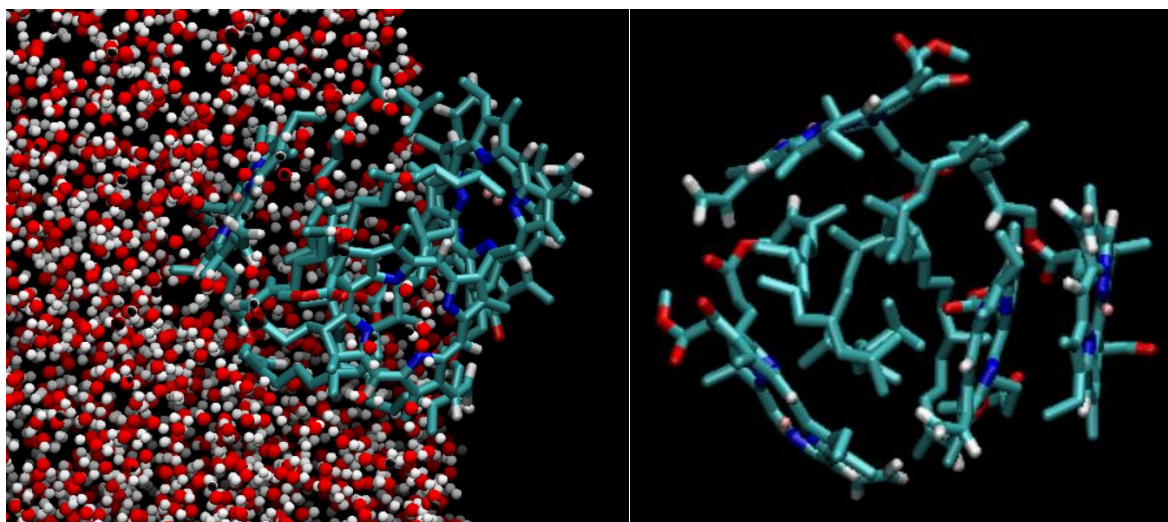


Figura 6. Simulación de cuatro moléculas de bacterioclorofila a en agua. A la izquierda se muestra el resultado de la simulación completa, a la derecha se ha ocultado el agua para mejor visualización de la disposición de las bacterioclorofilas. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el

agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOChalky.

En la figura 7 se muestra el resultado de simular cinco moléculas de bacterioclorofila a en agua. Se puede ver que se han agrupado en un único sitio, con las colas hidrofóbicas orientadas hacia el interior de la estructura, alejadas del agua e interactuando entre sí. Se aprecia el apilamiento de los anillos de tres bacterioclorofilas y cómo el triángulo de anillos sigue apareciendo.

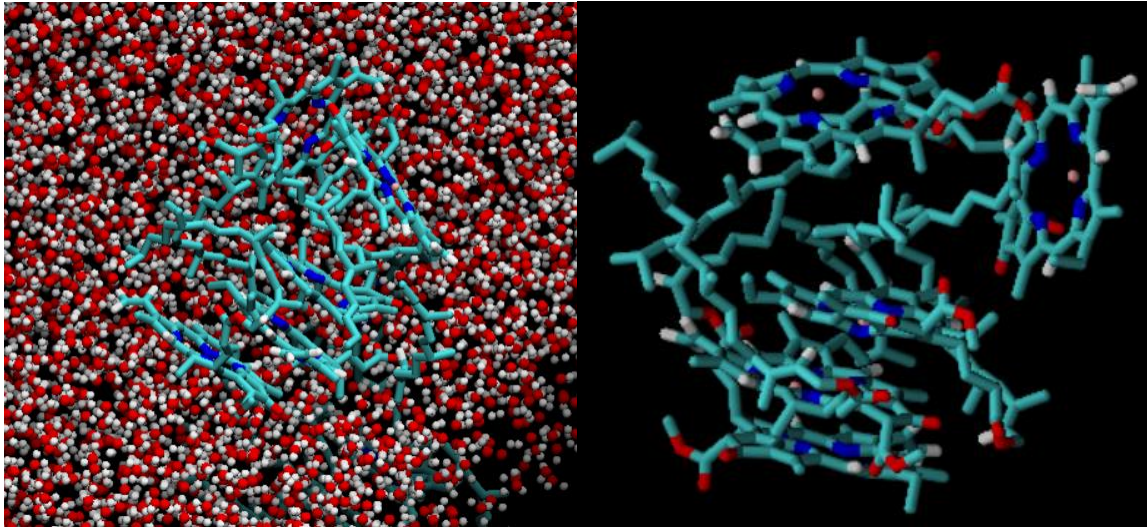


Figura 7. Simulación de cinco moléculas de bacterioclorofila a en agua. A la izquierda se muestra el resultado de la simulación completa, a la derecha se ha ocultado el agua para mejor visualización de la disposición de las bacterioclorofilas. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOChalky.

En la figura 8 se muestra la disposición de seis moléculas de bacterioclorofila. Se ve un apilamiento de dos anillos. En la parte superior de la imagen de la derecha tres anillos se disponen en triángulo. Las cadenas hidrofóbicas se orientan hacia el interior del agregado.

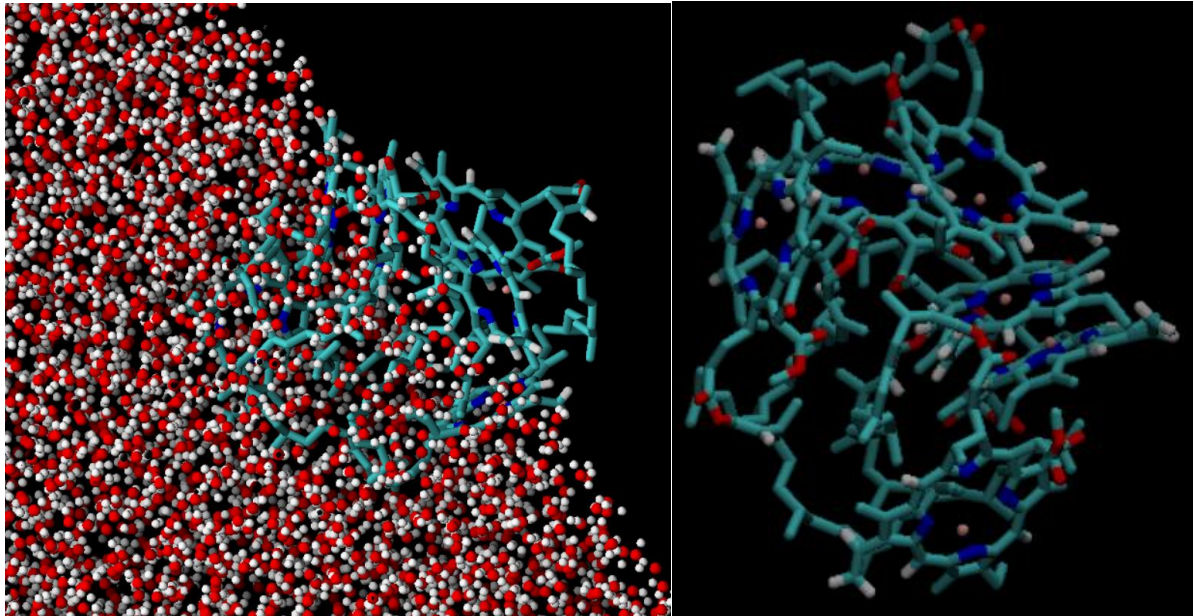


Figura 8. Simulación de seis moléculas de bacterioclorofila a en agua. A la izquierda se muestra el resultado de la simulación completa, a la derecha se ha ocultado el agua para mejor visualización de la disposición de las bacterioclorofilas. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOCchalky.

En la figura 9 se muestra la disposición de siete bacterioclorofilas en agua. Al igual que en las simulaciones anteriores, se distinguen apilamientos de dos anillos, en la imagen de la derecha se ven en la parte inferior y en la parte derecha del agregado de bacterioclorofilas. Las cadenas que no llegan a estar rodeadas por los anillos interactúan con otras cadenas y con los anillos, de esta forma rodean el conjunto en lugar de exponerse fuera de este e interactúan con el agua.

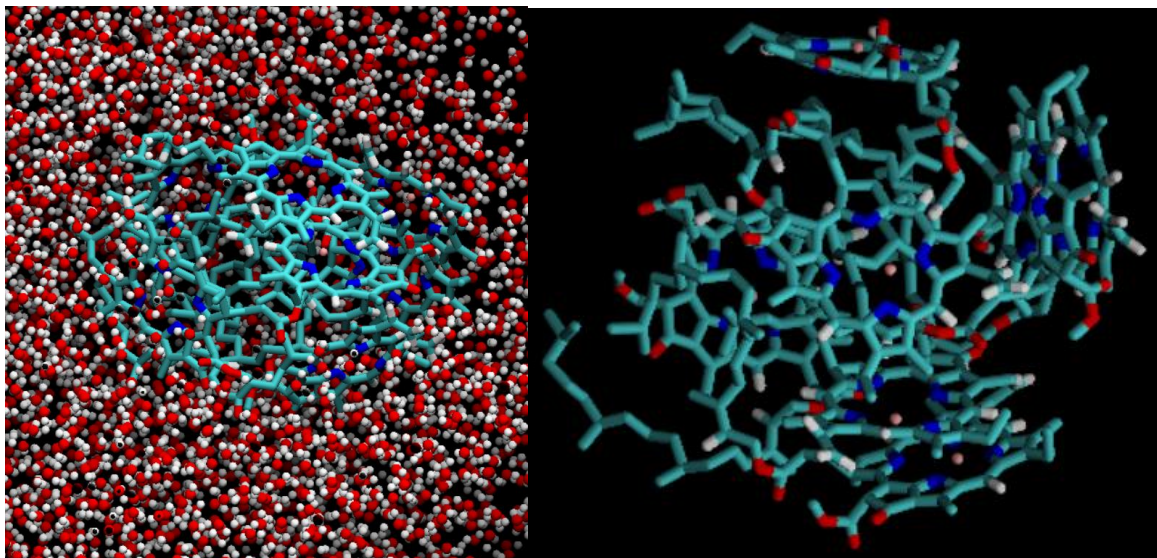


Figura 9. Simulación de siete moléculas de bacterioclorofila a en agua. A la izquierda se muestra el resultado de la simulación completa, a la derecha se ha ocultado el agua para mejor visualización de la disposición de las bacterioclorofilas. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOCchalky.

En la figura 10 se muestra la disposición que adoptan ocho moléculas de bacterioclorofila en agua. En la imagen de la derecha se ven apilamientos en las partes inferior y superior derechas, aunque al rotar el agregado se ven otros apilamientos. Como se ve en la imagen de la izquierda, la mayor parte de las cadenas hidrofóbicas están en el interior del agregado y el contacto con el agua es mínimo.

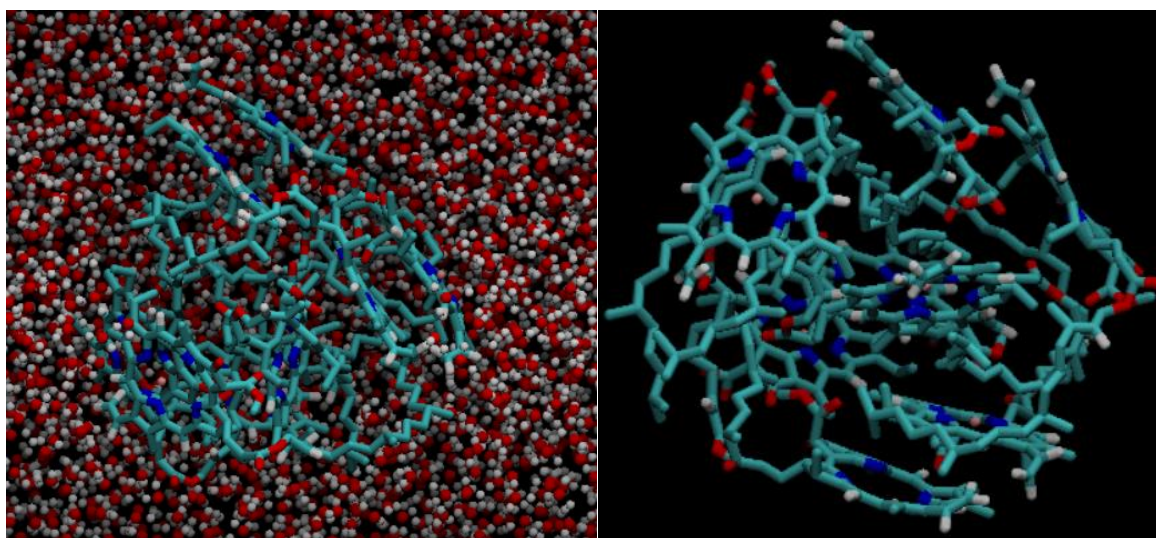


Figura 10. Simulación de ocho moléculas de bacterioclorofila a en agua. A la izquierda se muestra el resultado de la simulación completa, a la derecha se ha ocultado el agua para mejor visualización de la disposición de las bacterioclorofilas. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOCchalky.

En la figura 11 se representa la disposición de nueve bacterioclorofilas en agua. Con la mayor parte de los anillos hacia afuera y las cadenas hacia adentro del agregado.

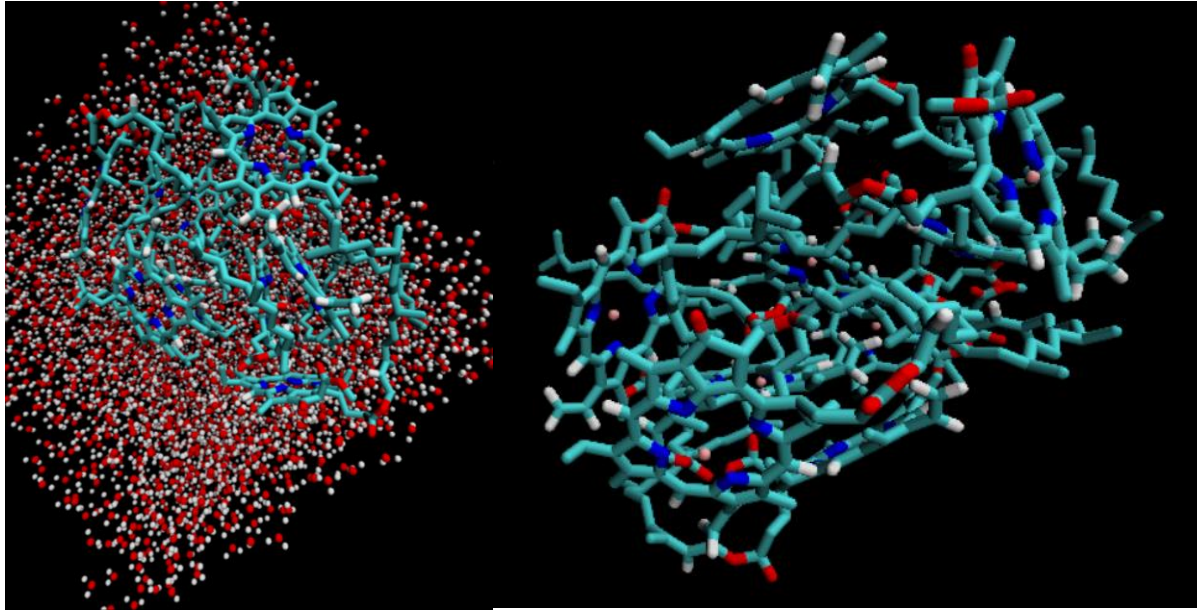


Figura 11. Simulación de nueve moléculas de bacterioclorofila a en agua. A la izquierda se muestra el resultado de la simulación completa, a la derecha se ha ocultado el agua para mejor visualización de la disposición de las bacterioclorofilas. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOChalky.

En la figura 12 se muestra la disposición de diez moléculas de bacterioclorofila en agua. En la imagen inferior se aprecian apilamientos de dos en dos anillos, las cadenas que no quedan ocultas por los anillos interaccionan entre sí o con los anillos directamente. La disposición en este caso es más alargada que en los otros, donde los agregados tenían formas globulares.

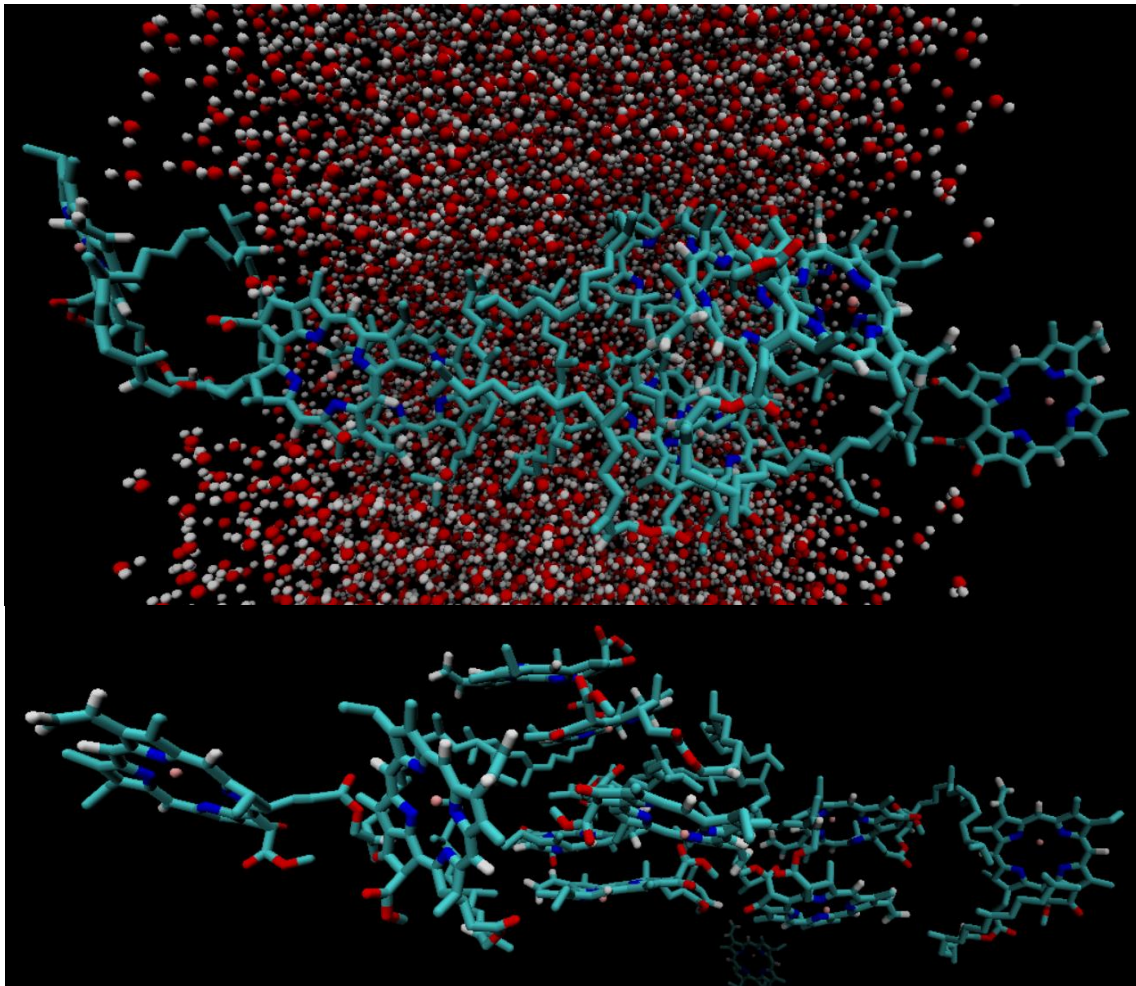


Figura 12. Simulación de diez moléculas de bacterioclorofila a en agua. Arriba se muestra el resultado de la simulación completa, abajo se ha ocultado el agua para mejor visualización de la disposición de las bacterioclorofilas. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOChalky.

El comportamiento visto en estas simulaciones de bacterioclorofila libre sugiere que la cadena apolar tiene un carácter hidrofóbico muy fuerte, mucho más que el de los anillos. Esto entra dentro de lo esperado, ya que el coeficiente de reparto del anillo es de 3,7 (NCBI (2023). PubChem CID 65106, Chlorin), mientras que el coeficiente de reparto de la cola de fitol es de 8,2 (NCBI (2023). PubChem CID 5280435, Phytol). Las cadenas por tanto interaccionan entre sí y con los anillos mediante fuerzas de Van der Waals.

Se ha visto en todas las representaciones de las simulaciones la presencia de anillos apilados, sin embargo, estos anillos no están totalmente en paralelo, sino de forma escalonada, debido a la carga parcial positiva de los hidrógenos y a la carga parcial negativa de los carbonos que forman el macrociclo de porfirina. De estar totalmente en paralelo ocurrirían fenómenos de repulsión eléctrica, la disposición escalonada

orienta los anillos de forma que las cargas parciales positivas y negativas interactúan, generando una leve fuerza de atracción (Carter-Fenk *and* Herbert, 2020).

El átomo de magnesio en el centro del anillo de la bacterioclorofila tiene una carga positiva $2+$, esto junto con la repulsión de los anillos cuando están totalmente paralelos, es decir, sus cargas positivas y negativas están alineadas, podría explicar la formación de trímeros triangulares de anillos de bacterioclorofila.

Dicha forma triangular puede deberse a las fuerzas de Van der Waals, al alineamiento de las cargas positivas de un anillo con las negativas de otro (atracción) y la repulsión de los magnesios entre sí por su carga positiva.

3.2. Simulación de moléculas de bacterioclorofila a formando anillo en agua

En esta simulación las moléculas de bacterioclorofila están libres en el medio con agua, sin embargo, parten de una disposición inicial en círculo, en concreto son 160 moléculas con sus macrociclos de porfirina escalonados y las cadenas hidrofóbicas hacia afuera en contacto con el agua.

3.2.1. Disposición de las bacterioclorofilas respecto al centro de la caja al cabo de la simulación

Dado que las moléculas de bacterioclorofila están libres y con los datos de las simulaciones anteriores, sabemos que con un tiempo de simulación suficiente el anillo entero se desharía, quedando solamente agregados como los vistos en la sección anterior.

Con el objetivo de averiguar el desordenamiento ocurrido durante el tiempo de simulación se ha realizado un perfil de densidad en dos dimensiones, que parte del centro de la caja de simulación y la recorre en un círculo paralelo al círculo de bacterioclorofilas. Este perfil de densidad se muestra en la figura 13.

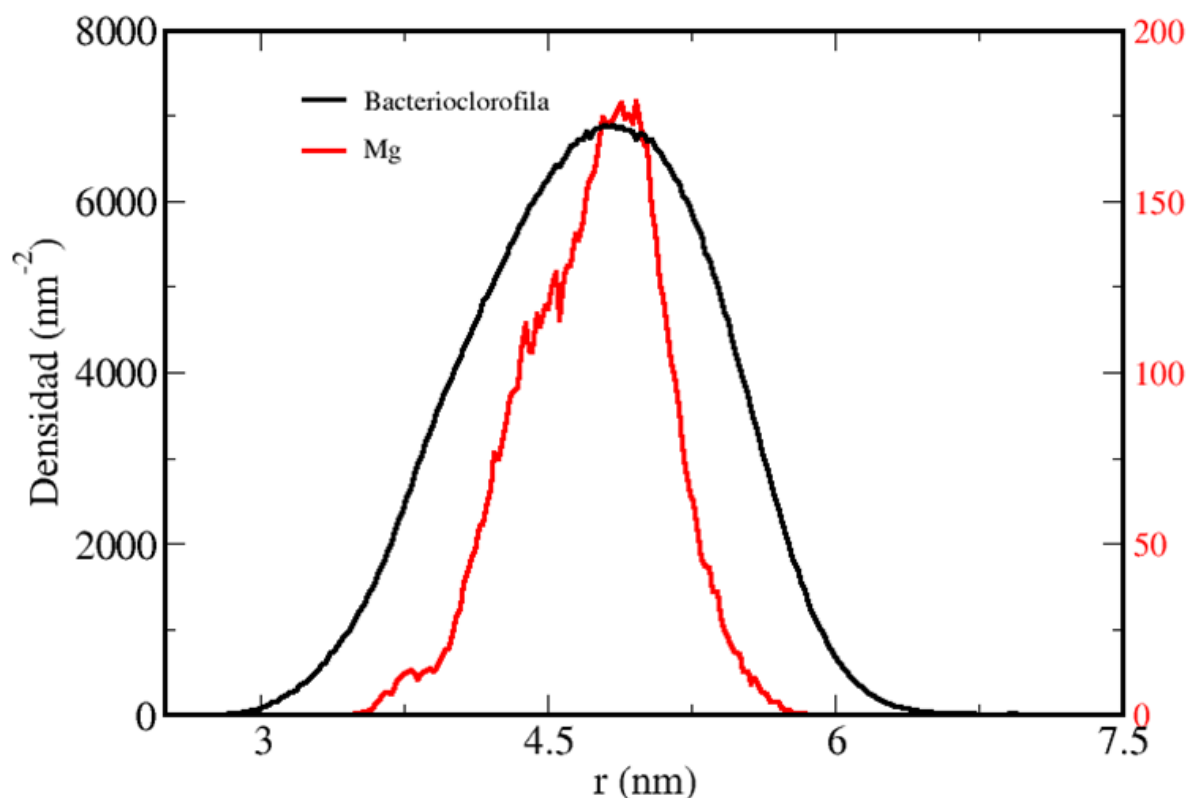


Figura 13. Perfil de densidad de la bacterioclorofila a, tras la simulación del anillo de bacterioclorofilas libres. En perfil se ha realizado de forma radial, desde el centro del anillo. En el eje X r es la distancia en nanómetros desde el centro de a caja hasta el átomo de magnesio, o la bacterioclorofila, en el eje Y la densidad de moléculas se mide en $\text{kg/m}^3 \cdot \text{nm}^{-2}$ y es función de la distancia r . En rojo se muestra el perfil de densidad del ion magnesio de la bacterioclorofila, su densidad se mide en la escala de la derecha. En negro se muestra el perfil de densidad de la molécula de bacterioclorofila, su densidad se mide en la escala de la izquierda.

En la figura 13 se representa el perfil de densidad, medido de una manera radial, de la distribución final de las bacterioclorofilas que partieron de una disposición en anillo. Se aprecia que la mayor parte de las bacterioclorofilas están a unos 5 nanómetros del centro de la caja, esto se ve tanto en la densidad de bacterioclorofila como en el pico de magnesio.

Las posiciones iniciales estaban perfectamente ordenadas y sus perfiles no mostrarían el ensanchamiento gaussiano que se ven en la figura 13, sobre todo en los magnesios. De dichas oscilaciones podemos suponer que ha ocurrido un desordenamiento de la estructura, y al estar las bacterioclorofilas como molécula en global casi en las mismas posiciones ordenadas, indica el reordenamiento de los componentes de la bacterioclorofila sin que haya desplazamiento, esto también se ve en el desordenamiento de los magnesios, que indica una reorientación de los macrociclos de porfirina.

3.2.2. Disposición espacial de las bacterioclorofilas al comienzo y al cabo de la simulación

Para visualizar las diferencias entre la disposición de partida y la final se han tomado imágenes con el programa VMD.

En la figura 14 se puede apreciar la diferencia entre la disposición de partida (izquierda) y la final (derecha). Las cadenas hidrofóbicas que estaban expuestas se han replegado hacia los anillos y los anillos han dejado de estar alineados y ordenados. Tal y como se observó en la figura 13, no ha habido ningún desplazamiento de las moléculas por completo, sino una reordenación de los macrociclos y cadenas.

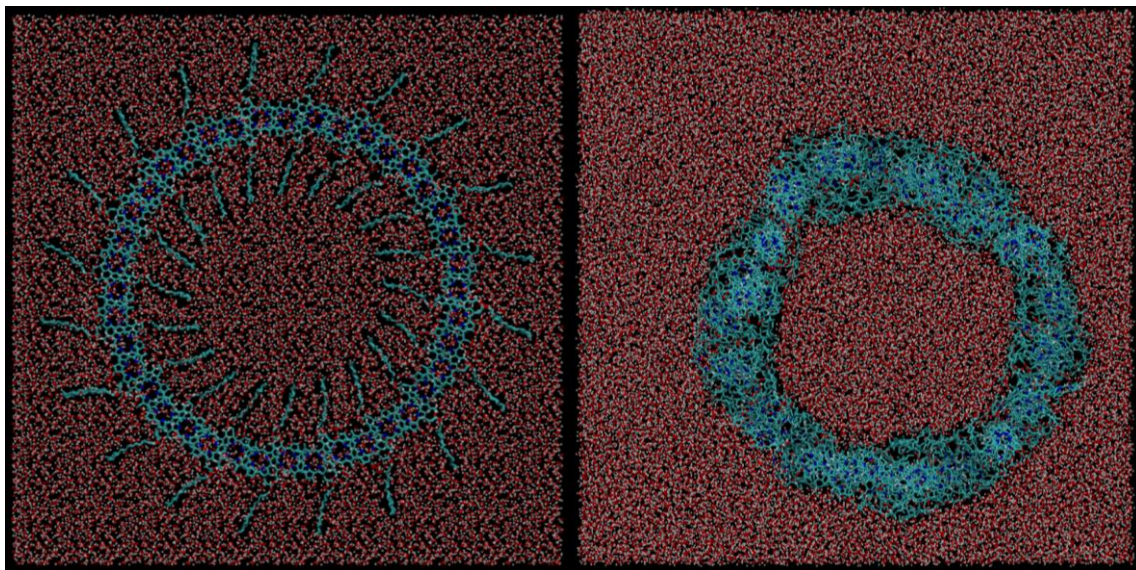


Figura 14. Simulación del anillo de bacterioclorofila a libre en agua. A la izquierda se muestra la disposición inicial de las bacterioclorofilas en la simulación, a la derecha se muestra la disposición al final de bacterioclorofilas en la simulación. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOCchalky.

En la figura 15 se muestra una vista lateral de la caja, al comienzo (arriba) y al final (abajo) de la simulación. Los anillos pasan de estar ordenados de forma escalonada a dispersarse, las cadenas dejan de estar paralelas al plano del círculo de bacterioclorofilas e interactúan con los anillos.

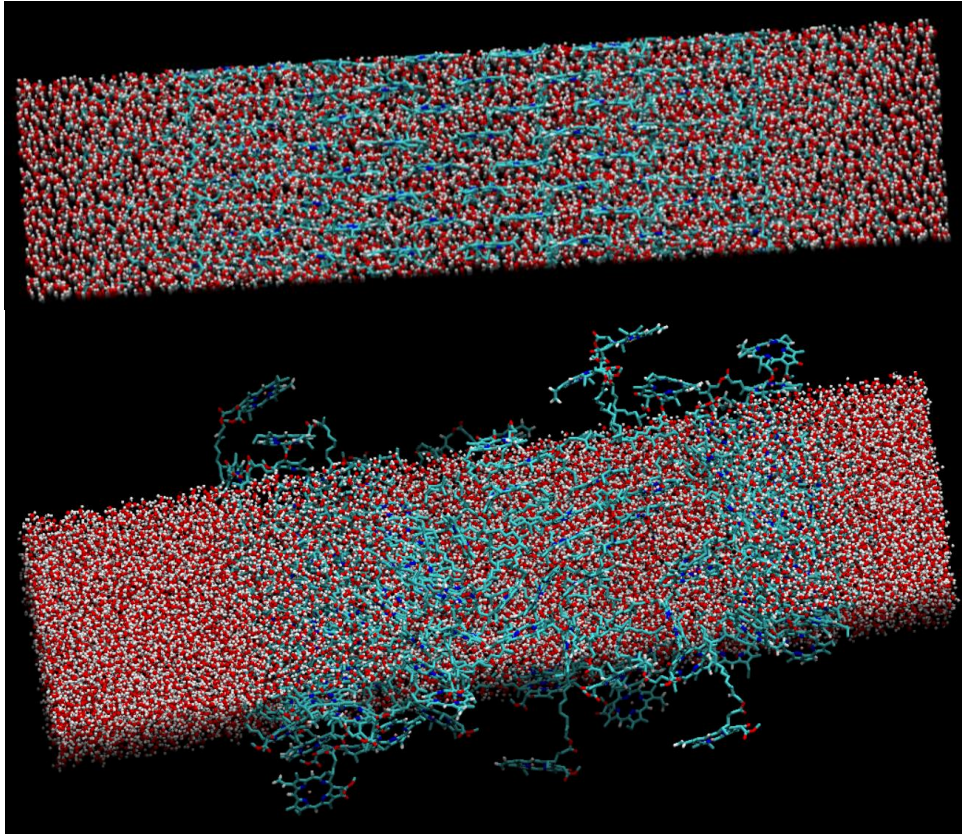


Figura 15. Simulación del anillo de bacterioclorofila a libre en agua, vista lateral. Arriba se muestra la disposición inicial de las bacterioclorofilas en la simulación, abajo se muestra la disposición al final de bacterioclorofilas en la simulación. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOChalky.

En la figura 16 se muestran la disposición inicial (arriba) y final (abajo) del círculo de bacterioclorofilas, se ha ocultado el agua para mayor claridad. Se puede ver cómo las cadenas hidrofóbicas pasan de estar en contacto con el agua a interactuar con los anillos, en los anillos se distinguen los apilamientos vistos en la sección anterior.

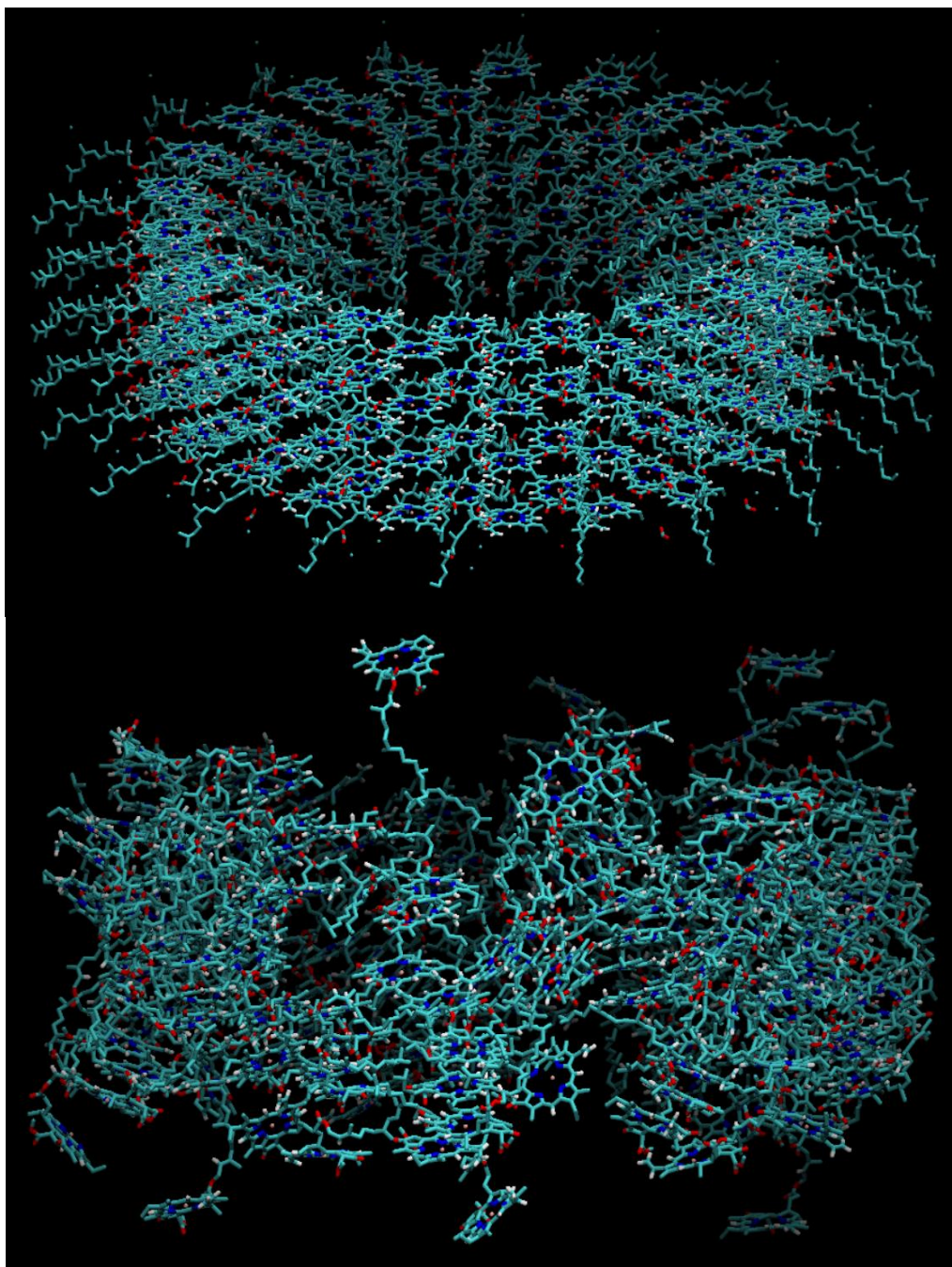


Figura 16. Disposición inicial y final de las bacterioclorofilas en anillo, con el agua oculta.

Arriba se muestra la disposición inicial de las bacterioclorofilas en la simulación, abajo se muestra la disposición al final de bacterioclorofilas en la simulación. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOChalky.

Ya que las moléculas de bacterioclorofila están libres y el medio sigue siendo agua tiene sentido que se repita el comportamiento observado en las simulaciones anteriores. Este comportamiento incluye la repulsión entre los magnesios, los ordenamientos de los macrociclos de forma escalonada o perpendicular y la

interacción de las cadenas entre ellas y con los anillos, de acuerdo a su alta hidrofobicidad.

A continuación compararemos el comportamiento de la bacterioclorofila a visto en esta simulación con una estructura natural de captación de luz: los clorosomas.

Los clorosomas forman cilindros de bacterioclorofilas altamente ordenados capaces de transmitir excitones deslocalizados (Li *et al.*, 2018), como vimos en la introducción el orden es crucial para la transferencia eficiente de la energía (Nelson *and Cox*, 2014). En los clorosomas, el cuerpo principal presenta autoensamblaje de las bacterioclorofilas en un medio con agua y sin una asociación con proteínas que estabilicen la estructura.

El comportamiento de la bacterioclorofila a en esta simulación y el de las bacterioclorofilas c/d/e en la naturaleza difiere enormemente, a pesar de partir de una disposición similar a la de las moléculas de bacterioclorofila en el clorosoma. Esto se debe a las diferencias químicas entre la bacterioclorofila a y las constituyentes del clorosoma.

Las moléculas de bacterioclorofila c/d/e solamente difieren en algunos grupos funcionales, y se pueden modelar como un anillo rígido y una cola flexible de farnesilo (Li *et al.*, 2018). En el clorosoma, las bacterioclorofilas apiladas están estabilizadas por la interacción coordinada entre los átomos de Mg y O, los puentes de hidrógeno y el apilamiento π - π de los anillos. La bacterioclorofila a no forma parte del cuerpo principal de los clorosomas y no tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno (Li *et al.*, 2018).

Dada esta información se entiende que la capacidad de formar puentes de hidrógeno de las bacterioclorofilas c/d/e es lo que hace posible el autoensamblaje y el mantenimiento de la estructura altamente ordenada en el agua. Por tanto, la bacterioclorofila a necesitaría de proteínas u otro tipo de molécula que estabilizara su disposición ordenada en ambientes acuosos.

3.3. Simulación de moléculas de bacterioclorofila a confinadas entre dos bicapas

En esta simulación las moléculas de bacterioclorofila se situaban formando una bicapa, de manera que los macrociclos estaban alienados escalonadamente, los magnesios seguían un patrón ordenado en zigzag y las cadenas hidrofóbicas estaban orientadas hacia afuera y asociadas al surfactante CTAB. Toda esta estructura estaba rodeada de agua.

3.3.1. Perfil de densidad de la bicapa al cabo de la simulación

Para determinar si a lo largo del tiempo de simulación ha ocurrido la desestabilización de la estructura que forma el agregado complejo, se han calculado los perfiles de densidad de varias especies. Este perfil de densidad está hecho siguiendo un eje perpendicular al plano que forma la doble bicapa que confina a las moléculas de clorofila, se genera así un perfil simétrico que se puede ver en la figura 17.

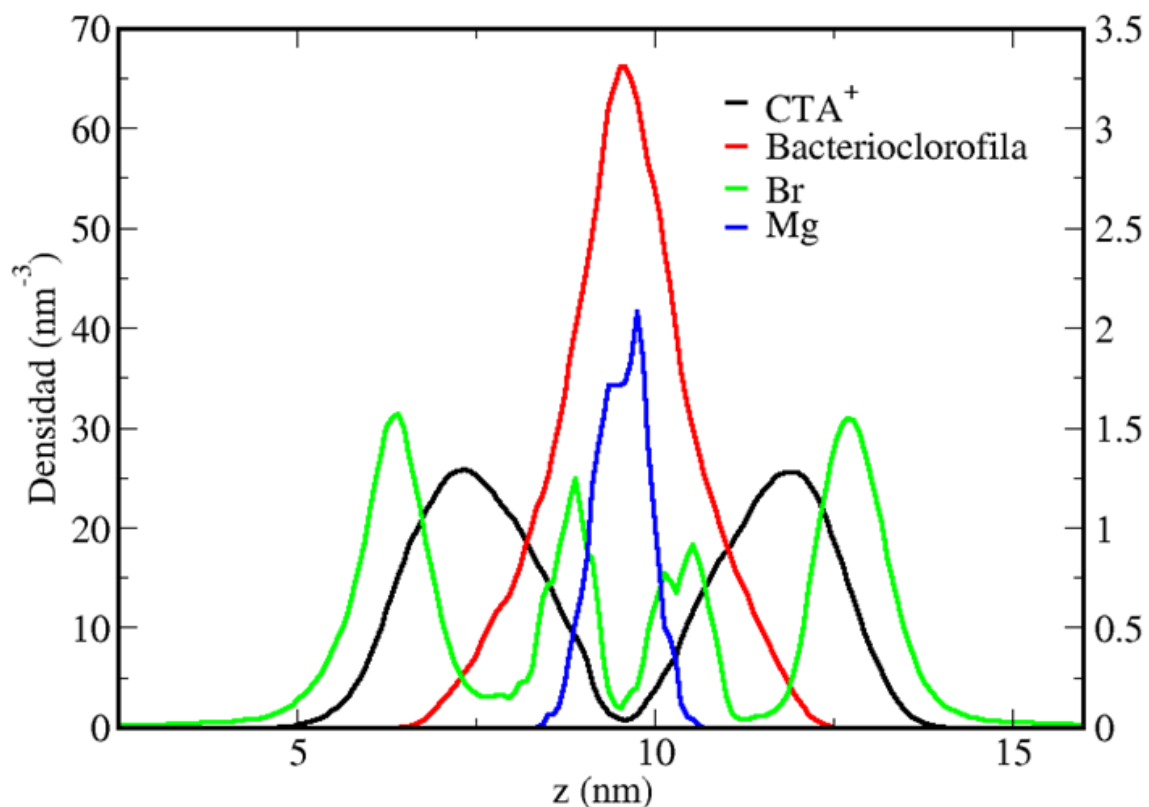


Figura 17. Perfil de densidad de la bicapa al cabo de la simulación. En perfil se ha realizado en las tres dimensiones, recorriendo un eje que pasa por el plano perpendicular al plano de las bicapas. En el eje X está la distancia recorrida en la caja en nanómetros, en el eje Y está la densidad en $\text{kg/m}^3 \cdot \text{nm}^{-3}$. En rojo se representa el perfil de densidad de las moléculas de bacterioclorofila a. En negro el perfil de densidad del detergente. En verde el perfil de densidad del bromo y en azul el del magnesio. La densidad del magnesio y del bromo se mide en la escala de la derecha, la densidad de la bacterioclorofila y del detergente se mide en la escala de la izquierda.

En la figura 17 se puede ver el perfil de densidad del CTA obtenido durante toda la simulación. Los perfiles son simétricos porque el CTA está a ambos lados de la monocapa de clorofilas. El ensanchamiento que se aprecian en los bromos es debido a que los iones bromo pasan a la disolución siguiendo la estructura de una doble capa eléctrica.

El perfil de clorofila aparece en un único pico. Presenta bajas fluctuaciones la debido a que la fase de clorofila permanece estable debido al confinamiento entre las dos bicapas de CTA. La disposición de los iones magnesio aparece céntrica dentro del perfil de clorofilas y es debido a que los anillos porfirínicos se reorientan, pero permanecen bastante alineados en la monocapa de la bacterioclorofila.

Como se ha discutido anteriormente, los magnesios de los macrociclos se repelen entre sí, así mismo, los propios macrociclos tienden a orientarse de forma escalonada o perpendicular, esto explica el reordenamiento de los macrociclos.

3.3.2. Disposición de la bicapa de bacterioclorofilas al cabo de la simulación

Como en las simulaciones anteriores, utilizamos VMD para visualizar el resultado de la simulación con los archivos conf.gro y confout.gro.

En la figura 18 se muestra la disposición inicial (izquierda) y final (derecha) de la simulación de bacterioclorofilas en bicapa. Se ve que al final de la simulación la disposición, aunque menos ordenada, ha conservado las moléculas extendidas, sin formar agregados.

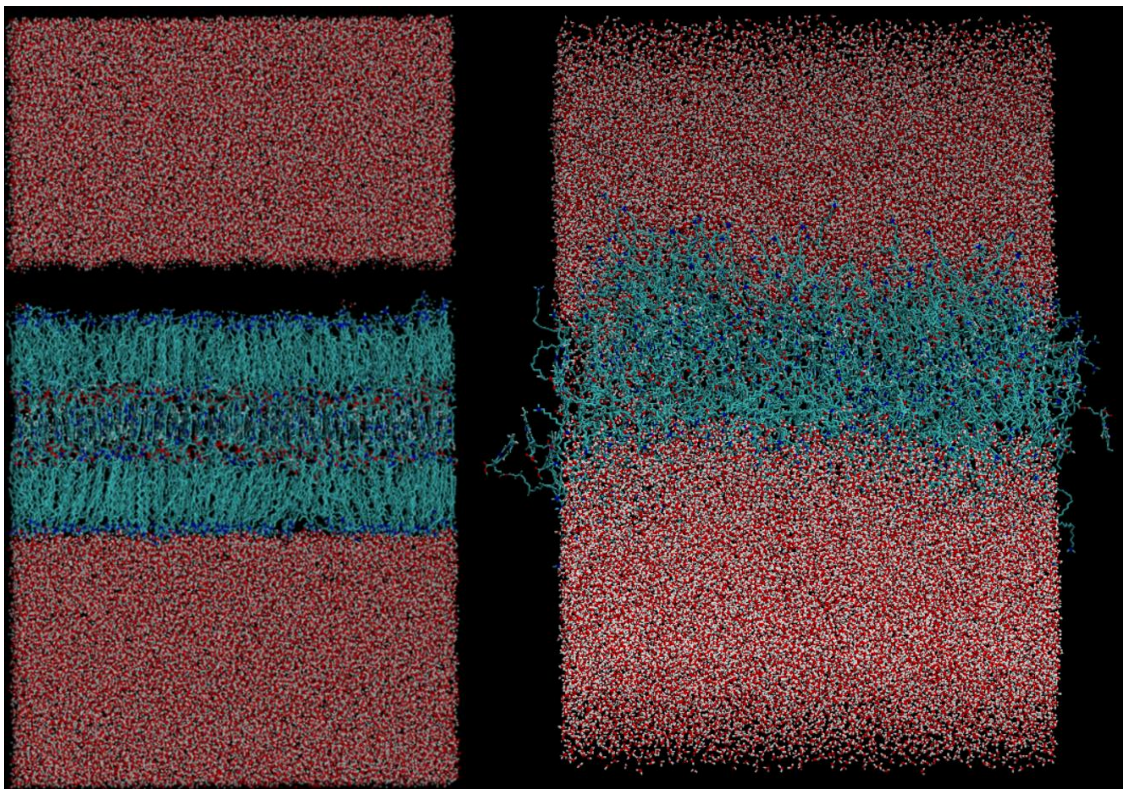


Figura 18. Simulación de la bicapa de bacterioclorofila a y detergente en agua. A la izquierda se muestra la disposición inicial de las bacterioclorofilas en la simulación, a la derecha se muestra la disposición al final de bacterioclorofilas en la simulación. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el

agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOChalky.

En la figura 19 se representa una vista lateral de la caja de simulación al inicio (arriba) y al final (abajo). Al cabo de la simulación podemos ver que la parte más desordenada de la bicapa es la central, en la que los macrociclos se han reorientado.

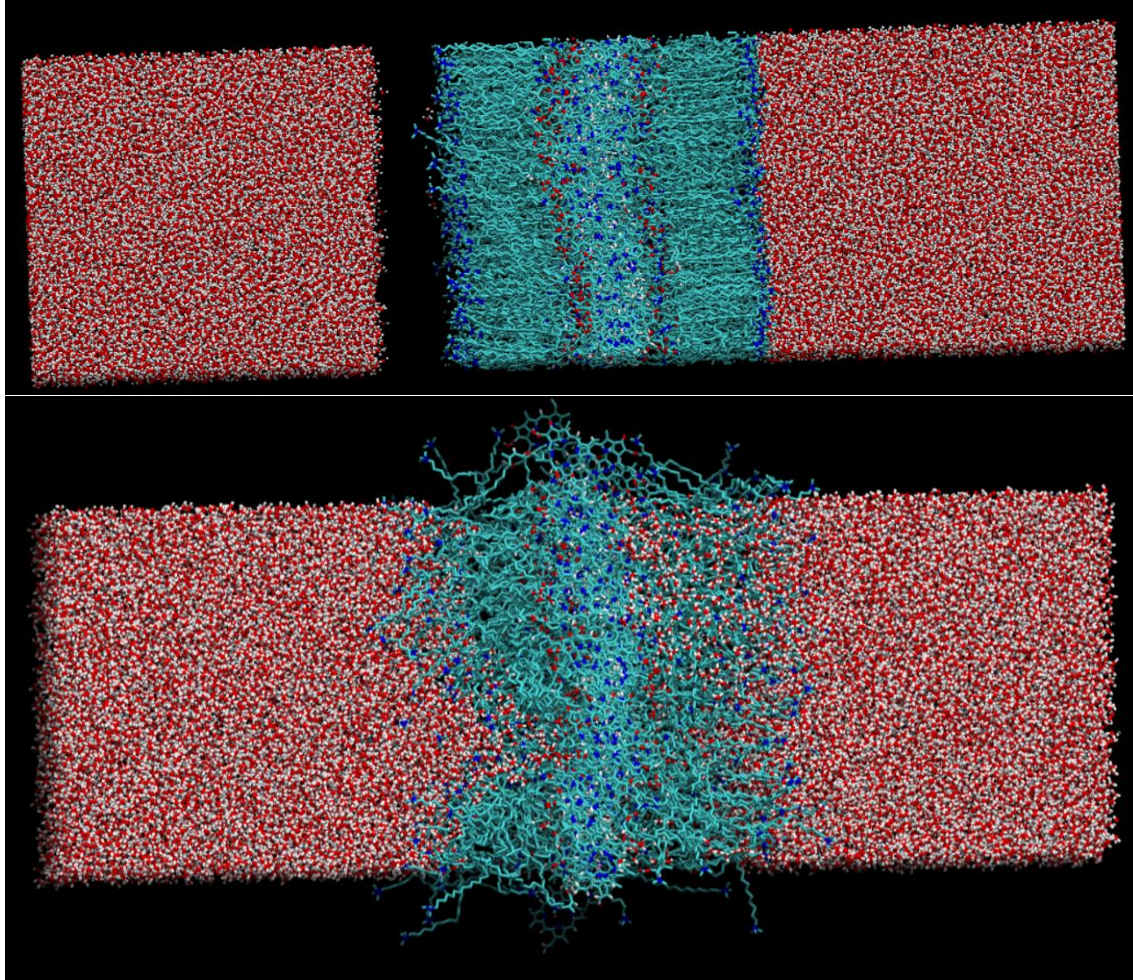


Figura 19. Simulación de la bicapa de bacterioclorofila a y detergente en agua, vista lateral. Arriba se muestra la disposición inicial de las bacterioclorofilas en la simulación, abajo se muestra la disposición al final de bacterioclorofilas en la simulación. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38). La molécula de bacterioclorofila a está representada con licorice (0,3 de radio) y el agua está representada con Van der Waals para el agua (0,3 de esfera), ambos con el material AOChalky.

En la figura 20 se muestra el comienzo (arriba) y el final (abajo) de la simulación, el agua se ha ocultado para mejor visualización de las cadenas. Se aprecia comparando ambas situaciones que las cadenas hidrofóbicas siguen orientadas hacia afuera, en asociación con el detergente. Al principio de la simulación los macrociclos se encontraban relativamente cerca unos de otros, al final se aprecian los desplazamientos, en la imagen de la derecha en los límites de la bicapa los

macrociclos sobresalen, es posible que el reordenamiento de los macrociclos sea el causante del relativo desorden en las cadenas hidrofóbicas.

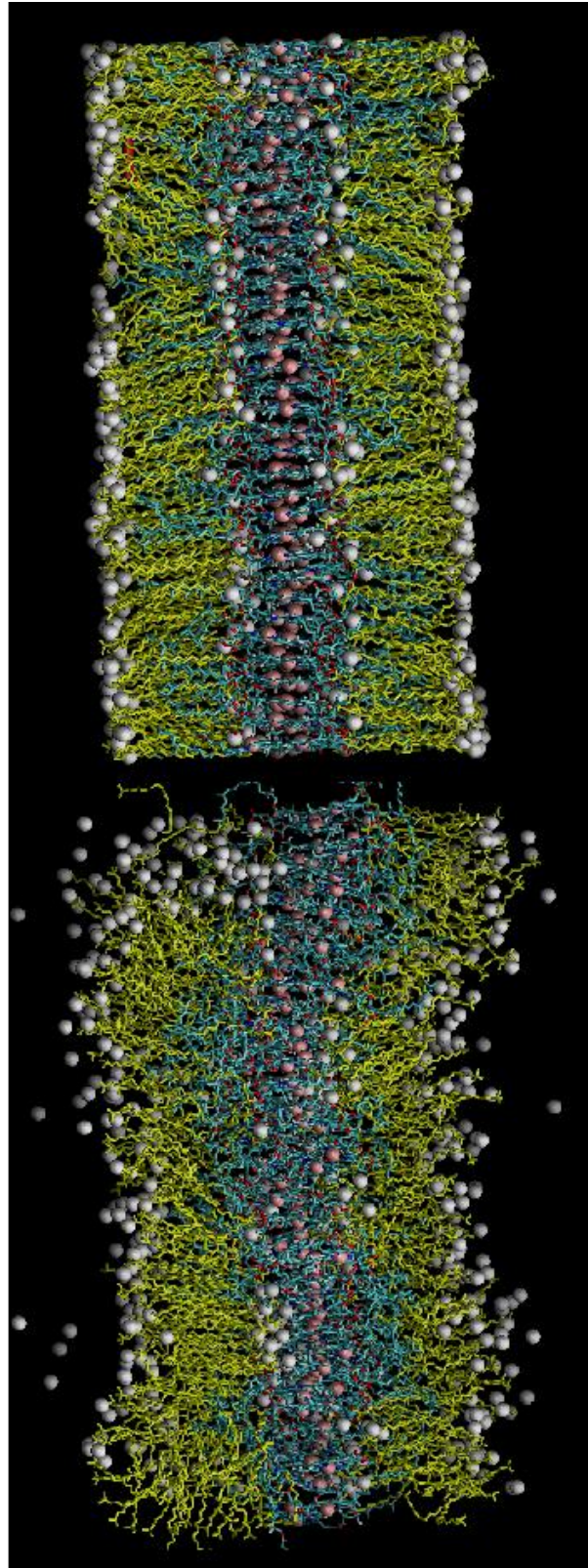


Figura 20. Simulación de la bicapa de bacterioclorofila a y detergente, sin agua visible. Arriba se muestra la disposición inicial de las bacterioclorofilas en la simulación, abajo se muestra la

disposición al final de bacterioclorofilas en la simulación. El agua se ha ocultado para mejor visualización de las cadenas. En líneas amarillo representamos las moléculas de CTA+, En líneas cian mostramos las moléculas de clorofila y en bolas blancas y rosas los iones Br y Magnesio respectivamente. Figuras realizadas con el software VMD (Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38).

De los datos extraídos de la exploración visual del sistema y del perfil de densidad se deduce que simplemente con añadir el surfactante catiónico y que interactúe con las cadenas altamente hidrofóbicas se puede estabilizar una estructura de bacterioclorofila a en un medio acuoso. El detergente utilizado forma micelas en agua, incluso a altas concentraciones de surfactante. No obstante, en presencia de aditivos como es el decanol, el sistema forma bicapas a concentraciones intermedias de surfactante/alcohol (Llombart *et al.*, 2019), conociendo esto se puede hipotetizar que la cadena hidrofóbica de la clorofila actúa de la misma forma que el decanol. Es por esto por lo que se forma la bicapa CTA/clorofila puede permanecer estable.

En el apartado de la simulación con disposición circular hemos visto que las diferencias químicas entre tipos de bacterioclorofila son importantes para su comportamiento. A continuación, compararemos la simulación de la bicapa de bacterioclorofilas con otras estructuras captadoras de luz con cromóforos más similares químicamente: los fotosistemas.

Los fotosistemas de las bacterias púrpuras principalmente están constituidos de bacterioclorofila a, unida a proteínas estructurales, en estas bacterias la membrana celular se pliega y hace de soporte para el fotosistema (Cogdell *et al.*, 2006).

En los fotosistemas eucariotas el pigmento predominante son las clorofilas, las cuales están ordenadas en el fotosistema de mayor a menor energía de excitación para crear un gradiente hacia el centro de reacción. En los fotosistemas las clorofilas se encuentran fijadas en sus posiciones por proteínas y además normalmente los fotosistemas están insertos en las bicapas lipídicas de los tilacoides, dentro de los cloroplastos (Nelson *and Cox*, 2014).

En los fotosistemas tanto de bacterias como de eucariotas las cadenas hidrofóbicas de los cromóforos se encuentran asociadas a proteínas estructurales cuya función es ordenar los cromóforos de forma óptima para la transmisión de los excitones. Además, los fotosistemas se encuentran embebidos en bicapas lipídicas por lo que el ambiente rodeando las cadenas es muy hidrofóbico, esto hace que las estructuras estén no solo altamente ordenadas, también las estabiliza. La disposición de los macrociclos es tal que no hay fuerzas de repulsión que alteren la estructura (Nelson *and Cox*, 2014). Comparando el entorno de las clorofilas en los fotosistemas con el de la bacterioclorofila a en esta simulación vemos que la interacción

CTA/bacterioclorofila estabiliza la estructura de una manera similar a las bicapas lipídicas en los fotosistemas.

La molécula que hemos escogido para representar a la familia de las clorofilas y bacterioclorofilas es representativa del conjunto, las bacterioclorofilas c, d, y e que pueden formar estructuras ordenadas en ambientes acuosos son la excepción, normalmente un pigmento de esta familia necesitará proteínas, detergentes o bicapas para estabilizar sus disposiciones espaciales, esto es información útil para el diseño de dispositivos que aspiren a emplear una estructura ordenada de clorofilas/bacterioclorofilas.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

En este trabajo estudiamos el comportamiento la bacterioclorofila a. Para ello hemos realizado simulaciones de dinámica molecular en GROMACS usando el potencial GROMOS 54A7, doce simulaciones en total. Diez de ellas simulaban el efecto de un medio acuoso en la disposición de un número creciente de moléculas de bacterioclorofila a (de 1 a 10) en el colectivo NVT.

Otra de las simulaciones tenía una disposición de partida en círculo para 160 moléculas de bacterioclorofila a libre en un medio acuoso, en esta simulación se utilizaron el colectivo NVT.

En la última simulación se parte de una bicapa de bacterioclorofilas asociadas a un surfactante y rodeadas por un medio acuoso, se utilizaron el colectivo NPT.

De los resultados de dichas simulaciones se puede concluir que:

La mayor parte de cromóforos de la familia de las clorofilas y bacterioclorofilas no son capaces de formar estructuras ordenadas en el agua, esto es debido al carácter altamente hidrofóbico de las cadenas que se unen al macrociclo y en menor medida a las fuerzas de repulsión entre los átomos de magnesio y el apilamiento pi escalonado o perpendicular que presentan los macrociclos. El orden y empaquetamiento de los cromóforos es esencial para la transmisión eficiente de los excitones e impedir la disipación de energía. En la naturaleza las cadenas hidrofóbicas tienen la función de fijar, junto con proteínas estructurales, la posición de los cromóforos en estructuras de captación de luz altamente ordenadas como los fotosistemas.

De estas conclusiones se pueden deducir los siguientes pasos a la hora de simular sistemas de captación de luz, por ejemplo, crear una matriz hidrofóbica adecuada para la estabilización de las estructuras en la cual se inserten las cadenas y hacer que la disposición de los macrociclos en dicha estructura no genere fuerzas de repulsión, adicionalmente la inclusión de alguna proteína estructural simplificada en simulaciones más avanzadas puede ser de gran interés, a pesar del coste computacional adicional.

CAPÍTULO 5. REFERENCIAS

1. Abraham, M. J., van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., & the GROMACS development team. (2015). GROMACS User Manual version 5.0.6, www.gromacs.org
2. Balaban, T. S. (2005). Tailoring Porphyrins and Chlorins for Self-Assembly in Biomimetic Artificial Antenna Systems. *Accounts Chem. Res.*, 38, 612–623.
3. Carter-Fenk, K., & Herbert, J. M. (2020). Reinterpreting π -stacking. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 22(43), 24870–24886. <https://doi.org/10.1039/d0cp05039c>
4. Caycedo-Soler, F., Mattioni, A., Lim, J., Renger, T., Huelga, S. F., & Plenio, M. B. (2022). Exact simulation of pigment-protein complexes unveils vibronic renormalization of electronic parameters in ultrafast spectroscopy. *Nature communications*, 13(1), 2912. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30565-4>
5. Chin, Y. C., Yang, L. X., Hsu, F. T., Hsu, C. W., Chang, T. W., Chen, H. Y., Chen, L. Y., Chia, Z. C., Hung, C. H., Su, W. C., Chiu, Y. C., Huang, C. C., & Liao, M. Y. (2022). Iron oxide@chlorophyll clustered nanoparticles eliminate bladder cancer by photodynamic immunotherapy-initiated ferroptosis and immunostimulation. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 373. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01575-7>
6. Cogdell, R. J., Gall, A., & Köhler, J. (2006). The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes. *Quarterly reviews of biophysics*, 39(3), 227–324. <https://doi.org/10.1017/S0033583506004434>
7. Coles, D., Flatten, L. C., Sydney, T., Hounslow, E., Saikin, S. K., Aspuru-Guzik, A., Vedral, V., Tang, J. K.-H., Taylor, R. A., Smith, J. M. & Lidzey, D. G. (2017). A Nanophotonic Structure Containing Living Photosynthetic Bacteria. *Small*, 13.
8. De Groot, H. J. M., (2009). Photosynthetic Antennae and Reaction Centers. In: Harris, R., Wasylishen, R. (eds). John Wiley & Sons.
9. Dostál, J., Pšenčík, J., & Zigmantas, D. (2016). In situ mapping of the energy flow through the entire photosynthetic apparatus. *Nature chemistry*, 8(7), 705–710. <https://doi.org/10.1038/nchem.2525>
10. Eisele, D. M., Cone, C. W., Bloemsma, E. A., Vlaming, S. M., van der Kwaak, C. G., Silbey, R. J., Bawendi, M. G., Knoester, J., Rabe, J. P., & Vanden Bout, D. A. (2012). Utilizing redox-chemistry to elucidate the nature of exciton transitions in

supramolecular dye nanotubes. *Nature chemistry*, 4(8), 655–662.
<https://doi.org/10.1038/nchem.1380>

11. Frederix, P. W. J. M., Patmanidis, I. & Marrink, S. J. (2018). Molecular simulations of self-assembling bio-inspired supramolecular systems and their connection to experiments. *Chem. Soc. Rev.*, 47, 3470–3489.

12. Frenkel, D. & Smit, B. (2001). *Understanding Molecular Simulation. From Algorithms to Applications*. (2nd ed.) Academic Press.

13. Grosso G., Graves J., Hammack A. T., High A. A., Butov L. V., Hanson M. & Gossard A. C. (2009). Excitonic Switches Operating At Around 100 K. *Nat. Photonics*, 3, 577–580. 10.1038/nphoton.2009.166.

14. Harmatys, K. M., Chen, J., Charron, D. M., MacLaughlin, C. M., & Zheng, G. (2018). Multipronged Biomimetic Approach To Create Optically Tunable Nanoparticles. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 57(27), 8125–8129. <https://doi.org/10.1002/anie.201803535>

15. Hashemi, Z., & Leppert, L. (2021). Assessment of the *Ab Initio* Bethe-Salpeter Equation Approach for the Low-Lying Excitation Energies of Bacteriochlorophylls and Chlorophylls. *The journal of physical chemistry. A*, 125(10), 2163–2172. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.1c01240>

16. Li X., Buda F., Huub J.M. de Groot, & G. J. Agur Sevink. (2018). Contrasting Modes of Self-Assembly and Hydrogen-Bonding Heterogeneity in Chlorosomes of *Chlorobaculum tepidum*. *J. Phys. Chem. C*, 122, 14877–14888. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b01790

17. Linnanto, J. M., & Korppi-Tommola, J. E. (2013). Exciton description of chlorosome to baseplate excitation energy transfer in filamentous anoxygenic phototrophs and green sulfur bacteria. *The journal of physical chemistry. B*, 117(38), 11144–11161. <https://doi.org/10.1021/jp4011394>

18. Llombart, P., Alcolea Palafox, M., MacDowell, L. G., & Noya, E. G. (2019). Structural transitions and bilayer formation of CTAB aggregates. *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.*, 580, 123730.

19. Meneghin, E., Biscaglia, F., Volpato, A., Bolzonello, L., Pedron, D., Frezza, E., Ferrarini, A., Gobbo, M., & Collini, E. (2020). Biomimetic Nanoarchitectures for Light Harvesting: Self-Assembly of Pyropheophorbide-Peptide Conjugates. *The journal of physical chemistry letters*, 11(19), 7972–7980. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c02138>

20. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 65106, Chlorin. Retrieved June 26, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorin>
21. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5280435, Phytol. Retrieved June 26, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phytol>
22. Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2014). Fosforilación oxidativa y fotofosforilación. *Lehninger. Principios de bioquímica*. (6ª ed.). Omega.
23. Oostergetel, G.T., van Amerongen, H. & Boekema, E.J. (2010). The chlorosome: a prototype for efficient light harvesting in photosynthesis. *Photosynth Res* **104**, 245–255. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9533-0>
24. Schmid, N., Eichenberger, A.P., Choutko, A. *et al.* (2011). Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur Biophys J* **40**, 843–856. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>
25. Senge, M.O. & Smith, K.M. (1995). Biosynthesis and Structures of the Bacteriochlorophylls. In: Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E. (eds) Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. *Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 2*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_8
26. Zheng, F., Chen, L., Gao, J., & Zhao, Y. (2021). Fully Quantum Modeling of Exciton Diffusion in Mesoscale Light Harvesting Systems. *Materials (Basel, Switzerland)*, *14*(12), 3291. <https://doi.org/10.3390/ma14123291>