



**RIDUNAJ**  
Repositorio Institucional  
Digital UNAJ



Universidad Nacional  
**ARTURO JAURETCHE**

## Trabajo Final de Grado

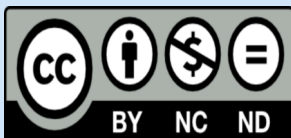
Fraga, Carlos Sebastian

# Estabilidad térmica de Membranas Modelo - Efectos de la Oxidación Lipídica

*Instituto de Ciencias de la Salud*

2025

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.  
Atribución – No comercial – Sin obra derivada 4.0  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Fraga, C. S. (2025). *Estabilidad térmica de Membranas Modelo - Efectos de la Oxidación Lipídica* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3621>



**Estabilidad térmica de Membranas Modelo - Efectos de la  
Oxidación Lipídica**

**Alumno:** Fraga Carlos Sebastian

**Director:** Alvarez Hugo Ariel

**Fecha de entrega //2025**

## 1. Resumen

El estudio de la estabilidad de las membranas lipídicas es fundamental para comprender los efectos del estrés oxidativo en células biológicas. La peroxidación lipídica altera las funciones fisiológicas de las membranas celulares y desempeña un papel clave en el daño de estas. Se cree que la peroxidación está implicada en el envejecimiento celular y en diversas enfermedades, como el Parkinson, el Alzheimer, así como en la esquizofrenia, la aterosclerosis, las enfermedades inflamatorias y la lesión por isquemia-reperfusión cardíaca (Wong-ekkabut, Xu, Triampo, Tang, Peter Tieleman & Monticelli, 2007). En este trabajo, se analiza el comportamiento de membranas monocompuestas compuestas por 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC), considerado uno de los principales constituyentes fosfolipídicos de las membranas celulares y cómo la oxidación lipídica modifica sus propiedades estructurales y térmicas. Para ello, se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular, estudiando el comportamiento estructural de bicapas lipídicas a diferentes temperaturas. Cabe destacar que, además de su relevancia biológica, el POPC es uno de los lípidos más utilizados como modelo en estudios computacionales y experimentales de membranas, debido a su capacidad para formar bicapas estables en fase líquida desordenada bajo condiciones fisiológicas. Esta propiedad lo convierte en un sistema de referencia ideal para explorar los efectos de la oxidación sobre la organización y estabilidad de membranas lipídicas (Raghunathan & Katsaras, 1996). A esto se suma que, según estudios experimentales, el POPC presenta una respuesta reversible y bien caracterizada frente a cambios de presión y temperatura, con un comportamiento estructural altamente reproducible en fase fluida. (Rappolt, Vidal, Kriechbaum, Steinhart, Amenitsch, Bernstorff & Laggner, 2003). Estas propiedades lo convierten en un sistema de referencia confiable para estudiar, con resolución molecular, los efectos físicos y químicos sobre la organización y estabilidad de las membranas lipídicas.

Se analizaron dos sistemas modelo con el fin de evaluar el impacto de la oxidación lipídica:

- Una membrana formada exclusivamente por POPC puro.
- Una membrana de POPC oxidado, que simula condiciones de estrés oxidativo en la célula.

El objetivo principal fue evaluar si la oxidación lipídica altera la estabilidad térmica de la membrana, promoviendo perturbaciones estructurales asociadas a una transición de fase del tipo gel (ordenada) a líquida (desordenada). Además, se evaluó la estabilidad térmica de los sistemas mediante un protocolo de annealing que incluyó ciclos de *heating* (calentamiento) y *cooling* (enfriamiento). Los resultados obtenidos fueron contrastados con datos previos de la literatura para validar los modelos y discutir las implicancias de la oxidación en la dinámica de membranas biológicas. "Para aplicar con éxito las tecnologías de biomembranas a problemas reales, es necesario profundizar en la comprensión de los mecanismos que regulan la movilidad relativa (fluidez) de las moléculas

lipídicas individuales en la bicapa y aclarar cómo esta movilidad se ve influenciada por cambios en las condiciones ambientales” (Wong-ekkabut, Xu, Triampo, Tang, Peter Tieleman & Monticelli, 2007).

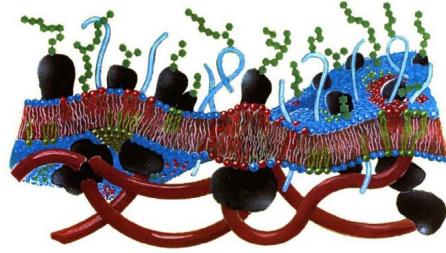


Figura 1: Esquema pictórico del modelo de membrana plasmática. La ilustración muestra la bicapa lipídica (al centro) dispuesta entre el glicocálix extracelular (polisacáridos en verde) y el citoesqueleto intracelular (tubos rojos). Se observan proteínas integrales (negro) y polipéptidos (azul) insertados en la membrana, que presenta oscilaciones y dominios laterales de diferentes lípidos. Las moléculas lipídicas se representan con cierto detalle, mientras que las proteínas se ilustran de forma simplificada. Los elementos no están dibujados a escala.. (Bagatolli & Mouritsen, 2014)

## 2. Objetivos

En el presente trabajo se propone estudiar el comportamiento de las membranas monocomponentes de POPC y POPC-OOH bajo diferentes condiciones de temperatura. En particular, se plantean los siguientes objetivos:

- I. Analizar las modificaciones en las propiedades estructurales y dinámicas de las membranas de POPC en función del grado de oxidación y la temperatura.
- II. Determinar la presencia o ausencia de las transiciones de fase descritas previamente para membranas de POPC puro, y compararlas con las observadas en las membranas oxidadas.
- III. Investigar la formación de patrones o dominios en las membranas oxidadas y evaluar su estabilidad energética.

## 3. Marco Teorico

### 3.1. Estructura y composicion de membranas lipidicas

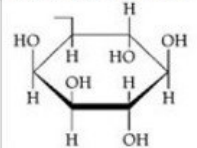
La bicapa lipídica es una estructura supramolecular autoensamblada en medios acuosos, caracterizada por la yuxtaposición de dos monocapas en las que las colas hidrocarbonadas de los lípidos interactúan entre sí, formando un núcleo hidrofóbico . . . mientras que las cabezas polares se disponen hacia el exterior, interactuando con el solvente acuoso y generando una interfaz hidrofílica que estabiliza la estructura. Su estabilidad y propiedades fisicoquímicas dependen de la composición lipídica, la hidratación y la presencia de otros componentes como el colesterol (Tsubone, Junqueira, Baptista & Itri, 2019).

Los fosfolípidos constituyen los principales componentes de la membrana y poseen una estructura anfifílica, con una cabeza polar y dos colas hidrocarbonadas hidrofóbicas. Estas cadenas pueden ser saturadas, monoinsaturadas o poliinsaturadas, lo que influye en la fluidez y rigidez de la membrana. Los lípidos saturados, al carecer de dobles enlaces, permiten una mayor compactación de la bicapa, reduciendo su fluidez y aumentando su grosor. En contraste, los lípidos insaturados introducen curvaturas en la membrana, disminuyen la rigidez y facilitan la movilidad de los componentes (Sosa, 2023).

La tendencia de las regiones hidrofóbicas a autoensamblarse, impulsada entropicamente por el medio acuoso, junto con la afinidad de las regiones hidrofílicas por interactuar con dicho entorno y entre sí mismas, constituye el fundamento físico para la formación espontánea de las membranas. Este principio anfipático fue determinante para que las primeras células establecieran una delimitación entre su contenido intracelular y el ambiente extracelular, y a nivel intracelular, facilitó la generación de orgánulos con compartimentos definidos. Esta compartimentalización permite la segregación espacial y funcional de reacciones bioquímicas, optimizando su eficiencia y restringiendo la dispersión de los productos metabólicos. Asimismo, los lípidos confieren a las membranas la capacidad de mediar procesos dinámicos como la rotación, fisión y fusión, fundamentales para la división celular, la reproducción y el tráfico intracelular, además de regular la organización y movilidad de las proteínas integrales y periféricas en la bicapa (van Meer, Voelker & Feigenson, 2008).

Dentro de los fosfolípidos, los glicerofosfolípidos representan una subclase fundamental, caracterizada por un esqueleto de glicerol unido a dos ácidos grasos y un grupo fosfato, el cual puede enlazarse a distintas cabezas polares. Como muestra la figura 2, estas variaciones estructurales generan diferentes especies, como la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) y el ácido fosfático (PA). La naturaleza química de la cabeza polar determina la carga eléctrica del fosfolípido a pH fisiológico (7,4), siendo PC y PE neutras, mientras que PS, PG y PI presentan carga negativa. Estas diferencias en la carga afectan la interacción con proteínas y otras biomoléculas mediante interacciones iónicas (Bagatolli & Mouritsen, 2014).

A nivel funcional, la organización lateral de los lípidos en la membrana da

Sustituyente	Formula*	Fosfolípido# abrev. &
hidrógeno	- H	di-acil-ácidofosfatídico (PA)
colina	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	di-acil-fosfatidilcolina (PC)
etanolamina	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	di-acil-fosfatidiletanolamina (PE)
serina	- CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>3</sub> )COO <sup>-</sup>	di-acil-fosfatidilserina (PS)
glicerol	- CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	di-acil-fosfatidilglicerol (PG)
<i>mio</i> -inositol		di-acil-fosfatidilinositol (PI)

\*fórmula del sustituyente que genera el enlace fosfodiéster (a excepción de PA) con el grupo fosfato, el cual se encuentra unido en la posición 3 del *sn*-glicerol. #El nombre genérico del fosfolípido se expresa como di-acil (referido a las dos cadenas hidrocarbonadas) seguido por la abreviación de la cabeza polar. & Abrev. representa la abreviación de la cabeza polar (indicada en inglés, p.ej. PC “**P**hosphatidyl**C**holine”).

Figura 2: Grupos polares de los glicerofosfolípidos (Bagatolli & Mouritsen, 2014)

lugar a la formación de dominios con distintos grados de ordenamiento molecular. Entre estos, se distinguen regiones altamente ordenadas (liquid-ordered, Lo) y regiones más fluidas (liquid-disordered, Ld). Dentro de los dominios ordenados se encuentran los *lipid rafts*, estructuras enriquecidas en esfingolípidos y colesterol que funcionan como plataformas para la agrupación de proteínas de membrana. Estas microestructuras desempeñan un papel clave en la transducción de señales, el tráfico vesicular y la regulación de interacciones moleculares (Tsubone, Junqueira, Baptista & Itri, 2019).

Finalmente, el espesor de la bicapa está influenciado por diversos factores, como la longitud y saturación de las cadenas hidrocarbonadas, el grado de hidratación y la concentración de colesterol. Una menor hidratación favorece la compactación de las cabezas polares y la elongación de las cadenas lipídicas, aumentando el espesor de la membrana. El colesterol, por su parte, ordena las colas hidrocarbonadas y estabiliza la estructura, promoviendo la formación de dominios lipídicos especializados que modulan la dinámica de la membrana.

Por otro lado, la temperatura influye significativamente en la estructura de la bicapa lipídica. A medida que la temperatura aumenta, se produce una mayor agitación térmica de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, lo que reduce la compactación de la membrana y disminuye su espesor. Esta variación térmica afecta directamente las propiedades mecánicas y dinámicas de la bicapa, modificando su permeabilidad, la movilidad de los lípidos y su capacidad de interacción con proteínas de membrana.

En determinadas condiciones, la bicapa puede experimentar una transición de fase principal, un proceso cooperativo en el que los lípidos pasan de un estado ordenado y gelificado (gel,  $L_\beta$ ) a un estado más fluido (liquid-disordered,  $L_d$ ). Esta transición implica un cambio abrupto en el espesor de la membrana y una reorganización en la disposición de las cadenas hidrocarbonadas, las cuales adquieren mayor flexibilidad y desorden conformacional. La temperatura a la que ocurre esta transición, denominada temperatura de transición de fase ( $T_m$ ), depende de la composición lipídica: los lípidos saturados tienden a aumentar la  $T_m$  debido a su alto grado de empaquetamiento, mientras que la presencia de insaturaciones disminuye esta temperatura al impedir la compactación de la bicapa. Estos cambios estructurales inducidos por la temperatura tienen importantes implicaciones biológicas, ya que pueden afectar procesos como el tráfico vesicular, la actividad enzimática de proteínas de membrana y la funcionalidad de canales iónicos (Bagatolli & Mouritsen, 2014).

### 3.2. Procesos de oxidación lipídica y sus efectos

Las reacciones de óxido-reducción son fundamentales en numerosos procesos biológicos del metabolismo celular, ya que involucran transferencias de electrones que pueden generar subproductos altamente reactivos, tales como radicales libres (RL) o especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés)(Alejandra, 2021). Estas especies reactivas desempeñan un rol dual: por un lado, participan en procesos fisiológicos esenciales como la defensa frente a patógenos, la apoptosis, la respuesta inmunitaria, y la diferenciación celular; por otro, su acumulación descontrolada puede generar daño irreversible a componentes celulares clave. Las membranas celulares constituyen la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo. En ellas, lípidos, proteínas, colesterol, vitaminas y ácidos grasos son blanco directo de interacciones con las ROS. Se acepta ampliamente que esta protección depende, en parte, de la presencia de moléculas antioxidantes que poseen enlaces químicos débiles —como vitaminas, lípidos insaturados y ácidos grasos poliinsaturados—, capaces de neutralizar los radicales libres. Sin embargo, los radicales de oxígeno pueden atacar los enlaces dobles presentes en las colas hidrofóbicas de los lípidos de membrana, generando cambios conformacionales que alteran la integridad estructural de la bicapa lipídica. El equilibrio redox, definido como la relación entre especies oxidantes y antioxidantes, es crucial para el funcionamiento fisiológico normal. Su desbalance puede desencadenar procesos patológicos complejos, incluyendo enfermedades metabólicas y neurodegenerativas como el cáncer, la diabetes, el Parkinson y el Alzheimer. Dentro de los efectos más relevantes del daño oxidativo se encuentra la peroxidación lipídica (LPO), un proceso que afecta directamente la arquitectura de las membranas celulares. Esta puede ser inducida por ROS, procesos inflamatorios, enzimas oxidasas, fagocitosis viral, y exposición a radiación UV o ionizante. Modelos experimentales, como la fotooxidación de vesículas lipídicas gigantes, permiten estudiar con precisión cómo la oxidación afecta propiedades clave de la bicapa, incluyendo su rigidez y el área ocupada por cada lípido. (Guo, Baulin & Thalmann, 2016).

En este contexto, los ácidos grasos poliinsaturados han adquirido especial relevancia en el estudio de los mecanismos oxidativos. Estos lípidos, abundantes en las membranas biológicas, pueden ser liberados como ácidos grasos libres mediante la acción de la fosfolipasa A. Esta liberación puede ocurrir antes o después del ataque oxidativo, y se ha sugerido que la oxidación previa podría funcionar como señal para la acción enzimática. Es importante distinguir entre la oxidación enzimática específica —que genera compuestos de señalización altamente activos, como prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina y tromboxano A— y la oxidación no enzimática o inespecífica mediada por radicales libres, conocida como peroxidación lipídica. (Sies, 1986). Las ROS acumuladas pueden inducir alteraciones químicas irreversibles en diversos componentes celulares, siendo la membrana plasmática una de las estructuras más vulnerables. Dado su papel como barrera y sitio de intercambio molecular, su daño compromete gravemente la viabilidad celular.(Aceves-Luna, Glossman-Mitnik & Flores-Holguín, 2020). Se ha demostrado que la LPO afecta múltiples pro-

propiedades biofísicas de las membranas: reduce su integridad estructural, altera la fluidez y permeabilidad, promueve la transformación de LDL en formas proinflamatorias y proaterogénicas, y genera metabolitos tóxicos. (Niki, 2009). Existe evidencia de una correlación directa entre la peroxidación lipídica y la pérdida de integridad de la membrana. El aumento de la permeabilidad asociado a la oxidación de lípidos y proteínas de membrana puede perturbar los gradientes iónicos y alterar funciones metabólicas críticas. (Wong-ekkabut, Xu, Triampo, Tang, Peter Tieleman & Monticelli, 2007). Debido a la alta susceptibilidad de los lípidos de membrana a la oxidación, la LPO puede comprometer la estabilidad de la bicapa e iniciar una cascada de eventos deletéreos que amplifican el daño celular. En términos morfoestructurales, los signos característicos de oxidación en bicapas lipídicas incluyen: aumento del área por lípido, disminución del grosor de la membrana, desorden en el empaquetamiento lipídico y exposición de las cadenas alifáticas al medio acuoso, lo que debilita el núcleo hidrofóbico de la membrana y compromete su funcionalidad. (Aceves-Luna, Glossman-Mitnik & Flores-Holguín, 2020).

La peroxidación lipídica ocurre en tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación. Durante la fase de iniciación, se generan radicales lipídicos ( $L\bullet$ ), los cuales reaccionan rápidamente con el oxígeno molecular para formar radicales peroxilo ( $LOO\bullet$ ). En la fase de propagación, estos radicales peroxilo sustraen un átomo de hidrógeno de un lípido no oxidado, dando lugar a la formación de hidroperóxidos lipídicos ( $LOOH$ ) y nuevos radicales libres. Estos últimos pueden continuar el ciclo de propagación, ampliando el daño oxidativo en la membrana lipídica y comprometiendo su estabilidad estructural (Sosa, 2023).

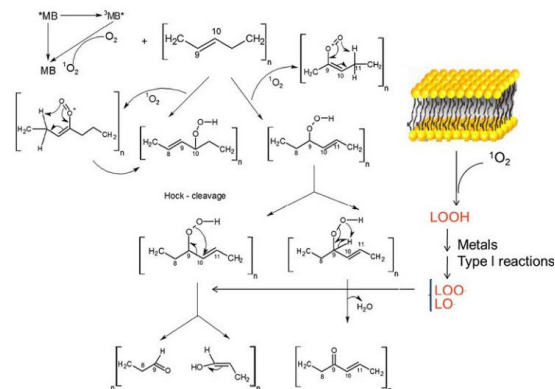


Figura 3: Esquema de la generación de ( $^1O_2$ ) por fotosensibilización y su reacción con un doble enlace lipídico para formar hidroperóxidos, que pueden acumularse en la membrana o generar radicales libres, promoviendo la peroxidación lipídica. (Itri, Junqueira, Mertins & Baptista, 2014)

### 3.3. Transiciones de fase en membranas lipídicas

El cambio de estado físico que exhiben los materiales es uno de los fenómenos más fascinantes de la naturaleza. Los materiales blandos, como las bicapas lipídicas y las membranas biológicas, también presentan este tipo de comportamiento. Las transiciones de fase, consideradas fenómenos colectivos, surgen de interacciones cooperativas entre un gran número de moléculas. Metafóricamente, estas moléculas se comportan de forma social: a mayor número de participantes, más marcada es la transición entre los distintos estados de la materia (Bagatolli & Mouritsen, 2014).

La transición de fase se caracteriza por una temperatura de transición,  $T_m$ , donde se observa el máximo del calor específico, y por el calor de transición (entalpía,  $\Delta H$ ), que mide el calor necesario para que la transición ocurra.  $T_m$  y  $\Delta H$  aumentan con la longitud de la cadena hidrocarbonada. Si se incrementa el grado de insaturación en las cadenas lipídicas,  $T_m$  disminuye. A partir de estas observaciones, se concluye que la transición principal está asociada a cambios conformacionales abruptos en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos: estas están ordenadas por debajo de  $T_m$  y desordenadas por encima de esta temperatura (Bagatolli & Mouritsen, 2014). Otros estudios estructurales y reológicos en membranas han demostrado que la fase por debajo de la transición principal no solo muestra cadenas hidrocarbonadas ordenadas, sino que las moléculas de lípidos se organizan en una estructura cristalina regular, similar a la de un sólido (Wanderlingh, Branca, Crupi, Conti Nibali, La Rosa, Rifici, Ollivier & D'Angelo, 2017). En general, las bicapas lipídicas se encuentran en fase líquido cristalina, un estado dinámico que se vuelve más rígido al disminuir la temperatura, dando lugar a la fase gel. Estas transiciones afectan propiedades fundamentales de la membrana, como la fluidez, la flexibilidad, la adhesión celular, el metabolismo y la permeabilidad, especialmente en organismos que enfrentan condiciones térmicas variables (Zhuang, Makover, Im & Klauda, 2014).

Para describir correctamente estas fases, se combinan dos criterios: uno que distingue entre sólido y líquido (según la libertad traslacional), y otro que distingue entre ordenado y desordenado (según la conformación de las cadenas). Así, la fase por debajo de  $T_m$  se denomina gel o sólido-ordenada ( $L_\beta$ ), mientras que por encima se encuentra la fase líquido-desordenada o líquido cristalina ( $L_\alpha$ ).

Como ilustra la figura 4, esta transición de fase se asocia con una reducción drástica en el espesor de la bicapa ( $\Delta dL$ ), acompañada simultáneamente por una expansión de área ( $\Delta A$ ), que típicamente es del 10-15%. Dado que el volumen por molécula de lípido solo cambia unas pocas unidades por ciento durante la transición principal, el espesor de la membrana se puede relacionar directamente con el cambio de área. Como se sabe, las membranas lipídicas presentan un diagrama de fases rico, dominado por la temperatura de transición principal,  $T_m$ , que separa la fase gel ( $L_\beta$ ) de la fase líquida-cristalina ( $L_\alpha$ ) (Bagatolli & Mouritsen, 2014).

Para la mayoría de los fosfolípidos de interés práctico, la temperatura de transición varía entre 270 y 310 K. Esta temperatura es más alta para los fosfolípidos con cadenas más largas, mientras que la presencia de enlaces insatura-

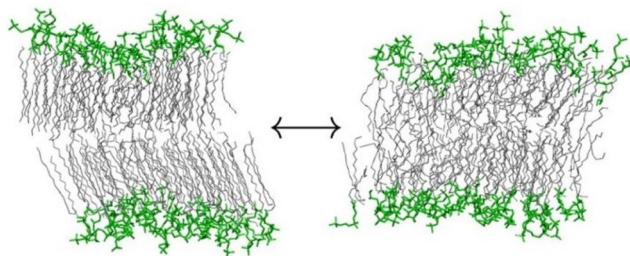


Figura 4: Representación instantánea de una bicapa de DPPC evidenciando las diferencias estructurales entre las fases sólido-ordenada (izquierda) y líquido-desordenada (derecha). (Bagatolli & Mouritsen, 2014)

dos en las cadenas disminuye  $T_m$ . Como se mencionó anteriormente, el sistema de estudio incluirá POPC y POPC oxidado. Según los hallazgos de (Leekumjorn & Sum, 2007), en el caso del POPC, se identificó una transición de fase alrededor de los 270 K, reflejada en cambios estructurales como el orden de las colas lipídicas y la isomerización trans-gauche. Por otro lado a 330 K, el sistema muestra un estado líquido-cristalino completamente desordenado. Estos resultados de simulaciones por Dinámica Molecular coinciden con las observaciones experimentales de (Pabst, Hodzic, Štrancar, Danner, Rappolt & Laggner, 2007), quienes confirmaron que a 300 K el POPC ya se encuentra en fase fluida.

La fluidez de la membrana depende críticamente del estado de fase estructural de los lípidos. En la fase gel, las interacciones de van der Waals provocan un empaquetamiento altamente ordenado de las cadenas acilo, las cuales pueden inclinarse respecto a la normal de la bicapa lipídica, lo que limita los movimientos rotacionales y traslacionales. En la fase líquida, las cadenas acilo de los lípidos muestran una mayor libertad de movimiento tanto traslacional como rotacional, lo que disminuye el orden molecular y aumenta la fluidez de la membrana. (Wanderlingh, Branca, Crupi, Conti Nibali, La Rosa, Rifici, Ollivier & D'Angelo, 2017).

### 3.4. Dinámica molecular aplicada a estudios de membranas

La dinámica molecular (MD, por sus siglas en inglés, Molecular Dynamics) es una técnica de simulación computacional utilizada para analizar la evolución y el comportamiento de un sistema molecular a lo largo del tiempo. Esto se logra mediante el cálculo de las fuerzas entre los átomos del sistema, aplicando las ecuaciones del movimiento de Newton (Conde Torres, 2021). En términos operativos, la MD genera trayectorias de un sistema compuesto por  $N$  partículas a través de la integración numérica directa de estas ecuaciones, utilizando un potencial de interacción interatómico y estableciendo condiciones iniciales y de frontera adecuadas. Cuando las partículas modeladas corresponden a átomos individuales, la MD permite una simulación a nivel atómico, convirtiéndose en una herramienta esencial para el estudio de materiales y sistemas biológicos (Lozano-Aponte & Scior, 2014).

El fundamento de la dinámica molecular se basa en dos principios esenciales: el primero es el uso de un campo de fuerzas, que representa la combinación de distintas contribuciones, incluyendo enlaces, ángulos, interacciones de Van der Waals e interacciones electrostáticas. Estos campos de fuerza se describen mediante un potencial energético ( $V$ ) y se sustentan en modelos donde los átomos son tratados como esferas y los enlaces como osciladores, permitiendo descomponer la energía potencial total en términos independientes.

El segundo principio es la aplicabilidad de la segunda ley de Newton en la simulación de la dinámica del sistema. En un sistema aislado compuesto por  $N$  partículas, la fuerza que actúa sobre un átomo  $i$  se expresa como:

$$\vec{F}_i = \frac{\partial \vec{p}_i}{\partial t}, \quad i = 1, 2, \dots, N - 1, N$$

Donde  $\vec{p}_i$  representa la cantidad de movimiento de la partícula  $i$ -ésima,  $N$  es el número total de partículas en el sistema y  $\vec{F}_i$  corresponde a la fuerza resultante que actúa sobre la partícula  $i$ -ésima. Al tratarse de un sistema cooperativo, vendrá expresada por el gradiente de potencial:  $\vec{F}_i = -\vec{\nabla} V_i$

$V_i$  es una función potencial semiempírica que describe el campo de fuerzas, basado en una serie de expresiones matemáticas y parámetros que definen las interacciones entre las partículas que conforman el sistema.

En los componentes que conforman los campos de fuerzas, se pueden distinguir dos grupos principales: los términos enlazantes, que controlan el comportamiento de los átomos unidos por no más de tres enlaces covalentes, y los términos no enlazantes, que describen las interacciones entre átomos separados por más de cuatro enlaces. Entre las interacciones no enlazantes se incluyen las interacciones electrostáticas y de Van der Waals.

$$V = \underbrace{K_r(r - r_{\text{eq}})^2}_{\text{enlaces}} + \underbrace{K_\theta(\theta - \theta_{\text{eq}})^2}_{\text{ángulos}} + \underbrace{V_N [1 + \cos(n\varphi + \delta_n)]}_{\text{dihedros}} + \sum_i \sum_{i < j} \left[ 4\epsilon_{ij} \left( \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right] \quad (2)$$

- I. La primera contribución representa la tensión de enlace, es decir, la energía asociada a la deformación de la distancia entre dos átomos unidos covalentemente. Existen distintos enfoques para modelar esta interacción, dependiendo de si el comportamiento es armónico o anarmónico. En casos donde se requiere mayor precisión, se emplea el potencial de Morse, que describe de manera más realista la disociación del enlace. Sin embargo, dado que los enlaces rara vez se desvían significativamente de su distancia de equilibrio, en la mayoría de los campos de fuerza se asume un comportamiento armónico. En este modelo, la distorsión del enlace se describe mediante un oscilador armónico de Hooke,  $K_r$  representa la constante de fuerza,  $r$  la distancia del enlace y  $r_{\text{eq}}$  su valor de equilibrio.
- II. La segunda contribución corresponde a la vibración del ángulo formado por tres átomos. De manera similar al caso de la tensión de enlace, esta interacción puede modelarse mediante un potencial armónico de tipo Hooke. En este modelo, la distorsión angular se describe a través de una función cuadrática, donde  $K_\theta$  es la constante de fuerza asociada a la deformación angular  $\theta$  representa el ángulo entre los átomos y  $\theta_{\text{eq}}$  es el valor de equilibrio del mismo.
- III. La tercera contribución hace referencia a las interacciones diedricas, que se dividen en dos tipos: propias e impropias. Las interacciones propias están relacionadas con el ángulo diedro formado entre cuatro átomos, mientras que las interacciones impropias se emplean para mantener a determinados átomos en el plano definido por otros tres. A diferencia de los términos anteriores, las interacciones diedricas presentan una periodicidad, lo que implica que sus perfiles energéticos se expresan mediante series de Fourier. En esta expresión,  $V_n$  es la constante de fuerza asociada al término  $n$ -ésimo,  $n$  es el orden de la serie,  $\varphi$  es el ángulo diedro y  $\delta$  representa la fase.
- IV. Finalmente, la cuarta contribución corresponde a los términos no enlazantes, que tienden a acercarse a cero conforme aumenta la distancia entre las partículas:

- $\sum_i \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$

Este término describe las interacciones electrostáticas entre átomos, modeladas a través de la ley de Coulomb. La carga de cada átomo se representa como una carga puntual, normalmente ubicada en su núcleo, la cual se ajusta para reproducir correctamente las propiedades electrostáticas de la molécula. En esta expresión,  $q_i$  y  $q_j$  son las cargas de los átomos  $i$  y  $j$ ,  $r_{ij}$  es la distancia entre los átomos y  $\epsilon_0$  es la constante dieléctrica del medio.

Este otro término describe la interacción de Van der Waals:

- $U = \sum_i \sum_{j > i} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$

El cual comprende dos fuerzas: una repulsiva a distancias muy pequeñas entre los átomos y una atractiva a mayores distancias. El potencial de Lennard-Jones es el modelo más utilizado para este tipo de interacciones, donde el término de repulsión depende de la doceava potencia de la distancia y el término de atracción de la sexta potencia.  $\sigma_{ij}$  representa la distancia a la cual la interacción entre las partículas se vuelve nula, y  $\epsilon_{ij}$  es la intensidad de esta interacción. Estos parámetros se obtienen a partir de mediciones experimentales, como el coeficiente del virial en fase gaseosa y la viscosidad, y son constantes para cada par de átomos, dependiendo de sus radios de Van der Waals y durezas.  $r_{ij}$  es la distancia entre los átomos.

Para mitigar los efectos que se generan en los bordes de un sistema finito en fase condensada, se suelen emplear las condiciones periódicas de contorno (PBC, por sus siglas en inglés, Periodic Boundary Conditions). Estas condiciones permiten que los átomos del sistema se ubiquen dentro de una caja tridimensional, la cual está rodeada por réplicas idénticas de sí misma en todas las direcciones del espacio. Durante la simulación, cuando una molécula se desplaza dentro de la caja central, su imagen periódica en las réplicas se moverá de manera idéntica y en la misma orientación. De este modo, si una molécula abandona la caja central, una de sus imágenes ingresará a la cara opuesta de la misma. Sin embargo, al utilizar PBC (o en sistemas muy grandes), el cálculo de las interacciones no enlazantes se vuelve computacionalmente costoso, ya que implica calcular todas las interacciones posibles entre los pares atómicos. Para reducir este costo, se implementan ciertas restricciones. Las más comunes incluyen:

- **Convergencia de las interacciones:** Para optimizar los cálculos, solo se consideran las interacciones entre partículas dentro de un radio determinado (cut-off). Si bien esta estrategia reduce significativamente el número de interacciones computadas, puede generar problemas en sistemas cargados, donde la energía decrece lentamente con la distancia. Para mitigar esta discontinuidad, pueden emplearse métodos como la función de suavizado (switching) o la asignación de grupos cargados.

- Interacciones de largo alcance: Para incorporar los efectos de las interacciones electrostáticas a larga distancia en los cálculos, se emplean métodos específicos, siendo el método de Ewald con mallas particionadas (PME) el más utilizado

A partir de los parámetros que definen todas las interacciones del sistema, se calcula la fuerza que actúa sobre cada átomo. A partir de estos valores, se determina la trayectoria de cada partícula mediante la integración de las ecuaciones de movimiento de Newton, utilizando intervalos de tiempo (time steps) muy pequeños, del orden de 1 o 2 femtosegundos (fs). Para ello, existen diversos algoritmos de integración numérica, como los métodos de Verlet, Beeman o leap-frog, los cuales aproximan las posiciones y propiedades dinámicas mediante una expansión en serie de Taylor. Por lo tanto, es necesario definir condiciones iniciales. En el caso de las velocidades, estas suelen determinarse a partir de una distribución de Maxwell-Boltzmann correspondiente a la temperatura de simulación, y se recalculan en cada paso en función del potencial obtenido a través del campo de fuerzas. El tiempo de integración (paso de tiempo) es un parámetro crucial en la ejecución de la simulación, siendo el valor más comúnmente empleado de 2 femtosegundos (fs) (Conde Torres, 2021).

La MD ha revolucionado diversas áreas de la química y la biofísica al proporcionar una resolución espacial y temporal que no es accesible mediante experimentos tradicionales. Una simulación típica comienza con la selección de una configuración molecular inicial, seguida de la definición del modelo físico y las interacciones atómicas, la ejecución del cálculo y el análisis de la trayectoria obtenida. Estas simulaciones requieren la evaluación de millones de interacciones entre partículas a lo largo de miles de millones de pasos de tiempo, lo que demanda un alto poder computacional. La calidad de los resultados depende en gran medida del muestreo realizado, ya que un mayor número de pasos de simulación permite obtener datos más precisos y representativos del sistema estudiado. Debido a su amplio potencial, la MD se ha implementado en diversos paquetes de software especializados, GROMACS (Abraham, Murtola, Schulz, Páll, Smith, Hess & Lindahl, 2015), AMBER (Case, Cheatham, Darden, Gohlke, Luo, Merz, Onufriev, Simmerling, Wang & Woods, 2005), NAMD (Phillips, Braun, Wang, Gumbart, Tajkhorshid, Villa, Chipot, Skeel, Kale & Schulten, 2005), CHARMM (Brooks et al., 2009), LAMMPS (Plimpton, 1995) y Desmond (Bowers et al., 2006). Como la estandarización de metodologías computacionales en estas herramientas ha sido clave para su adopción generalizada en la investigación científica. A diferencia de otros métodos de simulación molecular, que representan un único estado del sistema en estudio, la MD permite analizar su evolución temporal en escalas del orden de picosegundos a los microsegundos. Además, una de sus principales ventajas es que, al considerar explícitamente las velocidades de los átomos, posibilita no solo el cálculo de la energía potencial o la energía libre, como ocurre en muchos otros programas, sino también la determinación de la energía cinética, proporcionando una descripción más completa de la dinámica del sistema. Otra ventaja clave de la MD es su capacidad para simular el entorno del sistema, incluyendo el disolvente

(como el agua) y la presencia de iones. Asimismo, permite regular parámetros como la temperatura y la presión, además de incorporar entidades químicas adicionales, como metales, azúcares, cofactores y grupos prostéticos, que suelen ser excluidos en otros métodos de simulación debido a sus limitaciones. Esto proporciona una representación más realista del sistema en estudio. Sin embargo, es importante considerar que la inclusión de estos elementos incrementa tanto la complejidad del sistema como el tiempo de simulación necesario para obtener resultados precisos (Lozano-Aponte & Scior, 2014).

## **Etapas del proceso de dinamica molecular**

- I. Preparación del sistema: Se establece o selecciona la configuración inicial (CI), compuesta por  $N$  átomos, y se definen las condiciones de equilibrio (CE) necesarias para la simulación.
- II. Minimización de energía: A través de distintos conjuntos estadísticos o ensambles de simulación (microcanónico, canónico, isotérmico-isobárico), el sistema es llevado a un estado de equilibrio en el que la energía se mantiene prácticamente constante. Según el ensamble seleccionado, se pueden fijar condiciones constantes de energía, presión ( $P$ ) y/o temperatura ( $T$ ).
- III. Simulación de dinámica molecular: Se establece la duración de la simulación, definida en  $L$  pasos de ejecución (runs), y se inicia el cálculo de la dinámica molecular. Esta fase es la más demandante en términos de tiempo, pudiendo extenderse desde algunos picosegundos hasta microsegundos, lo que en términos computacionales puede representar desde horas hasta semanas de procesamiento. Durante este proceso, se calculan las fuerzas del sistema, permitiendo la obtención de diversas propiedades fisicoquímicas de interés.
- IV. Análisis de resultados: Una vez finalizada la simulación, se procesan y analizan los datos obtenidos. Dependiendo del paquete de software utilizado, es posible calcular múltiples parámetros y evaluar la trayectoria del sistema. Además, mediante visualizadores moleculares con interfaz gráfica, se pueden generar representaciones animadas para estudiar el comportamiento estructural y dinámico de las moléculas involucradas (Lozano-Aponte & Scior, 2014)

## 4. Materiales y metodos

### 4.1. Descripción del software GROMACS y los modelos empleados

Para llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular (MD) se empleó el paquete de simulación GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations), un software de código abierto optimizado para el estudio de biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. GROMACS ofrece una amplia gama de herramientas que facilitan la preparación del sistema, la ejecución de simulaciones y el análisis de trayectorias, permitiendo así un estudio detallado del comportamiento molecular. El proceso de simulación con GROMACS inicia con la preparación del sistema, que incluye la construcción del entorno molecular, la solvatación y la aplicación del campo de fuerza correspondiente. Posteriormente, se realiza una minimización de energía, cuyo objetivo es encontrar un estado inicial estable a partir del cual se pueda comenzar la integración numérica de las ecuaciones de movimiento. Una vez alcanzado este mínimo de energía, el sistema se somete a una fase de equilibración, en la que se ajustan sus propiedades termodinámicas mediante el uso de termostatos y baróstatos, según sea necesario. Finalmente, en la fase de producción, se lleva a cabo la simulación propiamente dicha y se recolectan los datos requeridos para el análisis posterior (García Delgado, 2022). GROMACS es un motor para realizar simulaciones de dinámica molecular y minimización de energía. Estas son dos de las muchas técnicas que pertenecen al ámbito de la química computacional y el modelado molecular. La química computacional es simplemente un término que indica el uso de técnicas computacionales en química, que abarcan desde la mecánica cuántica de moléculas hasta la dinámica de grandes agregados moleculares complejos. El modelado molecular describe sistemas químicos complejos en términos de un modelo atómico realista, con el objetivo de comprender y predecir propiedades macroscópicas basándose en un conocimiento detallado a escala atómica. A menudo, el modelado molecular se utiliza para diseñar nuevos materiales, lo que requiere la predicción precisa de las propiedades físicas de sistemas realistas (Abraham, Murtola, Schulz, Páll, Smith, Hess & Lindahl, 2023). Como ya se describió en el apartado 3.3, un campo de fuerzas es la suma de diversas contribuciones, incluyendo enlaces, ángulos, términos diedros, interacciones de Van der Waals e interacciones electrostática. Para nuestro estudio empleamos el campo de fuerza CHARMM36m (C36), una versión actualizada y ampliamente validada del conjunto CHARMM para lípidos. Esta parametrización introduce mejoras importantes en la representación de las interacciones entre grupos polares y cadenas hidrofóbicas, así como en la descripción de torsiones, cargas parciales y parámetros de Lennard-Jones. Gracias a estas optimizaciones, es posible realizar simulaciones bajo condiciones isotérmicas e isobáricas (ensamble NPT) sin necesidad de fijar el área de la membrana, lo que facilita el análisis de sistemas multicomponentes y con dinámica variable. El uso de C36 permite reproducir con alta precisión propiedades estructurales clave, como el área por lípido, el grosor de bicapa y los parámetros de orden de las cadenas acilo, en

excelente concordancia con datos experimentales (Janosi & Gorfe, 2010).

Desarrollado inicialmente por la comunidad CHARMM en el marco del software homónimo, el campo de fuerza CHARMM36 (C36) fue concebido con un enfoque riguroso en la parametrización de las interacciones no enlazantes de largo alcance, fundamentales para la fidelidad de las simulaciones biomoleculares. En particular, las interacciones de tipo Lennard-Jones (6-12), que describen las fuerzas de van der Waals, se tratan mediante una función de suavizado basada en la fuerza (*force-based switching function*), aplicada en el rango de 10 a 12 Å. Para las interacciones electrostáticas de largo alcance se emplea el método de Ewald en malla de partículas (PME), mientras que las interacciones no enlazadas del tipo 1-4 —es decir, aquellas entre átomos separados por tres enlaces covalentes, tanto de tipo Coulomb como Lennard-Jones— se consideran completamente, sin aplicar factores de escalamiento.

Cabe destacar que tanto el esquema de corte para las interacciones de van der Waals como el tratamiento de las interacciones 1-4 pueden diferir entre distintos campos de fuerza. Por ello, resulta esencial mantener la coherencia en estos parámetros al implementar el campo de fuerza C36 en diferentes motores de simulación molecular. Esta consistencia es particularmente crucial en sistemas lipídicos, dado que han demostrado ser altamente sensibles al método empleado para truncar las interacciones de tipo Lennard-Jones.

El campo de fuerza C36 fue parametrizado para reproducir con precisión una amplia gama de propiedades experimentales de bicapas lipídicas bajo condiciones de número de partículas, presión y temperatura constantes (ensamble NPT). A lo largo de su desarrollo, ha sido extendido para abarcar una gran variedad de clases lipídicas, tales como fosfoglicéridos, esfingolípidos, fosfatidilinosítoles, cardiolipinas, lípidos bacterianos, lípidos modificados por ésteres, lípidos poliinsaturados, colesterol y lipopolisacáridos. (Lee et al., 2015). En particular, (Klauda, Venable, Freites, O'Connor, Tobias, Mondragon-Ramirez, Vorobyov, MacKerell & Pastor, 2010) reportaron que las simulaciones de POPC utilizando CHARMM36 muestran un excelente acuerdo con los datos experimentales, reproduciendo con alta precisión el área por lípido, los perfiles de densidad, el orden de las cadenas acílicas, la distribución de agua y los parámetros obtenidos por RMN, lo que respalda la confiabilidad del campo de fuerza para el estudio detallado de membranas lipídicas.

En conclusión, el campo de fuerza CHARMM36 se ha consolidado como uno de los modelos más utilizados y confiables para representar las propiedades fisicoquímicas de bicapas lipídicas a nivel atómico. Gracias a su detallada parametrización basada en datos experimentales, permite reproducir de forma precisa propiedades clave como el área por lípido, los parámetros de orden de las cadenas acílicas y la compresibilidad lateral. No obstante, la fidelidad de los resultados obtenidos con este campo de fuerza depende críticamente de la implementación adecuada de los esquemas de interacción no enlazada, en particular del tratamiento del potencial de Lennard-Jones. (Lee et al., 2015)

## 4.2. Parámetros y configuración de la simulación

En este caso nos referimos a los valores y condiciones que se establecen antes de ejecutar una simulación computacional, asegurando que el sistema se comporte de manera realista y reproducible. Para nuestras simulaciones se tomaran en cuenta cada uno de los átomos disponibles en el sistema explícitamente (aproximación all atom). Como ya se menciono anteriormente utilizaremos el paquete GROMACS en particular el 2022.06. Estableceremos la topología de los lípidos, basandonos en el campo de fuerza CHARMM36m y el modelo de agua TIP3P. Los sistemas se acoplarán a un baño térmico y otro barostático dentro de un ensamble NpT ( $T = 300$  K,  $p = 1$  bar), utilizando el termostato Velocity rescale y el barostato de Parrinello-Rahman, respectivamente, hasta alcanzar la estabilidad. Las constantes del tiempo de acople para el barostato y termostato serán de  $\tau_p = 5,0$  ps y  $\tau_T = 1,0$  ps. El tiempo para la simulacion inicial sera de 1000ns , para luego tomar tiempo de análisis mas cortos de 500ns, realizando análisis periódicos para evaluar la estabilidad del sistema y las interacciones presentes. Las interacciones de Lennard-Jones y electrostáticas serán calculadas dentro de un radio de corte de 1,2 nm. Para el cálculo de las fuerzas electrostáticas se utilizara el método Particle-Mesh Ewald (PME). El paso de integración en las simulaciones será de 2 fs, manteniendo las restricciones topológicas para la longitud de los enlaces lipídicos y proteicos usando el algoritmo LINCS. Para estas simulaciones se utilizaran condiciones periódicas de contorno en todas las direcciones.

### Protocolo a seguir

Se diseñó un protocolo de enfriamiento para las membranas en estudio, abarcando un rango de temperaturas desde 288 K hasta 258 K. Para cada descenso de temperatura, se tomó como referencia la temperatura final de la simulación anterior. Con el objetivo de evitar efectos de memoria o estados estructurales estables, se aplicó un paso intermedio de calentamiento, aumentando la temperatura en 50 K respecto a la inicial. Luego, se realizó el enfriamiento controlado hasta la nueva temperatura objetivo, seguido de una etapa de estabilización.

El procedimiento comenzó con la estabilización inicial del sistema mediante un proceso de annealing, que consistió en un enfriamiento progresivo desde 303 K hasta 288 K. Esta última temperatura se estableció como punto de partida para las sucesivas etapas de enfriamiento hasta alcanzar los 258 K.

La simulación inicial se dividió en dos fases: un proceso de enfriamiento desde 303 K hasta 288 K con una duración de 100 ns, seguido de una etapa de estabilización de 1000 ns. En conjunto, este protocolo representó un tiempo total de 1100 ns, como se muestra en la Figura 5.

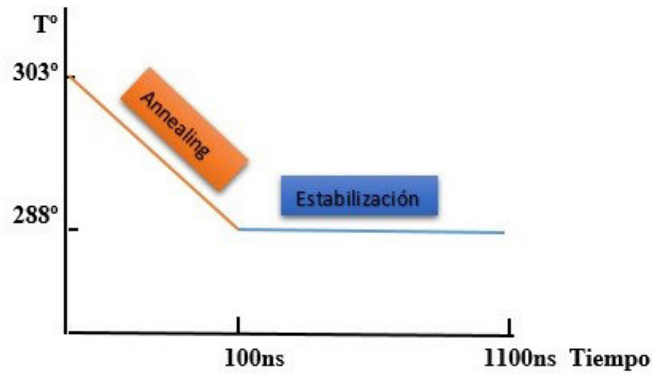


Figura 5: Esquema representativo del Annealing inicial y la posterior estabilización

Para el proceso de enfriamiento se empleó un protocolo similar al utilizado en el calentamiento. Este consistió en tomar como referencia la temperatura inicial ( $T_0$ ) correspondiente a cada simulación previa, incrementarla en 50 K, y luego reducirla gradualmente hasta alcanzar la temperatura objetivo de la simulación ( $T_1$ ). Este procedimiento se aplicó para cada una de las temperaturas ensayadas: 283 K, 278 K, 273 K, 268 K, 263 K y 258 K. Cada simulación comenzó con una etapa de calentamiento de 25 ns, seguida por un enfriamiento controlado de 25 ns. Posteriormente, se llevó a cabo una fase de estabilización de 25 ns, antes de iniciar la corrida principal de simulación, que tuvo una duración de 500 ns. En total, cada protocolo completo abarcó 575 ns, como se detalla en la Figura 6

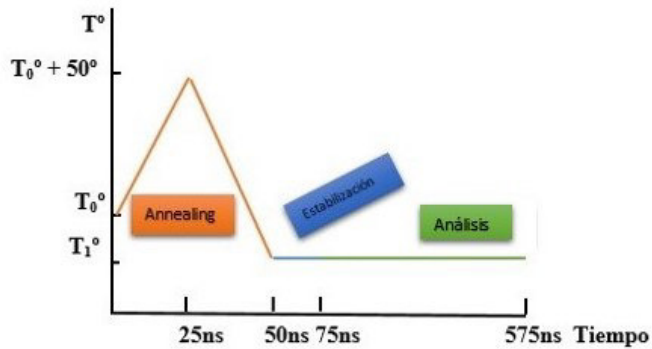


Figura 6: Esquema representativo del proceso de enfriamiento

Por ultimo se realizaron protocolos en los cuales se procedía por un lado al calentamiento de la membrana desde 258K a 288K denominado Annealing de calentamiento (*heating*) y tambien al enfriamiento desde 288K a 258K denominado Annealing de enfriamiento (*cooling*).

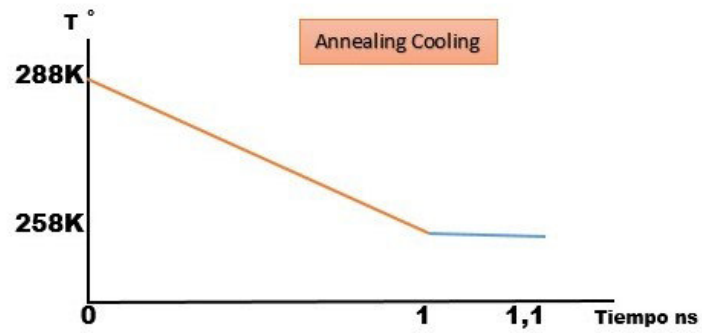


Figura 7: Esquema representativo del annealing cooling

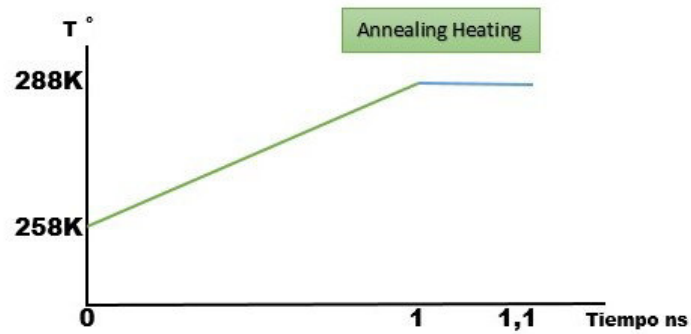


Figura 8: Esquema representativo del annealing heating

## 5. Métodos de análisis de datos

### 5.1. Análisis de área y espesor de ambos sistemas

Para comenzar, se analizaron las variaciones del área por lípido en bicapas de POPC y POPC oxidado, dentro de un rango de temperaturas comprendido entre 288 K y 258 K. En cada caso, se calcularon los valores promedio y el desvío estándar a partir de las mediciones previamente obtenidas. Las tendencias resultantes se presentan en la Figura 9, que permite comparar el comportamiento de ambos sistemas.

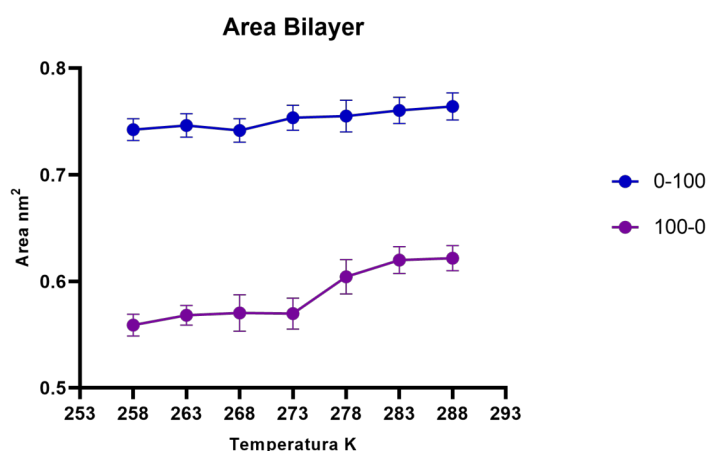


Figura 9: La siguiente figura evidencia la variación del promedio de las distintas Áreas en función de la temperatura, para ambas membranas de POPC (100-0) y POPC-oxidado (0-100)

Al analizar el gráfico perteneciente a la figura 9, se observa que a lo largo de todo el rango de temperaturas estudiado, el área por lípido en la membrana de POPC oxidado (0-100) es significativamente mayor (0.74-0.76nm<sup>2</sup>) en comparación con la membrana de POPC puro (100-0), cuyos valores se mantienen considerablemente más bajos (0.56-0.63nm<sup>2</sup>). Esta diferencia sostenida sugiere que la presencia de lípidos oxidados altera notablemente el empaquetamiento de la bicapa, favoreciendo una expansión lateral. También se observa una clara dependencia con la temperatura en ambos sistemas, el área por lípido aumenta progresivamente con el incremento térmico, un comportamiento esperable dado que el aumento de temperatura favorece la agitación térmica y reduce el orden lipídico. No obstante, este aumento es más pronunciado en la membrana de POPC puro, donde se aprecia un cambio abrupto en el área entre 273K y 283K. Este salto nos sugiere el posible inicio de una transición de fase —de gel a líquido fluido— en ese intervalo que se ve finalizada en 283K. En contraste, la membrana de POPC oxidado presenta un comportamiento más suavizado, sin evidencias claras de una transición cooperativa, lo que indica una mayor fluidez

incluso a bajas temperaturas, atribuible al desorden estructural inducido por los lípidos oxidados.

Además reforzando lo anterior las barras de error son mayores en la región 273K-283K, para la membrana de POPC puro, lo cual suele ser típico de una zona donde se produce una transición de fases. Para finalizar en la transición de fases es típico un aumento del área de entre aproximadamente un 10 % y un 15 %. Concordando con los valores medidos, donde el área aumenta desde  $0,57\text{nm}^2$  a 273K hasta  $0,62\text{nm}^2$  283K. Para el caso de la membrana oxidada el aumento del área en el intervalo 268K a 273K, no es de entre un 10 % a un 15 %, sino que es de 1,62 % confirmando que no hay una transición de fase apreciable en ese intervalo.

En cuanto al espesor de membrana, se llevó a cabo un análisis análogo al realizado para el área por lípido. Se evaluaron las bicapas de POPC y POPC oxidado en un rango de temperaturas entre 258K a 288K. Para cada condición térmica se calcularon los valores promedio y los desvíos estándar del espesor, a partir de las mediciones obtenidas. Estos datos fueron empleados para construir las curvas comparativas que se presentan en la Figura 10.

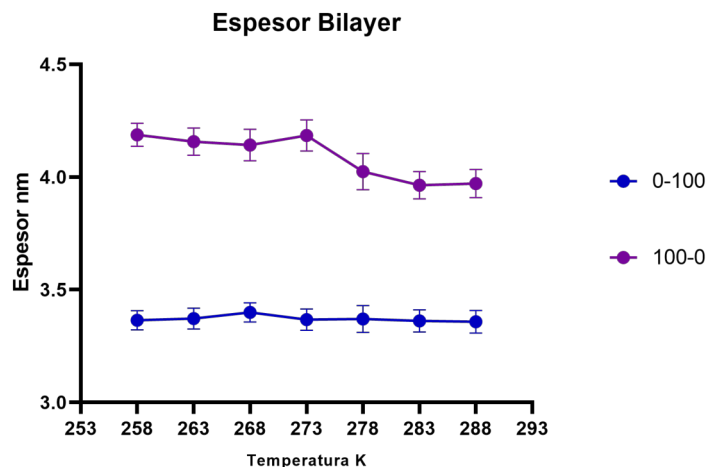


Figura 10: Variación del promedio de los distintos espesores en función de la temperatura, para ambas membranas de POPC (100-0) y POPC-Oxidado (100-0)

Al analizar el gráfico de la figura 10, se visualiza que a lo largo de todo el rango de temperaturas estudiado, el espesor de la membrana de POPC puro es consistentemente mayor ( 4.1–4.3nm) en comparación con la membrana de POPC oxidado cuyos valores se mantienen en un rango más bajo ( 3.45–3.55nm). Esta diferencia sostenida sugiere que la presencia de lípidos oxidados induce una reorganización estructural que favorece una disminución mayor del espesor medio de la bicapa. Estos hallazgos son coherentes con los resultados obtenidos para el área por lípido, ya que, en términos estructurales, se espera una relación inversa entre espesor y área: a medida que la bicapa se expande lateralmente, su espesor tiende a reducirse. En este contexto, la bicapa de POPC oxidado muestra un espesor prácticamente constante a lo largo de todo el rango de temperaturas analizado. Por otra parte al analizar los intervalos para el caso de la bicapa de POPC puro muestra una disminución pronunciada del espesor en el intervalo de temperaturas entre 273K y 283K, coincidiendo de manera precisa con el salto observado en el área por lípido en el gráfico anterior. Este comportamiento nos sugiere la presencia de una posible transición de fase, probablemente de gel a fluida, que afecta la organización estructural de la bicapa.

Para realizar una comparación más detallada de los resultados anteriores, se construyeron gráficos de barras que muestran las variaciones del área por lípido y del espesor de membrana en los diferentes intervalos de temperatura: 258K–263K, 263K–268K, 268K–273K, 273K–278K, 278K–283K y 283K–288K.

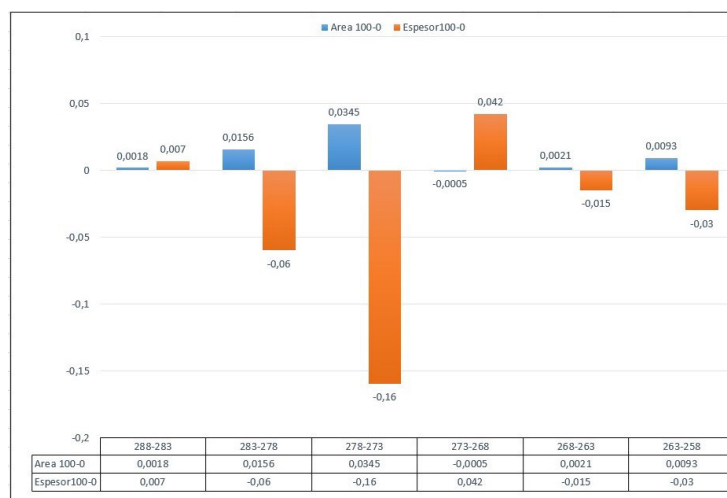


Figura 11: En el gráfico de barras siguiente, se compara la variación del área por lípido y del espesor en función de distintos intervalos de temperatura para la membrana de POPC (100-0).

En la figura 11 se observa con claridad que, en el intervalo de 273K a 278K, se produce un incremento en el área por lípido de  $\Delta A = +0,0345\text{nm}^2$  y una disminución del espesor de  $\Delta dL = 0,16\text{nm}$ . Estos cambios abruptos refuerzan la hipótesis de que inicia una transición de fase tipo gel a líquido fluido, en la bicapa no oxidada. También es interesante observar el intervalo siguiente 278K a 283K en el cual  $\delta A = +0,0156^2$  donde aun se expande pero menos que el anterior y  $\Delta dL = 0,06\text{nm}$  donde todavía hay una reducción considerable. Esto podría sugerir que la transición no es instantánea sino gradual en ese amplio rango de temperatura. Y además refuerza la hipótesis que existe una posible transición de fase en el intervalo 273K a 283K.



Figura 12: En el gráfico de barras siguiente, se compara la variación del área por lípido y del espesor en función de distintos intervalos de temperatura para la membrana de POPC-Oxidado (0-100).

Comparativamente en la figura 12, observamos cambios mucho más sutiles sin ningún salto importante, como pasaba anteriormente. El punto más característico lo observamos en el intervalo 268K a 273K donde existe una ligera reducción del  $\Delta dL$  con un valor de  $0,033\text{nm}$  y una ligera expansión del  $\Delta A$  con un valor de  $+0,0121\text{nm}^2$ . Esto sugeriría una leve flexibilidad estructural, pero sin una transición cooperativa tal como ocurría en la membrana no oxidada.

Luego se realizó un análisis de estabilidad térmica de las variables, para ello se implementó un protocolo de annealing que incluyó un ciclo de calentamiento progresivo (heating) seguido de un enfriamiento controlado (cooling) en ambos sistemas.

Durante el heating, la temperatura se incrementó en pasos definidos, permitiendo analizar la evolución estructural de ambas bicapas desde un estado más ordenado (tipo gel) hacia uno más fluido (líquido desordenado). En el cooling, se evaluó la capacidad del sistema para recuperar su organización original, identificando posibles efectos irreversibles asociados tanto a las perturbaciones inducidas por la temperatura como a la presencia de lípidos oxidados en uno de los modelos. Este enfoque permitió estudiar el grado de reversibilidad estructural y la posible pérdida de memoria térmica asociada a la oxidación lipídica.

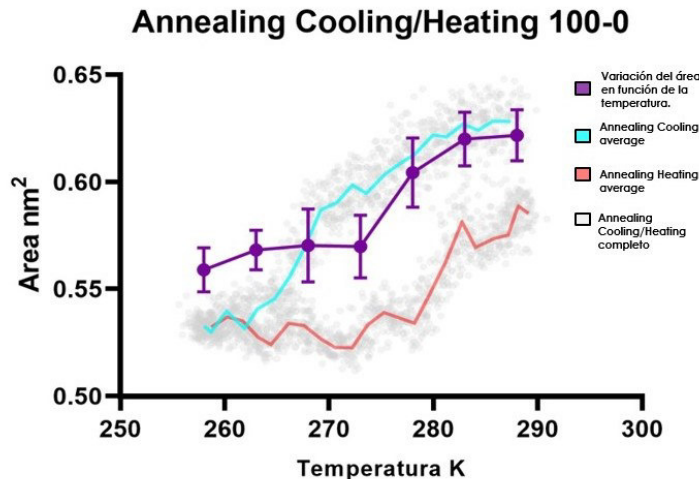


Figura 13: Proceso de annealing Cooling/Heating 100-0 comparativamente con la variación del área por lípido. En cuanto a la codificación de colores, la curva violeta representa la variación del área por lípido en función de la temperatura, mientras que las nubes de puntos grises corresponden a los valores obtenidos durante los protocolos de annealing (heating y cooling). Las curvas celeste y roja indican los promedios correspondientes a los procesos de enfriamiento y calentamiento, respectivamente.

En la figura 13 se observa un proceso de histeresis térmica, evidenciado por la falta de recuperación completa del estado estructural inicial tras el ciclo térmico. La divergencia entre estas curvas refuerza la presencia de una posible transición de fase parcialmente irreversible en el sistema. Además se puede visualizar que solo a bajas temperaturas se aprecia un solapamiento parcial entre las curvas de calentamiento y enfriamiento, lo que indica una reversibilidad limitada. Se identifica una posible pre-transición alrededor de los 268 K y un salto abrupto en el área por lípido entre 273 K y 283 K, lo cual sugiere la ocurrencia de una

transición de fase del tipo gel a líquido desordenado. En conclusión, el sistema de POPC puro presenta una estructura ordenada a bajas temperaturas, y atraviesa una transición de fase con un comportamiento parcialmente irreversible dentro de la escala temporal de la simulación.

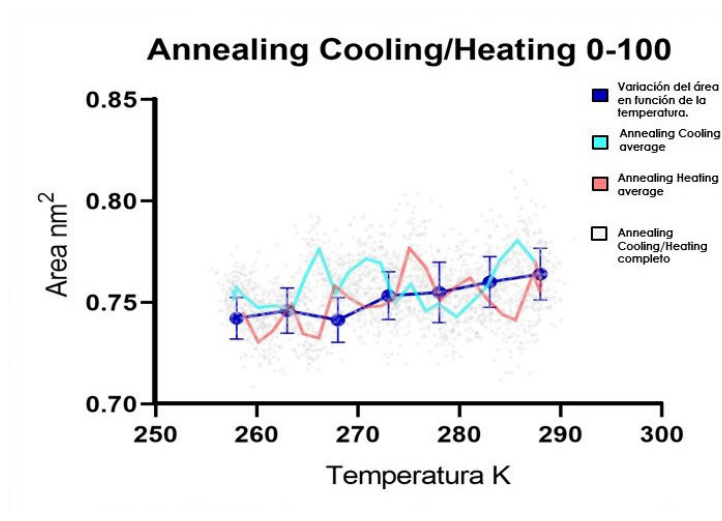


Figura 14: *Proceso de annealing Cooling/Heating 0-100 comparativamente con la variación del área por lípido. En cuanto a la codificación de colores, la curva azul representa la variación del área por lípido en función de la temperatura, mientras que las nubes de puntos grises corresponden a los valores obtenidos durante los protocolos de annealing (heating y cooling). Las curvas celeste y roja indican los promedios correspondientes a los procesos de enfriamiento y calentamiento, respectivamente.*

En contraste en la figura 14, el análisis del ciclo térmico heating-cooling reveló una superposición prácticamente completa entre las curvas de calentamiento y enfriamiento, sin evidencia de histéresis térmica. El área por lípido aumenta levemente con la temperatura, pero sin presentar saltos abruptos ni discontinuidades que indiquen una transición de fase cooperativa. Esta respuesta térmica suave y reversible sugiere que la bicapa se mantiene en un estado estructuralmente desordenado a lo largo de todo el rango de temperaturas evaluado, probablemente como consecuencia de la alteración del empaquetamiento lipídico inducida por la oxidación. En este contexto, no se observa irreversibilidad estructural ni señales de memoria térmica, lo que indica que el sistema responde de manera uniforme ante variaciones térmicas. Este comportamiento es característico de sistemas previamente desordenados y sugiere que la oxidación compromete de forma significativa la capacidad adaptativa de la membrana frente a cambios de temperatura.

## 5.2. Observación directa de la organización lipídica en las membranas

Para la visualización de nuestras membranas empleamos el programa VMD (Visual Molecular Dynamics), una herramienta especializada en gráficos moleculares que permite analizar estructuras complejas. Este software es capaz de representar múltiples estructuras de manera simultánea, utilizando diversos estilos de renderizado y esquemas de coloreado. Las moléculas se representan mediante una o varias “representaciones”, cada una de las cuales aplica un método específico de visualización y coloración a un subconjunto definido de átomos (Humphrey, Dalke & Schulten, 1996).

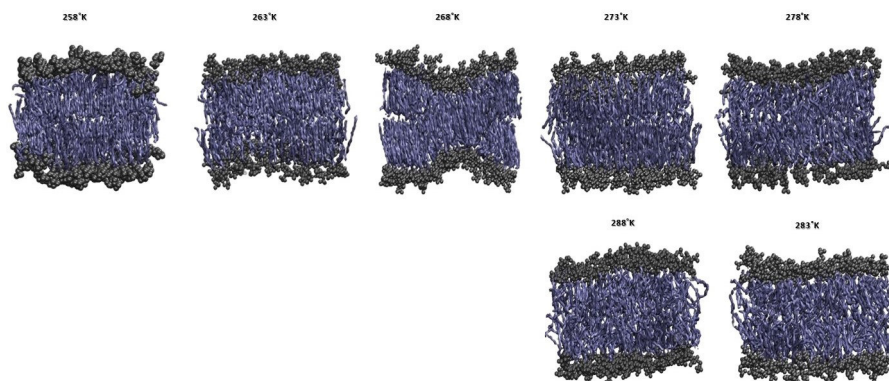


Figura 15: Visualización de las membranas mediante VMD. Se muestran los cambios que sobre la membrana de POPC-puro, desde 258K hasta 288K

En la Figura 15 se observa un patrón inicial de lípidos más ordenado, con las cadenas acílicas inclinadas, característico de una fase relativamente ordenada. A medida que aumenta la temperatura, esta organización se va perdiendo progresivamente, evidenciándose un incremento en el desorden lipídico y la aparición de interdigitación entre las cadenas. A partir de 273K, el desorden se vuelve notablemente más pronunciado, alcanzando su máximo alrededor de 283K.

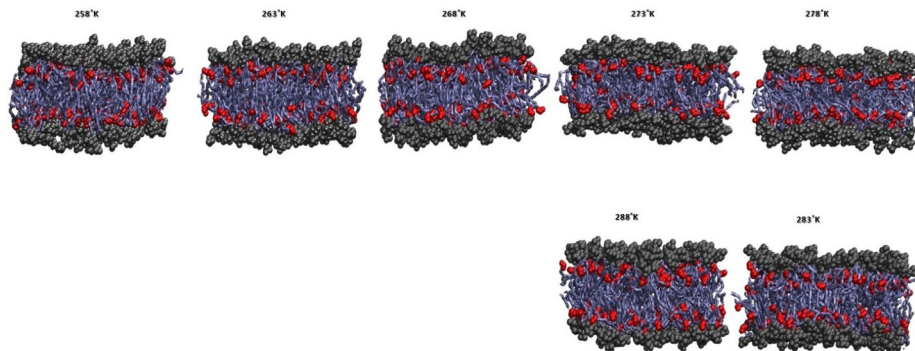


Figura 16: Visualización de las membranas mediante VMD. Se muestran los cambios que sufre la membrana de POPC-oxidado, desde 258K hasta 288K

En la Figura 16 se evidencia un notable desorden en la organización lipídica incluso a temperaturas bajas. Se observa una pérdida temprana de la inclinación de las cadenas acílicas, dando lugar a una disposición desorganizada, con presencia de interdigitación entre las colas. Este patrón de desorden se mantiene relativamente constante a lo largo del rango de temperaturas analizado. Cabe destacar que la proximidad de los grupos oxidados a las cabezas polares contribuye a perturbar significativamente la organización de las cadenas hidrofóbicas. Tal como observaron (Weber et al., 2014) cuando se oxidan los dobles enlaces en las cadenas lipídicas insaturadas, generando grupos  $-OOH$ . Estos grupos se reubican hacia la superficie de la bicapa, lo que expande la bicapa al aumentar el espacio que ocupa cada lípido.

### 5.3. Perfiles de densidad normalizada en función de la distancia al centro de la membrana eje Z

Continuando con lo anterior se procedió a analizar los perfiles de densidad de distintos grupos comenzando por los grupos acilo. Los perfiles fueron tomados a partir de las simulaciones a diferentes temperaturas desde 258K hasta 288K. Se observaron primero los de la membrana perteneciente a POPC puro y luego POPC oxidado.

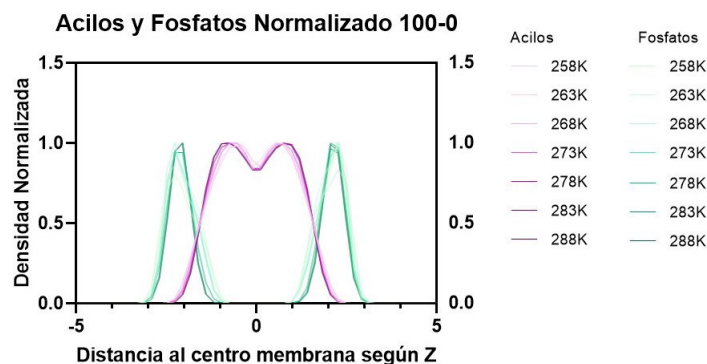


Figura 17: Perfiles de densidad normalizada para los grupos acilo (violeta) y fosfato (verde) del sistema 100-0 (POPC puro) desde 258K hasta 288K.

Al analizar la figura 17, se observa que los perfiles de densidad están centrados con respecto al plano medio de la membrana, y que la densidad máxima alcanza el valor de 1, lo cual indica una normalización adecuada.

De acuerdo con los datos experimentales previos, se espera que a 258K la membrana se encuentre en fase gel, comenzando la transición de fases alrededor de los 273K. En consonancia con esto, entre 258K y 263K se identifica un perfil con doble pico bien definido y simétrico respecto al centro de la bicapa. La menor separación entre picos es característica de un estado más compacto, propio de la fase gel.

A medida que la temperatura aumenta (268K–273K), se observa un ensanchamiento progresivo de la separación entre picos. Además, el mínimo central se hace más profundo, reflejando una mayor separación entre las monocapas. A 273K, esta meseta central se amplía aún más y los picos mantienen su simetría, aunque con curvaturas más suavizadas, lo que sugiere que el sistema está atravesando una transición de fase.

Finalmente, entre 278K y 288K, el valle central se profundiza aún más, lo que indica una separación más pronunciada entre las monocapas. Si bien los picos se mantienen definidos, su altura se estabiliza, lo cual sugiere un aumento en la movilidad lateral de los lípidos y un mayor grado de desorden. Es importante destacar que a 278K se registra una ampliación significativa de la distancia entre picos, compatible con el aumento del espesor.

En el caso de los grupos fosfato, ubicados en la interfase membrana-agua, sus perfiles se mantienen relativamente bien definidos y simétricos a lo largo de todo el rango térmico. Sin embargo, se aprecia una clara tendencia al desplazamiento hacia posiciones más externas conforme aumenta la temperatura. A 258K y 263K, los picos son más estrechos y se sitúan más cerca del centro, reflejando un estado más compacto de la bicapa. En contraste, entre 273K y 288K los picos se desplazan hacia las regiones más periféricas (laterales del gráfico), lo que indica un aumento en el espesor de la bicapa, en coherencia con el alargamiento de las colas acilo en una fase más fluida y desordenada.

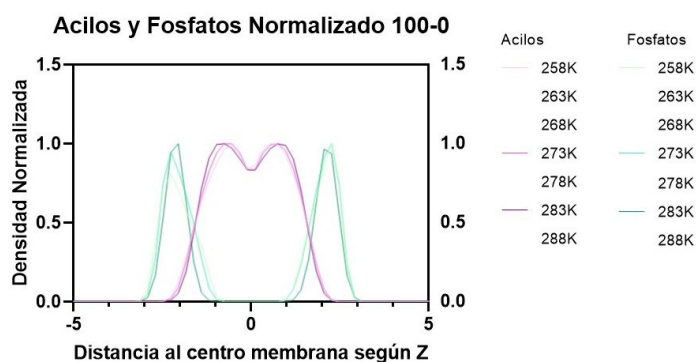


Figura 18: Perfiles de densidad normalizada para los grupos acilo (violeta) y fosfato (verde) del sistema 100-0 (POPC puro) a tres temperaturas clave: 258K, 273K y 288K.

A continuación, se presenta un análisis más detallado de los perfiles de densidad correspondientes a tres temperaturas clave del sistema: 258K, donde la membrana se encuentra en fase gel; 273K, correspondiente al inicio de la transición de fase; y 283K, momento en el que se alcanza una fase fluida bien establecida.

- Fase Ordenada 258K: Los grupos acilo muestran un perfil con dos picos simétricos y un valle central ligeramente elevado. Esta configuración sugiere un fuerte acoplamiento entre las monocapas y la posible presencia de interdigitación parcial, lo cual es característico de una fase gel bien organizada, con colas lipídicas altamente ordenadas. Por su parte, los grupos fosfato presentan picos estrechos, altos y localizados cerca del centro de la bicapa, reflejando una membrana compacta y rígida, con una interfase lípido-agua bien definida.
- Fase transición 273K: Los perfiles de los grupos acilo comienzan a evidenciar cambios estructurales, los picos laterales se separan ligeramente y adoptan una curvatura más redondeada, mientras que el valle central se profundiza. Esto indica un inicio del desacoplamiento entre monocapas y una mayor movilidad lateral de las colas, típico de un estado de transición

hacia la fase fluida. Simultáneamente, los picos de los grupos fosfato comienzan a desplazarse hacia regiones más externas de la membrana, lo que sugiere un incremento en el espesor de la bicapa y una reorganización progresiva en la interfase polar.

- Fase fluida bien establecida 283K: Los grupos acilo presentan picos ampliamente separados y un valle central profundo y ancho, lo que denota una bicapa en fase líquida, con alto grado de desorden dinámico y separación efectiva entre monocapas. En cuanto a los grupos fosfato, sus picos se encuentran desplazados hacia posiciones aún más externas, coherente con una extensión vertical de las moléculas lipídicas, atribuible a la orientación más recta de las colas en la fase fluida.

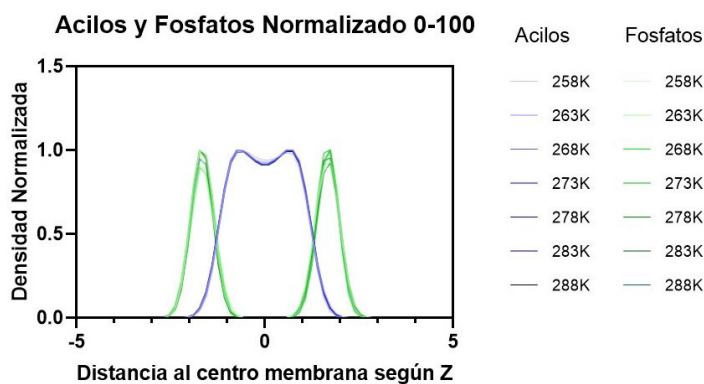


Figura 19: Perfiles de densidad normalizada para los grupos acilo (azul) y fosfato (verde) del sistema 0-100 (POPC oxidado) a diferentes temperaturas (258K hasta 288K).

En contraste para el caso de la figura 18, los perfiles de densidad presentan una forma bimodal simétrica con respecto al eje 0, que corresponde al plano medio de la bicapa. A lo largo de todas las temperaturas analizadas, la morfología general del perfil se mantiene estable: los picos continúan siendo bien definidos y se localizan aproximadamente entre  $\pm 1.5$  y  $\pm 2$  nm, lo que sugiere una organización estructural consistente y bien delimitada de las colas dentro del núcleo hidrofóbico. La densidad máxima normalizada permanece cercana a 1, lo que indica una correcta normalización del sistema y una compactación local homogénea de los acilos a lo largo del rango térmico.

Al incrementarse la temperatura, se observa una leve expansión lateral de los picos, reflejando un sutil aumento en el desorden estructural, en concordancia con los resultados previos que muestran un incremento progresivo del área por lípido. El valle centrado en  $x = 0$  se conserva en todas las condiciones térmicas, lo cual sugiere que desde 258 K ya existe un cierto nivel de desorden en el centro de la bicapa. Este comportamiento es característico de un sistema parcialmente fluido desde las temperaturas más bajas, atribuible a la oxidación lipídica.

En conjunto, estos resultados refuerzan la hipótesis de que, a lo largo del rango térmico considerado, no se produce una transición cooperativa de fase claramente definida, a diferencia de lo observado para el sistema de POPC puro.

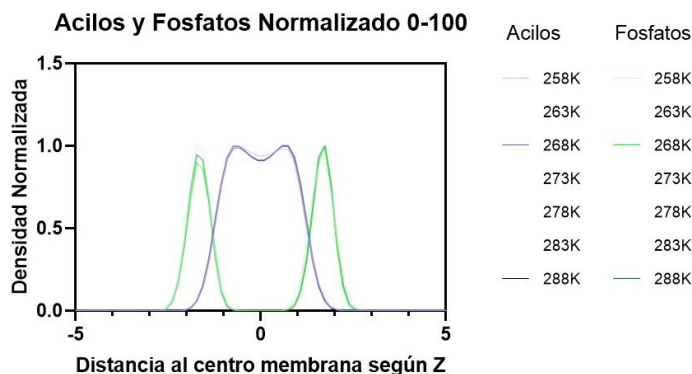


Figura 20: Perfiles de densidad normalizada para los grupos acilo (azul) y fosfato (verde) del sistema 0-100 (POPC oxidado) a tres temperaturas clave: 258K, 268K y 288K.

Al observar los perfiles de densidad de acilos y grupos fosfato a 258K, 268K y 288K (figura 19), se identifican características que refuerzan la hipótesis de que la bicapa de POPC oxidado no presenta una transición de fase del tipo cooperativa, como sí ocurre en la membrana pura.

En primer lugar, los perfiles de los acilos muestran una forma bimodal bien definida en todas las temperaturas, con picos simétricos respecto al plano medio de la bicapa. A 258K, ya se observa un valle central claramente pronunciado, lo que indica la existencia de una separación estructural entre monocapas incluso a bajas temperaturas. Esto es un comportamiento atípico si se espera una fase gel, donde normalmente habría un acoplamiento mayor entre monocapas y un perfil más compacto con un solo pico o con un valle menos definido. Este comportamiento sugiere que el sistema ya presenta cierto grado de desorden o fluidez desde la temperatura más baja analizada.

A 268K, aunque se observa un aumento apreciable en el área por lípido (como se mostró en los análisis anteriores), el perfil de densidad no presenta cambios abruptos ni en la forma ni en la posición de los picos principales. El leve ensanchamiento de estos picos sugiere un incremento en el espesor de la bicapa, reflejando una expansión en dirección normal al plano de la membrana, pero no constituye por sí solo evidencia de una transición de fase cooperativa. Además, la persistencia del valle central con una profundidad similar indica que el núcleo hidrofóbico conserva su organización general sin signos de una reorganización estructural repentina.

Finalmente, a 288K, los perfiles continúan mostrando la misma topología general. Los picos de los grupos acilos se mantienen relativamente en las mismas posiciones ( $\pm 1.5$  a  $\pm 2$  nm) y la densidad máxima sigue cercana a 1, lo

cual refuerza la idea de una estructura bien organizada a pesar del aumento térmico. Por su parte, los grupos fosfato muestran un desplazamiento progresivo hacia el exterior conforme aumenta la temperatura, sin pérdida de simetría ni ensanchamientos marcados que indiquen desorganización en la interfase.

En conjunto, este comportamiento sugiere que el POPC oxidado presenta un estado parcialmente fluido ya desde bajas temperaturas, y que el incremento térmico induce una expansión térmica gradual, sin señales de una transición de fase brusca. Esto es coherente con un modelo en el que la oxidación impide la compactación característica de la fase gel, promoviendo un estado más desordenado y heterogéneo desde el inicio.

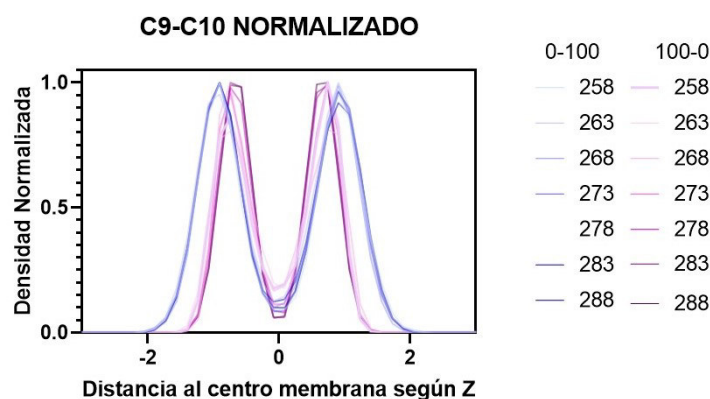


Figura 21: Perfiles de densidad normalizada para los carbonos 9 y 10, para el POPC puro 100-0 (violeta) y POPC oxidado 0-100 (azul) a diferentes temperaturas (258K hasta 288K).

Al analizar la figura 21, los perfiles de densidad de los carbonos 9 y 10, tanto el POPC puro como el POPC oxidado, presentan perfiles bimodales simétricos respecto del plano medio ( $Z = 0$ ), lo que indica una distribución organizada de las cadenas acilo en ambas monocapas. También que a bajas temperaturas (258K–263K), el perfil del POPC oxidado (azul) es visiblemente más ensanchado y aplanado en la región central, con una menor densidad en el valle ( $Z = 0$ ), lo que sugiere mayor desorden estructural incluso en condiciones donde el POPC puro (violeta) se encuentra en fase gel. Esto es un indicador temprano de fluidez inducida por oxidación. Además en el POPC puro, al aumentar la temperatura, los picos se separan más y el valle central se profundiza gradualmente, como se esperaría en una transición de gel a líquido. En cambio, el POPC oxidado muestra menores variaciones, con una estructura que desde el inicio ya presenta características de fase más fluida, manteniéndose relativamente constante incluso hasta 288K. En general, el POPC puro muestra picos más altos a bajas temperaturas, reflejando mayor orden y compactación, mientras que el oxidado muestra picos más bajos y anchos, señal de mayor libertad conformacional de las cadenas. Este perfil refuerza la hipótesis de que el POPC oxidado no sufre una transición de fase cooperativa clara, como sí lo hace el POPC puro. La

oxidación parece inducir un estado de fluidez parcial desde temperaturas bajas, evidenciado por el perfil más desordenado, amplio y con menor definición de picos en los carbonos centrales C9-C10.

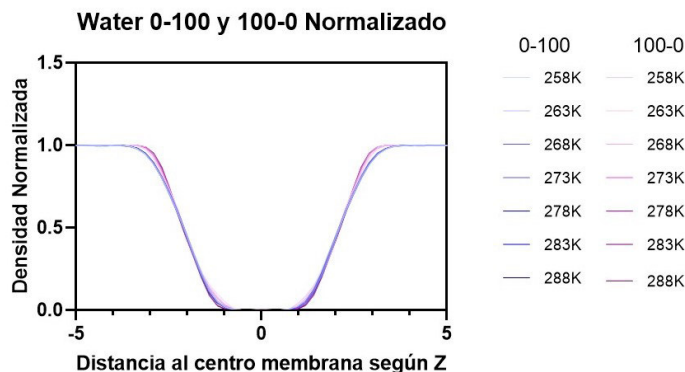


Figura 22: Perfiles de densidad normalizada del agua, para el POPC puro 100-0 (violeta) y POPC oxidado 0-100 (azul) a diferentes temperaturas (258K hasta 288K).

La figura 22, muestra la densidad normalizada del agua en función de la distancia respecto del plano medio de la bicapa. Este tipo de perfil se utilizó para evaluar la interfaz membrana-agua, y evidenciar la penetración de agua y el grado de hidratación superficial de las bicapas lipídicas. Podemos decir que:

- Ambos sistemas presentan una región central completamente deshidratada, como se espera en una bicapa lipídica estable. La densidad del agua cae a aproximadamente 0 en el centro, confirmando que el núcleo hidrofóbico está libre de agua. Además no se observan penetraciones anómalas del agua hacia el núcleo, ni en POPC puro ni en el oxidado.
- La transición de densidad del agua desde aproximadamente 1 a 0 ocurre en un rango estrecho y bien definido (alrededor de  $\pm 2.5$  nm), indicando una interfaz aguda y compacta entre el agua y la bicapa. En el POPC oxidado (azul), puede notarse una ligera expansión lateral en el perfil a temperaturas más altas (273K–288K), lo que sugiere que la oxidación no afecta significativamente la impermeabilidad de la bicapa, pero sí modifica levemente la organización superficial.
- La densidad de agua es constante y normalizada a aproximadamente a 1 en ambas direcciones. No hay diferencias notables entre ambos sistemas en la región de bulk, lo que confirma que las observaciones se centran en las diferencias estructurales de la bicapa.

Según esto podemos decir que, a pesar de la oxidación, la bicapa sigue excluyendo eficientemente el agua del núcleo lipídico, tanto en fase ordenada como fluida. Además existe una ligera expansión de la interfase en el sistema oxidado,

especialmente a temperaturas más altas, lo cual es coherente con una mayor flexibilidad o desorden superficial, pero no compromete la integridad estructural. Para finalizar, aunque la densidad de agua no muestra cambios abruptos, la sutil diferencia en la pendiente sugiere que el POPC oxidado tiende a ser más dinámico en su zona superficial, lo cual es coherente con los perfiles previos de acilos y fosfatos.

#### 5.4. Parametro de orden (DOP-Sch) de las cadenas hidrocarbonadas de ambos fosfolipidos en los diferentes sistemas

Ademas se analizaron los parametros de orden para cada cadena de carbono correspondiente a POPC y POPC oxidado. Sc1 corresponde al oleico y Sc2 al palmitico. Para el caso de POPC y la cadena Sc1 tenemos el siguiente grafico correspondiente a la figura 23.

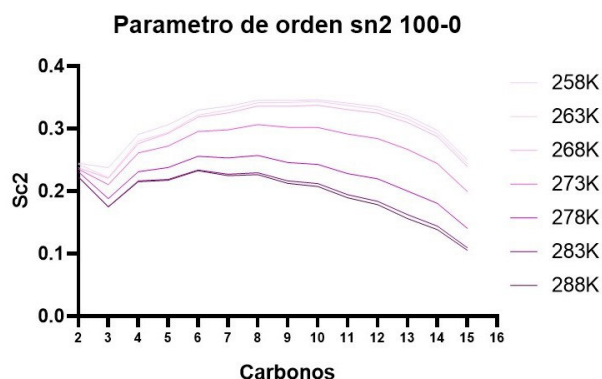


Figura 23: Variación de los parámetros de orden  $S_{CD}$ , cadena correspondiente al palmitico, sin la insaturación. Para el POPC puro 100-0 a diferentes temperaturas 258K hasta 288K.

Se observa un patrón decreciente del parámetro de orden a lo largo de los carbonos de la cadena sn-2 (palmitoil), típico del comportamiento estructural de las colas lipídicas. Este perfil refleja una mayor rigidez en los primeros carbonos (cercaos al glicerol) y un aumento progresivo del desorden hacia los extremos terminales.

A 258K, el perfil presenta los valores más altos de orden, indicando un estado compacto y altamente organizado de las cadenas, consistente con una fase gel. A medida que la temperatura se incrementa, las curvas muestran una disminución progresiva en los valores de SCD, reflejando una pérdida de orden conforme las colas adquieren mayor flexibilidad.

Particularmente, a 273K se aprecia una disminución más abrupta en el orden, lo que sugiere el inicio de una transición de fase. Esta interpretación se ve reforzada por el solapamiento de las curvas correspondientes a 283K y 288K, que indican que a partir de 283K el sistema ha alcanzado un estado estable en fase fluida. En esta fase, las cadenas presentan un alto grado de desorden dinámico, típico de una membrana en fase líquida desorganizada lateralmente.

En conjunto, este comportamiento es coherente con los otros análisis estruc-

turales previos y refuerza la hipótesis de que en el POPC puro puede existir una transición de fase entorno a los 273K, completándose hacia los 283K.

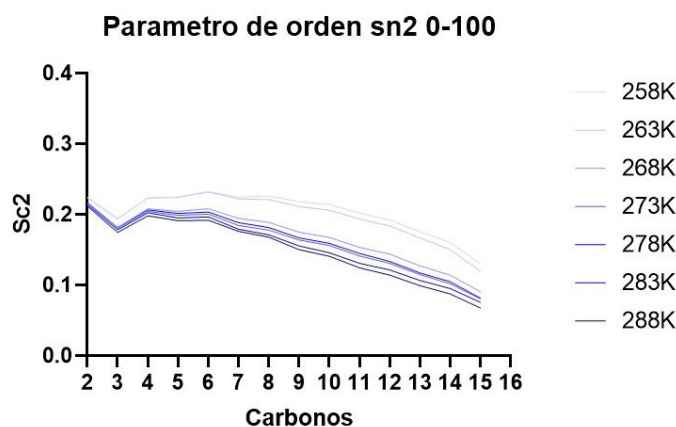


Figura 24: Variación de los parámetros de orden  $S_{n2}$ , cadena correspondiente al palmitico, sin la insaturación. Para el POPC oxidado 0-100 a diferentes temperaturas (258K hasta 288K).

En la figura 24 se representa el comportamiento del parámetro de orden SCD para la cadena sn-2 del POPC oxidado. Se observa, al igual que en el POPC puro, un patrón decreciente a lo largo de la longitud de la cadena, reflejando un aumento del desorden hacia los carbonos terminales. Sin embargo, los valores de orden absoluto son notablemente más bajos en todas las temperaturas, lo cual sugiere que la oxidación genera un estado estructuralmente más desordenado incluso a bajas temperaturas. A medida que la temperatura aumenta, se observa un descenso progresivo del orden, aunque de forma más atenuada que en el sistema no oxidado. Se destaca un cambio perceptible en la pendiente y en los valores de SCD a 268K, en coincidencia con el aumento en el área por lípido observado previamente. No obstante, esta variación no es lo suficientemente abrupta como para indicar una transición de fase cooperativa. En lugar de ello, el sistema parece presentar un estado progresivamente más desordenado sin una transición definida. Al comparar directamente con los valores correspondientes del sistema POPC puro (100-0), se observa que mientras en el sistema no oxidado los valores de SCD llegan a superar 0.35 en la región central de la cadena, en el sistema oxidado rara vez alcanzan 0.22. Esta diferencia cuantitativa refuerza la hipótesis de que la oxidación induce una pérdida estructural de orden en las colas lipídicas, lo que a su vez favorece una expansión lateral (aumento del área) sin generar una transición de fase clásica.

En resumen, el perfil de orden del POPC oxidado evidencia un sistema ya parcialmente fluido desde temperaturas iniciales, en el que los efectos térmicos

se manifiestan como un aumento gradual del desorden sin indicios claros de un cambio cooperativo de fase.

En este caso vamos a analizar los parametros correspondientes a las cadenas Sn1 (ácido oleico) que contienen las insaturaciones para ambas membranas de POPC y POPC oxidado.

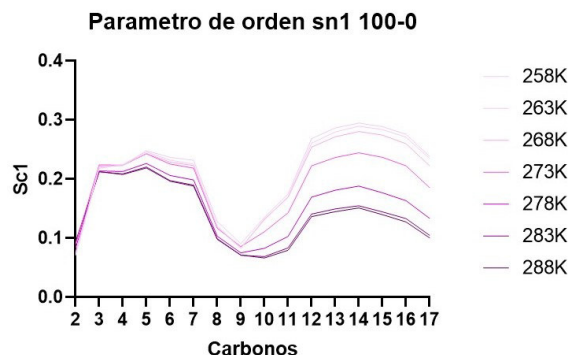


Figura 25: Variación de los parámetros de orden  $S_{CD}$ , cadena correspondiente al ácido oleico, que contiene la insaturación en el carbono 9 y 10. Para el POPC puro 100-0 a diferentes temperaturas (258K hasta 288K).

Este gráfico correspondiente a la figura 25, representa la variación del parámetro de orden SCD a lo largo de la cadena sn-1 del POPC puro, correspondiente al ácido oleico, el cual presenta una insaturación en los carbonos 9 y 10. Se observa un patrón característico de descenso en los valores de orden conforme se incrementa la temperatura, lo que refleja una mayor libertad conformacional y aumento del desorden estructural en las cadenas acilo, en concordancia con lo esperado para un sistema que atraviesa una transición de fase de gel a fluido. La disminución progresiva de la pendiente y los valores absolutos del parámetro de orden a lo largo de la cadena con el aumento térmico es particularmente notoria. Se destacan tres puntos de inflexión térmica importantes: a 258K el sistema muestra los valores más altos de orden, indicando una fase gel bien organizada; a 273K se observa una caída marcada del orden, señalando el inicio de la transición; y a 283K las curvas comienzan a solaparse, lo que sugiere que la transición ha finalizado y el sistema se encuentra predominantemente en fase fluida. Un aspecto destacado es la región de la insaturación (carbonos 9 y 10), donde se produce una depresión pronunciada en los valores de SCD, alcanzando mínimos por debajo de 0.1. Esta curvatura central es consecuencia directa del doble enlace cis en la cadena, que introduce un codo en la conformación de la cola lipídica, impidiendo un empaquetamiento eficiente. Esta perturbación no sólo afecta localmente la región insaturada, sino que también puede propagarse a la

organización global de la bicapa, impactando incluso la orientación y orden de la cadena sn-2. Sin embargo, si se analizan en detalle las curvas correspondientes a 258K, 273K y 283K, se aprecia que el perfil en la región de la insaturación (C9-C10) se mantiene relativamente constante, lo que indica que esta distorsión estructural inducida por el doble enlace es estable térmicamente dentro del rango analizado. Es decir, aunque la insaturación contribuye significativamente al desorden global, su aporte específico no se modifica en gran medida con la temperatura, reforzando su papel como fuente estructural permanente de desorden en las membranas de tipo POPC. En conjunto, estos resultados apoyan firmemente la hipótesis de una transición de fase entre 273K y 283K en el sistema POPC puro, y resaltan el impacto local y global que la insaturación introduce en la dinámica y organización de las cadenas lipídicas.

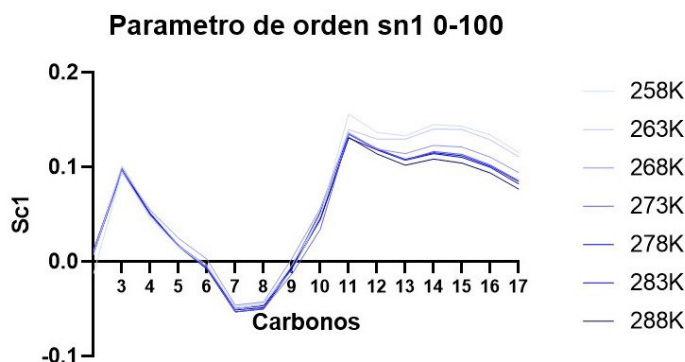


Figura 26: Variación de los parámetros de orden  $S_{n1}$ , cadena correspondiente al ácido oleico, que contiene la insaturación en el carbono 10 y 11. Para el POPC oxidado 100-0 a diferentes temperaturas (258K hasta 288K).

En este gráfico correspondiente a la figura 26, se observa el comportamiento del parámetro de orden SCD para la cadena sn-1 del POPC oxidado, correspondiente al ácido oleico con una insaturación en los carbonos 10 y 11, y una oxidación localizada en el carbono 9. Al igual que en el POPC puro, se mantiene el patrón general esperado: a mayor temperatura, menor orden en las cadenas, reflejando un aumento en la libertad conformacional. Sin embargo, en este caso, las curvas correspondientes a distintas temperaturas se encuentran mucho más solapadas, y las diferencias entre ellas son sutiles. Esto sugiere que el sistema ya se encuentra en un estado de mayor desorden estructural incluso a bajas temperaturas, lo cual coincide con lo observado anteriormente para el sistema oxidado (0-100) y refuerza la idea de que no se produce una transición de fase evidente en este caso. Una diferencia estructural notable respecto al POPC puro es la localización del mayor desorden en la cadena sn-1. Mientras que en el POPC no oxidado la mayor perturbación se concentraba en la región de la insaturación (C9-C10), en el POPC oxidado se observa una caída progresiva del parámetro

de orden desde el carbono 3 hasta el 8, con valores mínimos cercanos a cero o incluso negativos. El carbono 9, sitio de oxidación, también presenta un valor muy bajo, lo que sugiere una influencia directa del grupo oxidado sobre la estabilidad conformacional de los carbonos adyacentes. Esta propagación del desorden desde el sitio oxidado hacia los carbonos vecinos es coherente con lo que se espera para una distorsión localizada que altera el empaquetamiento lipídico de forma significativa. En contraste, la región de la insaturación (C10–C11) no presenta una caída tan abrupta como en el POPC puro, lo que implica que la perturbación generada por el doble enlace está parcialmente enmascarada o compensada por el efecto estructural más dominante del grupo oxidado.

Otro punto relevante es la aparición de un “salto” en el orden a 268K, particularmente a partir del carbono 11 en adelante. Esta discontinuidad ya fue observada en otros parámetros (como el área por lípido o el parámetro de orden en sn-2), lo que sugiere una reorganización estructural moderada del sistema en ese rango térmico. No obstante, tal cambio no es lo suficientemente marcado como para implicar una transición de fase, sino que probablemente refleja una reorganización local o un ajuste estructural en una bicapa ya desordenada. Finalmente, una observación interesante surge al correlacionar este comportamiento con la cadena sn-2. Al examinar el carbono 6 de la cadena palmitoil (sn-2), se identifica el comienzo de una caída significativa en el orden. Dado que este carbono se encuentra espacialmente próximo al carbono 9 de la cadena sn-1 vecina (el sitio oxidado), es plausible suponer que el grupo oxidado no solo desordena su propia cadena, sino que también induce perturbaciones estructurales intercadena. Este posible acoplamiento estructural entre cadenas vecinas refuerza la hipótesis de que la oxidación lipídica tiene un efecto desestabilizador profundo y extendido en la bicapa. En resumen, el análisis del parámetro de orden para la cadena sn-1 oxidada confirma que el grupo funcional introducido en C9 no solo genera desorden local, sino que tiene un impacto dominante sobre la estructura lipídica global, superando incluso al efecto térmico en el rango analizado. Esto explicaría la ausencia de una transición de fase clara y el aumento sustancial del área por lípido sin un cambio de fase definido.

## 6. Discusión y conclusiones

A lo largo de este estudio se analizaron distintos parámetros estructurales con el fin de evaluar si la oxidación lipídica y la temperatura afectan la organización y la estabilidad térmica de las bicapas. Para ello, se emplearon simulaciones de dinámica molecular como herramienta central, lo que permitió explorar con gran detalle el comportamiento de sistemas modelo simplificados. Estos resultados refuerzan la utilidad de la dinámica molecular en estudios biofísicos sobre membranas.

Los resultados mostraron que las bicapas de POPC puro presentan una organización y por lo tanto un mayor orden a bajas temperaturas. Si bien los valores de área por lípido y espesor a 258K ya sugerían esta organización, fue mediante el análisis del parámetro de orden y las visualizaciones en VMD que se confirmó un patrón estructural característico de una fase ordenada. En particular, las cadenas acílicas mostraron una inclinación definida, la cual comenzó a perderse gradualmente a partir de 273K, evidenciando una disminución del orden conforme aumenta la temperatura. Esta pérdida progresiva de organización, inducida por la agitación térmica, se vio acompañada de un cambio brusco en parámetros como el área y el espesor, indicativo de una transición de fase. Estos resultados coinciden con lo reportado por (Leekumjorn & Sum, 2007), quienes observaron una transición alrededor de 270K. En contraste, las bicapas compuestas por POPC oxidado mostraron desde el inicio un mayor desorden estructural, incluso a bajas temperaturas. En concordancia con lo reportado por (Tsubone, Junqueira, Baptista & Itri, 2019) los cuales observaron que el POPC-oxidado ocupa un área molecular significativamente mayor que el lípido POPC puro, aunque ambos tienen una forma cilíndrica, POPC-oxidado presenta una notable diferencia en la longitud de sus cadenas acilo, ya que una de ellas es más corta que en POPC puro, causando un desajuste en el grosor de la bicapa. Tal como se esperaba, la introducción de grupos oxidados generó un aumento en el área por lípido, una disminución del espesor y una marcada reducción en el parámetro de orden, comparado con las bicapas no oxidadas. Si bien estos cambios eran previsibles, el hallazgo más relevante fue que la oxidación impide la aparición de una transición de fase cooperativa clara. Además, se observó que el desorden inducido por los grupos oxidados fue más significativo que el generado por el aumento de temperatura. Esto sugiere un posible efecto amortiguador de la oxidación frente a los cambios estructurales típicos inducidos térmicamente. Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados del proceso de annealing (enfriamiento y calentamiento), donde no se observaron signos de irreversibilidad estructural ni memoria térmica, lo que indica que el sistema oxidado responde de forma homogénea a las variaciones térmicas. Los análisis de área y espesor no mostraron cambios bruscos ni transiciones marcadas, y los valores tendieron a solaparse a lo largo del rango de temperatura. Asimismo, las visualizaciones en VMD evidenciaron un patrón de desorganización estable, con estructuras similares entre distintas temperaturas, lo que refuerza la idea de una pérdida del carácter cooperativo en el sistema oxidado.

## Referencias

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2023). *GROMACS User Manual version 2023* [<http://www.gromacs.org>]. GROMACS development team.
- Aceves-Luna, H., Glossman-Mitnik, D., & Flores-Holguín, N. (2020). Oxidation degree of a cell membrane model and its response to structural changes, a coarse-grained molecular dynamics approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(5), 1930–1941. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1833759>
- Alejandra, S. G. (2021). Lipid signaling events during oxidative injury in nervous system [Accedido: 2025-03-26].
- Bagatolli, L., & Mouritsen, O. (2014, diciembre). *Vida - ¿una cuestión de grasas? (spanish version)*.
- Bowers, K. J., Chow, E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., Klepeis, J. L., Kolossváry, I., Moraes, M. A., Sacerdoti, F. D., Salmon, J. K., Shan, Y., & Shaw, D. E. (2006). Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters, 84. <https://doi.org/10.1145/1188455.1188544>
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caffisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., . . . Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
- Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., & Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1668–1688. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
- Conde Torres, D. (2021). *Nanotubos peptídicos en membranas lipídicas: un estudio computacional a través de simulaciones de Dinámica molecular* [Accedido: 2021-03-26]. <http://hdl.handle.net/10347/27063>
- García Delgado, C. S. (2022). Estudio computacional de la interacción del péptido amiloide de los islotes pancreáticos (hiapp) con membranas hidroperoxidadas [Accedido: 2025-03-26].
- Guo, Y., Baulin, V. A., & Thalmann, F. (2016). Peroxidised phospholipid bilayers: insight from coarse-grained molecular dynamics simulations. *Soft Matter*, 12(1), 263–271. <https://doi.org/10.1039/c5sm01350j>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)

- Itri, R., Junqueira, H. C., Mertins, O., & Baptista, M. S. (2014). Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. *Biophysical Reviews*, *6*(1), 47-61. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0128-9>
- Janosi, L., & Gorfe, A. A. (2010). Simulating POPC and POPC/POPG Bilayers: Conserved Packing and Altered Surface Reactivity. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *6*(10), 3267-3273. <https://doi.org/10.1021/ct100381g>
- Klauda, J. B., Venable, R. M., Freites, J. A., O'Connor, J. W., Tobias, D. J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, A. D., & Pastor, R. W. (2010). Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *The Journal of Physical Chemistry B*, *114*(23), 7830-7843. <https://doi.org/10.1021/jp101759q>
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., Yeom, M. S., Eastman, P. K., Lemkul, J. A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J. C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V. S., Case, D. A., Brooks, C. L., MacKerell, A. D., Klauda, J. B., & Im, W. (2015). CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *12*(1), 405-413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- Leekumjorn, S., & Sum, A. K. (2007). Molecular Characterization of Gel and Liquid-Crystalline Structures of Fully Hydrated POPC and POPE Bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, *111*(21), 6026-6033. <https://doi.org/10.1021/jp0686339>
- Lozano-Aponte, J., & Scior, T. (2014). ¿Qué sabe Ud. Acerca de... Dinámica Molecular? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *45*, 86-88.
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*(5), 469-484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>
- Pabst, G., Hodzic, A., Štrancar, J., Danner, S., Rappolt, M., & Laggner, P. (2007). Rigidification of Neutral Lipid Bilayers in the Presence of Salts. *Biophysical Journal*, *93*(8), 2688-2696. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112615>
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, *26*(16), 1781-1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Plimpton, S. (1995). Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics. *Journal of Computational Physics*, *117*(1), 1-19. <https://doi.org/10.1006/jcph.1995.1039>
- Raghunathan, V. A., & Katsaras, J. (1996). Transition in phosphatidylcholine lipid bilayers: A disorder-order transition in two dimensions. *Physical Review E*, *54*(4), 4446-4449. <https://doi.org/10.1103/physreve.54.4446>
- Rappolt, M., Vidal, M., Kriechbaum, M., Steinhart, M., Amenitsch, H., Bernstorff, S., & Laggner, P. (2003). Structural, dynamic and mechanical properties of POPC at low cholesterol concentration studied in pres-

- sure/temperature space. *European Biophysics Journal*, 31(8), 575-585. <https://doi.org/10.1007/s00249-002-0253-z>
- Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058-1071. <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>
- Sosa, M. J. (2023). *Nuevos fotosensibilizadores lipofílicos: síntesis, caracterización y estudio de sus propiedades fotoquímicas y fotosensibilización de membranas lipídicas* [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/157213>
- Tsubone, T. M., Junqueira, H. C., Baptista, M. S., & Itri, R. (2019). Contrasting roles of oxidized lipids in modulating membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1861(3), 660-669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.12.017>
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112-124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Wanderlingh, U., Branca, C., Crupi, C., Conti Nibali, V., La Rosa, G., Rifichi, S., Ollivier, J., & D'Angelo, G. (2017). Molecular Dynamics of POPC Phospholipid Bilayers through the Gel to Fluid Phase Transition: An Incoherent Quasi-Elastic Neutron Scattering Study. *Journal of Chemistry*, 2017, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2017/3654237>
- Weber, G., Charitat, T., Baptista, M. S., Uchoa, A. F., Pavani, C., Junqueira, H. C., Guo, Y., Baulin, V. A., Itri, R., Marques, C. M., & Schroder, A. P. (2014). Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes. *Soft Matter*, 10(24), 4241. <https://doi.org/10.1039/c3sm52740a>
- Wong-ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Peter Tieleman, D., & Monticelli, L. (2007). Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal*, 93(12), 4225-4236. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112565>
- Zhuang, X., Makover, J. R., Im, W., & Klauda, J. B. (2014). A systematic molecular dynamics simulation study of temperature dependent bilayer structural properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(10), 2520-2529. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.06.010>

