

INTERACCIONES INTERMOLECULARES DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA Arf*GTP CON POTASIO Y GLICEROL, COMPONENTES MAYORITARIOS DE LA VINAZA DE CAÑA DE AZÚCAR

Fernando Bonilla Millán

Jhon Alexander Rodríguez Estrada

Oscar Eduardo Rojas Álvarez

Abstract: The sugarcane vinasse, being a residue produced in high quantities derived from the industrial processes of Ethanol production, is a mix of compound that has a cyclical utility for soil matrices due to its natural and industrial composition that fall on the advantages and disadvantages of your applications. Potassium and glycerol, major compounds in their composition, are ligands that help the formation of protein complexes with vinasse to have alternatives in industrial uses as additives for animal feed and fertilizers in soil matrices, many of these, used in crops from the same industries. Computational chemistry studies allow us to know intermolecular properties between vinasse, glycerol and potassium by means of stable molecular interactions, making it a useful tool for evaluating said properties and determining new alternatives for industrial uses of this waste. In this research, the dynamics of the intermolecular interactions between the three-dimensional protein model extracted from the protein database (PDB) file of the model (2KSQ), consists of a membrane protein from the E. coli called

Arf * GTP, with two ligands as potassium and glycerol by molecular dynamics using a software called Scalable Molecular Dynamics by its acronym in English, NAMD¹. The intermolecular interactions were observed and evaluated by software called Molecular Dynamics Viewer (VMD) of the modeled molecule of the Arf * GTP membrane protein with major components, such as potassium and glycerol in an environment definite and implicit solvate of water box model (TIP3) in order to identify and characterize intermolecular forces, trajectory equilibrium, atomic fluctuations, affinities, rate constants and interactions Arf * GTP-Potassium, Arf * GTP-Glycerol and Arf * GTP-Potassium-Glycerol in the context of industrial uses of vinasse as animal feed and fertilizers. Finally, it was observed that the three Arf * GTP complexes are favored by positional affinities of the ligands as the amino acids GLN 155, for the case of potassium, and for the glycerols were GLY 27 and LYS 127, as well as shielding of some atoms of the amino acids with the ligands. With this research, we seek to have more information about the intermolecular interactions and constants of speed, balance of trajectories and chemical affinities of the Arf * GTP membrane protein with other organic or inorganic ligands that provide new industrial alternatives for the use of vinasse from sugar cane.

Keywords: Molecular dynamics; NAMD, VMD, BLAST, Computational Chemistry, CHARMM.

Resumen: La vinaza de caña de azúcar, al ser un residuo producido en altas cantidades derivado de los procesos industriales para la producción de Etanol, es una mezcla de compuestos que tiene una utilidad cíclica para matrices de suelos debido a su composición natural e industrial que recaen en las ventajas y desventajas de sus aplicaciones. El potasio y el glicerol, compuestos mayoritarios en su composición, son ligandos que ayudan a la conformación de complejos proteicos con la vinaza para tener alternativas en los usos industriales como aditivos para alimento animal y fertilizantes en matrices de suelos, muchos de estos, utilizados en cultivos de las mismas industrias. Estudios de química computacional permiten conocer propiedades intermoleculares entre la vinaza, el glicerol y el potasio mediante in-

teracciones moleculares estables convirtiéndola en una herramienta útil de evaluación de dichas propiedades y determinación de nuevas alternativas para usos industriales de este residuo. En esta investigación, se evaluó la dinámica de las interacciones intermoleculares entre el modelo proteínico tridimensional extraído del archivo de la base de datos de proteínas (PDB) por sus siglas en inglés, del modelo (2KSQ), el cual consiste en una proteína de membrana de la *E. coli* llamado Arf*GTP, con dos ligandos como potasio y glicerol mediante dinámica molecular utilizando un software llamado Dinámica Molecular Escalable por sus siglas en inglés, NAMD¹. Se observaron y evaluaron las interacciones intermoleculares por medio del software llamado Visor de Dinámica Molecular por sus siglas en inglés, VMD² de la molécula modelada de la proteína de membrana Arf*GTP con componentes mayoritarios, tales como, el potasio y el glicerol en un ambiente solvatado definido e implícito de modelo de caja de agua (TIP3) con el fin de identificar y caracterizar las fuerzas intermoleculares, equilibrio en trayectorias, fluctuaciones atómicas, afinidades, constantes de velocidad e interacciones Arf*GTP-Potasio, Arf*GTP-Glicerol y Arf*GTP-Potasio-Glicerol en el contexto de usos industriales de la vinaza como alimento animal y fertilizantes. Finalmente, se observó que los tres complejos Arf*GTP se ven favorecidos por afinidades posicionales de los ligandos como los aminoácidos GLN 155, para el caso del potasio, y para los gliceroles lo fueron GLY 27 y LYS 127, como también, apantallamientos de algunos átomos de los aminoácidos con los ligandos. Con esta investigación, se busca tener más información acerca de las interacciones intermoleculares y constantes de velocidad, equilibrio de trayectorias y afinidades químicas de la proteína de membrana Arf*GTP con otros ligandos orgánicos e inorgánicos que aporten nuevas alternativas industriales para el uso de la vinaza de caña de azúcar.

Palabras clave: Dinámica molecular; NAMD, VMD, BLAST, Química Computacional, CHARMM.

1. INTRODUCCIÓN

La vinaza es el residuo líquido que se produce después de la fermentación y destilación del mosto de la caña de azúcar. Es de color café oscuro, con un alto contenido de materia orgánica, de naturaleza ácida y de olor característico que se destacan por presentar ácidos orgánicos, levaduras, vitaminas y minerales [11], además, contiene poli y oligosacáridos resistentes que pueden provocar una respuesta positiva en los animales [6]. La súper producción de alcohol carburante en Colombia, ligada a la Ley 693 de 2001 [7] y la resolución 41072 del 30 de Septiembre de 2015 del Ministerio de Minas y Energía [8], actualmente permite verter al medio ambiente aproximadamente 13.365 millones de litros por día de vinaza de caña de azúcar como subproducto de la industria alcohólica y azucarera; gran parte de esta cifra está siendo usada controladamente en la producción de 800 Toneladas diarias de compost por la industria agrícola como agente fertilizante y remediador del pH en suelos de cultivo [9], generando una producción elevada de vinaza. Sin embargo, no existen muchas investigaciones recientes que ayuden a conocer nuevos usos industriales de la vinaza que permita darle utilidad a la gran cantidad producida por las grandes maquinarias alcohólicas de Colombia. El potasio y el glicerol son componentes, en mayor proporción en la composición natural de la vinaza, poseen propiedades químicas que permiten un buen acoplamiento con estructuras orgánicas generando reacciones estables efectuadas en procesos industriales e implementados en suelos, matrices poliméricas, estructuras biológicas y químicas.

Herramientas como VMD (Visual Molecular Dynamic) y NAMD (Scalable Molecular Dynamic) son útiles para conocer desde el punto de vista molecular las reacciones que puede tener la vinaza con otros compuestos evitando resultados no esperados, como subproductos o alteraciones de propiedades químicas, y así enfocar los esfuerzos en objetivos determinados para la creación de complejos útiles para su implementación en campos investigativos e industriales aliviando la acumulación de la vinaza producida y permitiendo tener nuevas alternativas para su disposición. Se han registrado estudios sobre el uso de la proteína de membrana como zona de trabajo para interacciones in-

termoleculares [21] y como complejo para modelamiento y dinámica molecular que han mostrado una buena estabilidad del complejo para la aplicación de dinámicas moleculares a condiciones determinadas, tales como temperatura, tiempo, medio de solvatación implícito, etc.

Este trabajo de investigación aporta resultados para identificar principalmente las características de las interacciones intermoleculares de una proteína de membrana, con potasio y glicerol, de esta manera obtener conocimientos en afinidad atómica, equilibrio de trayectorias, fuerzas de enlace presentes y constantes de velocidad a nivel molecular, que podrían aportar nuevas alternativas industriales para los componentes de la vinaza.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

VMD (Visual Molecular Dynamics) es una interfaz gráfica que en conjunto con una interfaz de cómputo puede realizar y mostrar simulaciones a nivel atómico. VMD está escrito en C++ con la librería gráfica de OpenGL. A pesar de que existe gran cantidad de software de visualización molecular, VMD tiene dos grandes ventajas: Permite el uso de ejecución archivos de comandos, lo cual economiza una cantidad importante de tiempo y su interfaz de selección (átomos, moléculas, aminoácidos) y representación (esferas, barras, superficie, volumen, carga, entre otras), características que la sitúan como una de las más completas y útiles.

El visor molecular funciona de forma armónica con el software de simulación NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics); este es el encargado de realizar los cálculos teóricos/experimentales en los cuales se basa el modelo de estudio de las dinámicas moleculares y la química computacional.

NAMD (Scalable Molecular Dynamics) fue desarrollado en la Universidad de Illinois por una colaboración de los grupos investigativos Theoretical and Computational Biophysics Group (TCB) y Parallel Programming Laboratory (PPL), escrito en Charmm++ (un lenguaje

de programación basado en C++ y que permite la ejecución de tareas o cálculos en paralelo).

$$m_{\alpha} \ddot{r}^{\alpha} = -\partial \partial r^{\alpha} U_{\text{total}}(r^{\alpha} 1, r^{\alpha} 2, \dots, r^{\alpha} N), \quad (1)$$

$$\alpha=1, 2 \dots N$$

Tenemos entonces en (1) un ejemplo de cómo se calcularía el movimiento de los átomos de un biopolímero de acuerdo a la ecuación newtoniana de movimiento, donde m_{α} es la masa del átomo α , r^{α} es su posición y U_{total} es la energía potencial total que depende de la posición de todos los átomos, la cual acopla entonces el movimiento de estos. Es entonces el cálculo de la energía potencial el punto crucial de esta ecuación puesto que debe reflejar fielmente la interacción entre átomos y ser calculada rápidamente.

Para mecánicas de sistemas que no están en equilibrio, en el cálculo de (1) deberá añadirse el cálculo de fuerzas de fricción y fluctuación dentro del cálculo del Force Field (campo de fuerza, es decir, energía).

2.1. Funciones de campos de fuerza.

Para una simulación de todos los átomos, se asume que cada átomo experimenta una fuerza especificada por un campo de fuerza modelo que toma las interacciones de ese átomo con el resto del sistema. Estos modelos presentan hoy en día una buena distribución entre precisión y eficiencia en cómputo. Una función de energía potencial común en NAMD es (2)

$$U_{\text{total}} = U_{\text{bond}} + U_{\text{angle}} + U_{\text{dihedral}} + U_{\text{vdW}} + U_{\text{Coulomb}}. \quad (2)$$

Donde los primeros tres términos representan estiramiento del enlace, “bending” o doblamiento e interacciones torsionales de enlace, siendo:

$$U_{\text{bond}} = \sum_{\text{bond } i} k_{\text{bond } i} (r_i - r_{0i})^2 \quad (3)$$

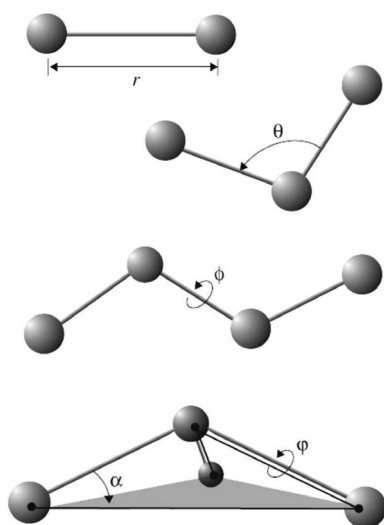
$$U_{\text{angle}} = \sum_{\text{angle } i} k_{\text{angle } i} (\theta_i - \theta_{0i})^2 \quad (4)$$

$$U_{\text{dihedral}} = \sum_{\text{dihedral } i} k_{\text{dihe } i} [1 + \cos(n_i \phi_i - \gamma_i)] \quad (5)$$

Donde *bonds* cuenta cada enlace covalente del sistema, *angles* son los ángulos entre cada par de enlace covalente que comparten un solo átomo en el vértice y *dihedral* describe pares de átomos separados por exactamente tres enlaces covalentes con el átomo central sujeto a la torsión de ángulo φ (figura 5)[13] [19].

Figura 5. Interacciones de enlace de campo de fuerza de arriba hacia abajo: estiramiento, ángulo (bending), φ ángulo diedro y ángulo diedro impropio.

Extraído de: Scarable Molecular Dynamics with NAMD; 2005.



Los últimos dos términos de (2) corresponden a las interacciones de pares de átomos no enlazados, Fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas:

$$U_{vdW} = \sum_i \sum_{j > i} 4\epsilon_{ij} [(\sigma_{ij}/r_{ij})^{12} - (\sigma_{ij}/r_{ij})^6] \quad (6)$$

$$U_{Coulomb} = \sum_i \sum_{j > i} q_i q_j / (4\pi \epsilon_0 r_{ij}) \quad (7)$$

Para cada partícula en un contexto de enlaces dado, los parámetros k_{bondi} , r_{0i} , etc, para las interacciones dadas en (3) – (5) están dados en un archivo de parámetros de campo de fuerza (disponible en la página de los desarrolladores de Charmm++ y VMD/NAMD). Estos parámetros son una tarea significativa y son desarrollados medi-

ante métodos teóricos (cálculos de mecánica cuántica y mediciones experimentales (cristalografías, espectros de resonancia, infrarrojo, entre otros). Estos parámetros son comparados con parámetros de moléculas sencillas que están muy bien definidos, luego evaluados a nivel termodinámico para verificar que cumplen con las propiedades teóricas y experimentales de la molécula.

Las dinámicas fueron ejecutadas mediante dos grandes herramientas matemáticas que facilitan su estudio matemático y reducen el tiempo de cómputo significativamente. Dado que se simularon las interacciones de una proteína contenida en la *saccharomyces cerevisiae* con una cantidad determinada de ligandos, para evitar que efectos de superficie ocurran en los límites de la caja de estudio se utilizan condiciones de barrera periódica (PBC). En las PBC, la caja de estudio es replicada infinitas veces por traslaciones periódicas, de modo tal que si una partícula se “sale” de la caja en un lado es reemplazada por una copia que entra a la caja del lado contrario; como cada partícula está sujeta al potencial de todas las demás partículas en el sistema (incluyendo imágenes en las cajas contiguas) se elimina el posible efecto de superficie. De acuerdo a lo anterior y dado que las fuerzas de Van der Waals y las interacciones electrostáticas ((6) y (7)) existen entre cada par de átomos no enlazados, calcular las interacciones de semejantes distancias con exactitud es improbable. Para realizar estos cálculos en NAMD y VMD se toma entonces dos variables importantes: la *distancia de cambio* (switchdist) y el *punto de corte* (cut-off); estas variables se encargan de permitir al usuario determinar hasta qué distancia va a considerar para evaluar estas interacciones.

Para una simulación con PBC, la periodicidad del sistema se utiliza para calcular las interacciones (sin cut-off ni switchdist) electrostáticas completas con un costo de cómputo muy bajo, utilizando el método de sumatoria de Mesh Ewald llamado Particle-mesh Ewald (PME) en química computacional [13] [19].

La sumatoria de Ewald es una descripción matemática de las interacciones electrostáticas de rango largo para un sistema de espacio limitado con PBC. La suma infinita de las interacciones carga-carga para un sistema carga-neutro es condicionalmente convergente

(es decir, el resultado de la sumatoria depende del orden en que se realice), donde se realiza el cálculo así: primero se suma cada caja, luego se suman esferas de cajas de radio creciente. La sumatoria de Ewald utiliza los siguientes términos:

$$E_{\text{Ewald}} = E_{\text{dir}} + E_{\text{rec}} + E_{\text{self}} + E_{\text{Surface}} \quad (8)$$

$$E_{\text{dir}} = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N q_i q_j \sum_{\vec{n}_r} \frac{\text{erfc}(\beta |\vec{r}_i - \vec{r}_j + \vec{n}_r|)}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j + \vec{n}_r|} - \sum_{i,j \in \text{Excluded}} \frac{q_i q_j}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j + \vec{v}_{ij}|} \quad (9)$$

$$E_{\text{rec}} = \frac{1}{2\pi V} \sum_{\vec{m} \neq 0} \frac{\exp\left(\pi^2 \frac{|\vec{m}|^2}{\beta^2}\right)}{|\vec{m}|^2} \left| \sum_{i=1}^N q_i \exp(2\pi i \vec{m} \cdot \vec{r}_i) \right| \quad (10)$$

$$E_{\text{self}} = -\frac{\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_{i=1}^N q_i^2 \quad (11)$$

$$E_{\text{surface}} = \frac{2\pi}{(2\epsilon_s + 1)V} \left| \sum_{i=1}^N q_i \vec{r}_i \right| \quad (12)$$

Aca, q_i y \vec{r}_i son la carga y posición del átomo i respectivamente, y \vec{n}_r es el vector de red. Para una caja arbitraria definida por tres vectores base independientes $\vec{\alpha}_1, \vec{\alpha}_2, \vec{\alpha}_3$, se define $\vec{n}_r = n_1 \vec{\alpha}_1 + n_2 \vec{\alpha}_2 + n_3 \vec{\alpha}_3$, donde n_1, n_2 and n_3 son integrales. Σ' denota una sumatoria sobre \vec{n}_r que excluye $\vec{n}_r = 0$ para $i = j$; "Excluded" denota el set de pares de átomos a los que las interacciones electrostáticas directas deberán ser excluidas. \vec{v}_{ij} es el vector de red para el par (i, j) que minimiza $|\vec{r}_i - \vec{r}_j + \vec{v}_{ij}|$. β es un parámetro que ajusta la distribución de carga de trabajo para sumas directas y recíprocas. ϵ_s es la constante dieléctrica del espacio alrededor de la caja, que generalmente es agua (para sistemas de biomoléculas). V es el volumen de la caja de simulación. \vec{m} es el vector recíproco definido como $\vec{m} = m_1 \vec{b}_1 + m_2 \vec{b}_2 + m_3 \vec{b}_3$, donde m_1, m_2, m_3 son integrales y los vectores base recíprocos $\vec{b}_1, \vec{b}_2, \vec{b}_3$ están definidos de modo que:

$$\vec{a} \cdot \vec{b}_\beta = \delta_{\alpha\beta}, \alpha, \beta = 1, 2, 3 \quad (13)$$

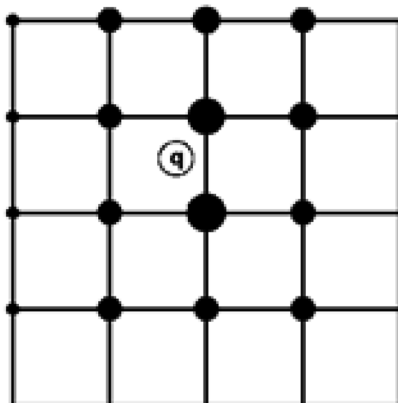
La función de error complementaria (erfc(x)) en (9) es

$$\text{erfc}(x) = 2\pi \int_0^\infty x e^{-t^2} dt. \quad (14)$$

La sumatoria de Ewald en (8) tiene cuatro términos: Sumatoria directa E_{sum} , sumatoria recíproca E_{rec} , energía propia E_{self} y energía superficial E_{surface} . El parámetro β cambia la carga computacional entre la sumatoria directa y la sumatoria recíproca [13] [19].

Para el análisis de la sumatoria de Ewald, el sistema realiza generalmente la sumatoria directa con menor carga operacional que la sumatoria recíproca, esta última es calculada mediante una transformada de Fourier hecha por el sistema luego de realizar una aproximación para delegar la computación a un modelo de malla. Esto se realiza mediante la distribución de las cargas ubicadas en cualquier punto del espacio a nodos en una malla tridimensional uniforme (ver figura 6).

Figura 6. Ejemplo 2D de la distribución de carga q (círculo blanco) entre los nodos uniformes de la malla generada. Extraído de: Scalable Molecular Dynamics with NAMD; 2005.



2.2. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

El Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) localiza regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara para este caso secuencias de proteínas a bases de datos de secuencia y evalúa la significación estadística comparativa. BLAST se puede utilizar para deducir las relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como ayudar a reconocer los miembros de las familias de genes.

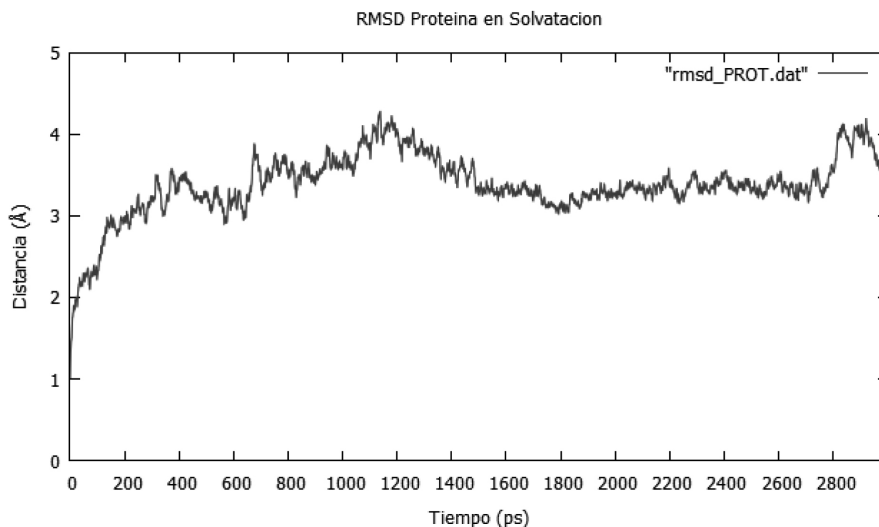
Específicamente, en la similitud de aminoácidos, el programa BLAST representa la similitud entre los aminoácidos como un \log^2 del radio de probabilidades, también conocida como “lod score”. Para derivar el lod score de un aminoácido, se debe tomar el \log^2 de la relación entre la frecuencia observada de una pareja, dividida por la frecuencia esperada al azar del emparejamiento. Si las frecuencias observadas y esperadas son iguales, la puntuación lod es cero. Una puntuación positiva indica que un par de letras es común, mientras que una puntuación negativa indica una pareja improbable.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó una validación estructural a partir de archivos estructurales de los ligandos (Glicerol y potasio) y proteína cristalizados y disponibles en la base de datos mundial RCSB Protein Data Bank 10.1038/nsmb.1853 [13]. Dado que la proteína poseía en su conformación ligandos orgánicos que no son de interés para esta investigación (puntualmente, residuos OXT: Oxígeno adicionado a un aminoácido, GTP: molécula energética que no permanecerá luego de la apoptosis y MTN: metanosulfonotioato, un marcador proteínico) se remodeló la proteína retirando los 3 ligandos orgánicos que poseía y asumiendo la posición donde se encontraban como sitios de interés para el análisis de las posibles interacciones. Para la generación de un ambiente cercano al *in vivo* se sometió la proteína junto con los ligandos a condiciones de solvente explícito (agua) en base a un modelo que evalúa las energías de distribución de cargas parciales y permanentes en los 3 átomos del agua, teniendo en cuenta factores como la polarización y efectos inductivos electrostáticos y repulsivos, siendo nombrado en la investigación como el complejo.

En el apartado correspondiente a la adecuación de parámetros y pretratamiento sistemático de las condiciones, se corrigió en base a la topología y los scripts [14] de uso libre provistos por los desarrolladores de las herramientas computacionales (VMD, NAMD) [1] [2]. Los parámetros usados de energías, movimientos permitidos de ángulos, torsiones, enlace, fuerzas, constantes para el estudio del comportamiento de enlaces (mediante mecánica clásica, se tratan como resortes) y campos de fuerza permitieron desarrollar una simulación que otorga un acercamiento particular al estudio de la naturaleza de las interacciones ligando-proteína, para el sistema se asumió una temperatura de 310 K (37°C), con el fin de evidenciar el posible efecto de la deformación de la proteína sobre las interacciones intermoleculares. La estabilidad inicial y final, al igual que a lo largo de toda la dinámica se mostró como la desviación estándar de la proteína modelada en solvatación (figura 7), así:

Figura 7. RMSD (Root Mean Squared Deviation, o Raíz de Desviación Estándar Cuadrada) de la proteína solvatada con respecto al tiempo. Siendo el eje Y la distancia en ångströms (Å) con respecto al tiempo en picosegundos en el eje X.

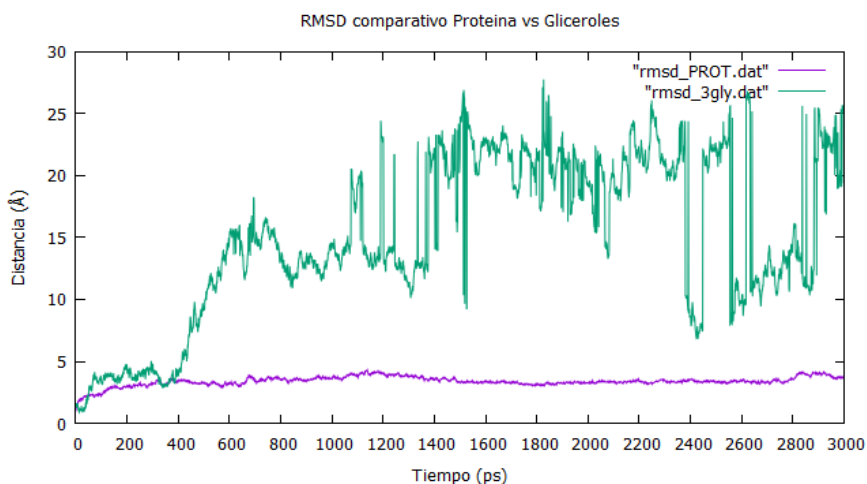


En la figura 7 se observó un claro desplazamiento desde la posición inicial proteínica de hasta 4 Å, aun así, el modelado es viable para la realización de las simulaciones puesto que la desviación particular de los

aminoácidos y átomos de la proteína (no su movimiento como macromolécula) presentan variaciones pequeñas (con respecto al promedio de la línea en la figura 7, se apreció una variación del orden de los $\pm 0,3$ Å), lo cual aseguró que el re modelamiento realizado fue correcto.

Se procedió entonces a evaluar el comportamiento de las desviaciones para los ligandos glicerol (Figura 8) y potasio (Figura 9). Debido a que las figuras 8 y 9 presentan las desviaciones tanto de la proteína como de los tres ligandos (3 gliceroles ubicados en los sitios de interés, luego, 3 potasios ubicados en los sitios de interés) durante la dinámica no se puede observar interacciones por atracción dado el movimiento que tiene el complejo en el medio de solvatación, la no interacción con los ligandos puede deberse a apantallamientos de átomos de los aminoácidos y propiamente el ligando correspondiente (potasio), o, impedimentos estéricos o de posición de átomos del ligando con respecto a los de sus aminoácidos más cercanos (para el caso del glicerol), por lo que es preciso observar en detalle las interacciones de la proteína con cada uno de los ligandos.

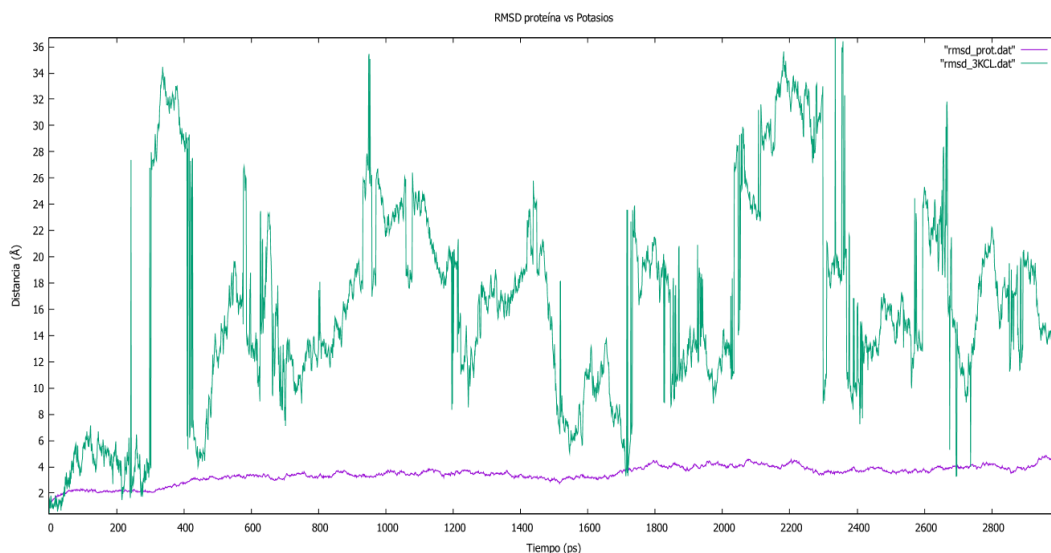
Figura 8. Comparativo: RMSD de Proteína (curva *rmsd_PROT.dat*) y RMSD de los 3 gliceroles (curva *rmsd_3gly.dat*) respecto al tiempo. En este gráfico, se tiene en el eje Y la distancia en ångströms (Å) con respecto al tiempo en picosegundos en el eje X. La curva superior corresponde al RMSD (Root Mean Squared Desviation) de los ligandos y la curva inferior al RMSD de la proteína.



Debido a que el gráfico presenta las desviaciones tanto de la proteína como de los tres ligandos durante la dinámica no se pudieron observar interacciones positivas por el movimiento que tiene el complejo en el medio de solvatación, quizás, la no interacciones con los ligandos pueden estar arraigadas con apantallamientos de aminoácidos y propiamente el ligando correspondiente, o, una eclipsación de la posición de átomos del ligando con respecto a los de sus aminoácidos más cercanos o en interacción que más adelante se evaluarán, por lo que es preciso, observar en detalle las interacciones de la proteína con cada uno de los ligandos.

Además, se observó las desviaciones de la proteína en interacción con sales de KCl con respecto a la proteína en el siguiente gráfico:

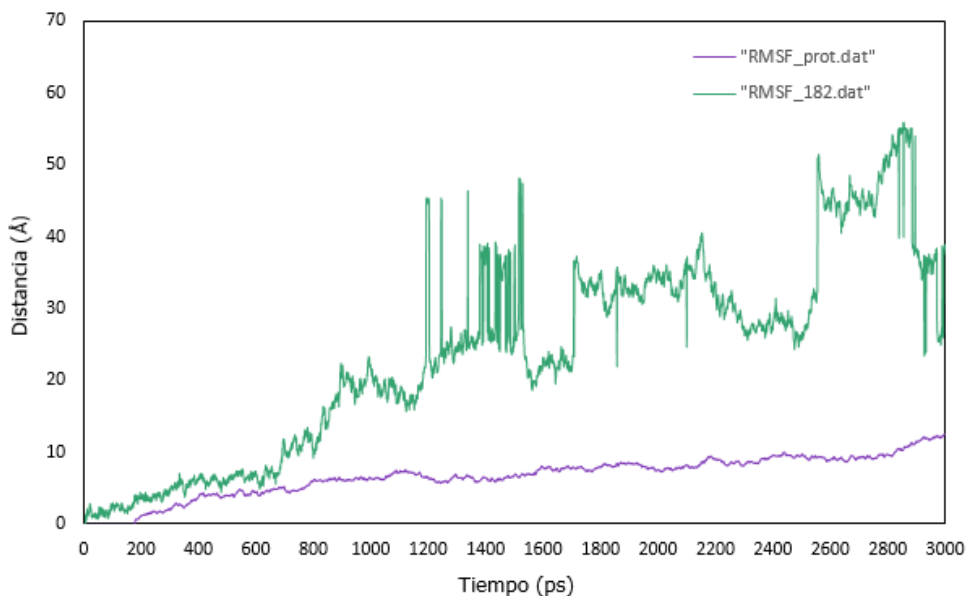
Figura 9. RMSD de la proteína (rmsd_prot.dat) vs RMSD de los ligandos potasio (rmsd_3KCL.dat) con respecto al tiempo. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps), donde la curva superior representa los ligandos y la curva inferior representa la proteína. La curva de RMSD de la proteína nos muestra su alta estabilidad ante las perturbaciones que podría provocar la aplicación de energía al sistema y la presencia de los potasios, mientras que la curva de los potasios demuestra una tendencia a NO estar dentro de la zona de interacción (atracción).



Para el estudio particular de los fenómenos de interacción se tomaron los nombres MGLY y POT para los ligandos glicerol y potasio respectivamente, seguido del número que lo identifica dentro del sistema (MGLY182, MGLY183 y MGLY184 y POT1, POT2 y POT3) A continuación se muestra la evaluación particular de los ligandos en interacción con la proteína solvatada partiendo de las fluctuaciones atómicas que se presentaron durante la dinámica con glicerol y potasio respectivamente. Se divide entonces el estudio de las interacciones en dos partes: inicialmente se evalúan las pertenecientes a los gliceroles y posteriormente las interacciones de potasio. Dado que el complejo (proteína y ligandos) empieza centrado en la caja de agua de estudio y a medida que avanza la dinámica éste complejo se desplaza dentro de la caja, los datos del análisis de la raíz del cuadrado de la desviación o RMSD por sus siglas en inglés (los cuales comparan la media de la desviación con respecto a la ubicación espacial) no son adecuados para realizar un estudio suficientemente preciso, por lo cual se usaron los datos del análisis de la raíz del cuadrado de las fluctuaciones o RMSF por sus siglas en inglés (Root Mean Square Fluctuations), donde se toma la media de la desviación con respecto a la posición promedio del sistema a lo largo del tiempo, para evaluar las interacciones. Se presentan entonces los gráficos del Root Mean Squared Fluctuations (RMSF) de los ligandos de glicerol con respecto a la proteína, partiendo, del ligando llamado MGLY 182 (figura 10), así:

Figura 10. RMSF comparativo del ligando MGLY 182 (curva RMSF_182.dat) con la proteína (curva RMSF_prot.dat) con respecto al tiempo. La curva superior corresponde al ligando MGLY 182 y la curva inferior a la proteína. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps).

RMSF comparativo Proteína vs Residuo MGLY 182

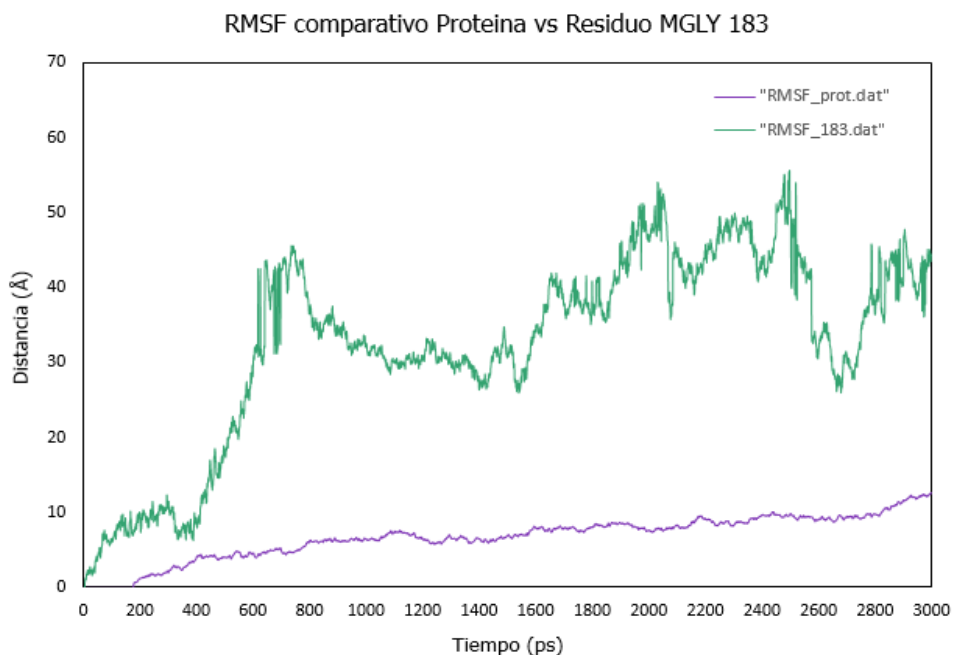


La figura 10 mostró una estabilidad de interacción dentro de los 700 ps entre el ligando y la proteína, posteriormente se notó una perturbación de la estabilidad en la interacción demarcada por algún impedimento estérico posible por las posiciones de los aminoácidos con respecto al movimiento del ligando, la cual, se presenta a lo largo de la dinámica, debido a, que las distancias de interacciones de interés (de efecto atrayente o repulsivo, como dipolo-dipolo, dipolo permanente, ion-dipolo, dipolo instantáneo-dipolo) se establecieron que fueran de 2 a 4 ångströms. Para los casos particulares del estudio (potasio y glicerol) se eligieron las interacciones mediante dipolo-dipolo (puentes de hidrógeno) para el glicerol y ion-dipolo para el potasio.

Considerando las fluctuaciones del primer residuo de glicerol, también, se realizó el gráfico del segundo ligando orientado con respec-

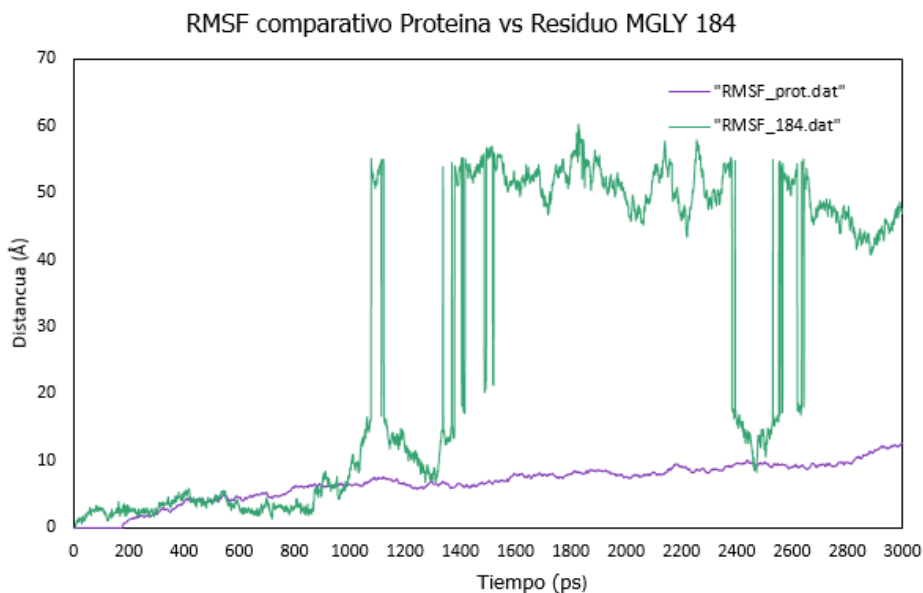
to a la proteína durante la dinámica correspondiente al MGLY 183 (figura 11), así:

Figura 11. RMSF comparativo del ligando MGLY 183 (curva RMSF_183.dat) con la proteína (curva RMSF_prot.dat) respecto al tiempo. La curva superior corresponde al ligando y la curva inferior a la proteína. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps).



Ahora bien la figura 11 mostró un comportamiento de interacción del ligando MGLY 183 con la proteína en 400 ps pero cambió su comportamiento de no interacción posiblemente por impedimentos estéricos determinados. Como se observa al comparar la figura 7.(a) con las figuras 4 y 5, en el momento en que se da la deformación se pierde la afinidad entre el ligando glicerol y la proteína. Finalmente, se realizó la evaluación de las fluctuaciones atómicas del tercer ligando de glicerol, MGLY 184, con respecto a la proteína durante la dinámica (figura 12), así:

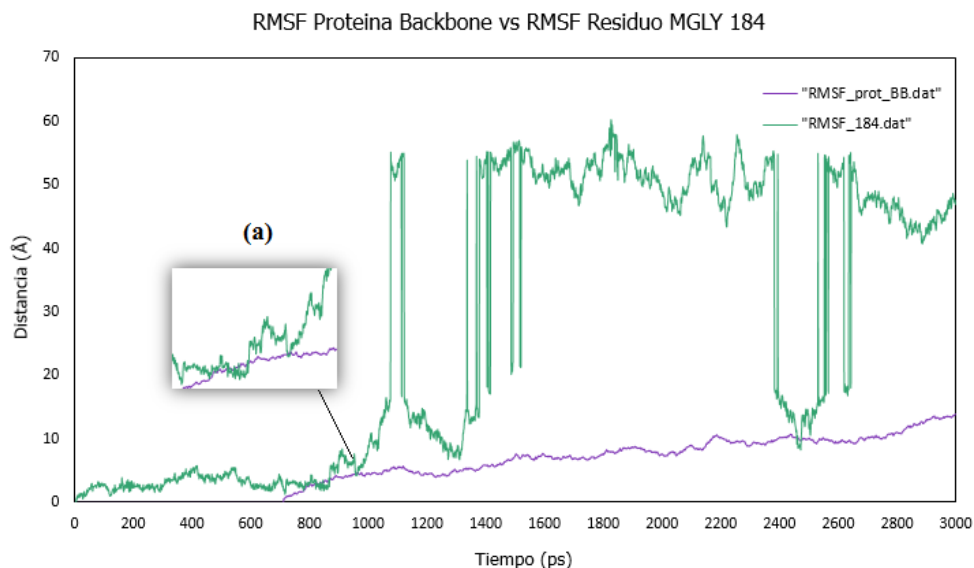
Figura 12. RMSF comparativo del ligando MGLY 184 (curva RMSF_184.dat) con la proteína (curva RMSF_prot.dat) respecto al tiempo. La curva superior corresponde al ligando y la curva inferior a la proteína. Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps).



Para la figura 12 se observó una mayor estabilidad de interacción entre el ligando y la proteína en varios puntos de interés presentes (principalmente hidrógenos y oxígenos cercanos en el punto de interés, con los cuales el glicerol formará seguramente puentes de hidrógeno a lo largo de la dinámica incidiendo en la posibilidad de ser el ligando que mayor interacción presenta y la posibilidad de estar relacionada con un aminoácido o varios aminoácidos afines con las fluctuaciones atómicas que presenta. El estudio del comportamiento de este ligando tiene entonces mayor importancia dentro de la investigación, debido a que existen aminoácidos de interés en la zona de posicionamiento dentro de la proteína que permitan ser un punto de partida para encontrar grupos que ayuden a la estabilidad molecular del complejo con los ligandos. Para confirmar que un efecto de impedimento espacial se estaba presentando se tomó la información

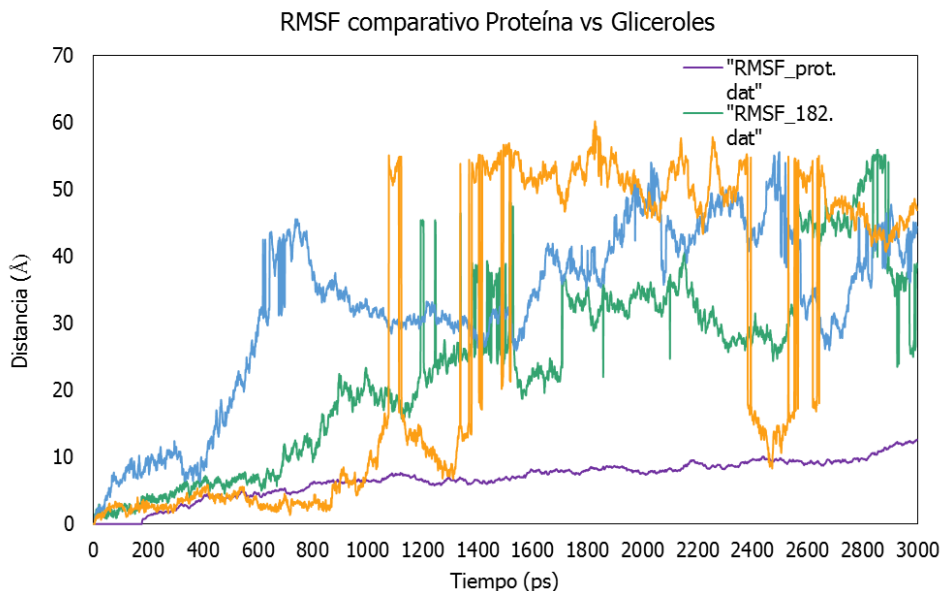
de los movimientos del esqueleto (Backbone) o estructura primaria de la proteína para evaluar sus fluctuaciones, además de la evidencia de deformación tridimensional vista en la figura 13. Al generarse la deformación de la proteína durante la dinámica se creó una baja disponibilidad de espacio para el ligando ocasionando que este último se alejara del punto de acción y de interacción reflejando los cambios repentinos de distancia en el gráfico 6, de igual manera, se mostró en la figura 21 (a) el deformamiento de la proteína y el momento preciso en donde se generó el impedimento estérico sobre el ligando.

Figura 13. Comparativo de la raíz de las fluctuaciones cuadradas promedio del ligando MGLY 184 (curva RMSF_184.dat) y de la estructura primaria de la proteína (RMSF_prot_BB.dat), Se muestra en el eje Y la distancia expresada en ångströms (Å) y en el eje X el tiempo expresado en picosegundos (ps). (a). Momento de deformación de la proteína y alejamiento de ligando por impedimento estérico formado.



Finalmente, se realizó un gráfico comparativo del RMSF de los tres ligandos de glicerol con la proteína respecto al tiempo mostrando las fluctuaciones atómicas y las estabildades de los ligandos en conjunto con la proteína dentro del complejo (figura 14).

Figura 14. RMSF comparativo de los tres ligandos de glicerol. La curva de menor fluctuación es la proteína representando las distancias en ångströms en el eje Y y el tiempo en picosegundos en el eje X. La tendencia particular de los ligandos siendo el ligando 184 el más estable en fluctuación con la proteína.



Como se observó en las interacciones de los tres ligandos con la proteína en función del tiempo de la dinámica, existen fluctuaciones marcadas que representan una alta afinidad de algunos de los ligando con respecto a la estabilidad de la proteína dentro de la dinámica. Sin embargo, se observó algunas perturbaciones por parte de los ligandos, como el MGLY 184 y 183, que mostraron que los aminoácidos presentes dentro del punto de acción y que interactuaron con estos residuos tenían un comportamiento repulsivo debido por al-

gún posicionamiento o rotación de los mismos creando un impedimento estérico que causó este fenómeno representado en el gráfico de fluctuaciones atómicas (RMSF) y en las desviaciones (RMSD). A continuación se evalúan los gráficos e interacciones de ligandos de potasio con respecto a la proteína.

Se le asignó entonces los nombres de POTASIO 1, POTASIO 2 y POTASIO 3 a los iones ubicados en las zonas de interés y se realizó el estudio de sus comportamientos particulares para entender correctamente la naturaleza de las interacciones y los aminoácidos responsables. A lo largo de los 3000 ps de simulación, solo en los primeros 200 ps y alrededor de los 1700 ps se ve que los ligandos tienden a acercarse en dirección de la cadena proteínica pero rápidamente vuelven a recuperar su comportamiento de repulsión. Como se puede apreciar en la figura 15, el comportamiento de la fluctuación del potasio 1 es altamente inestable y tiende a alejarse fuertemente de su posición inicial, es decir, tiende a ser empujado fuera de su punto de equilibrio. La proteína contiene en su superficie bastantes puntos de interés teórico para una especie electropositiva como el potasio, pero se evidenció que a pesar que la posición inicial del potasio 1 era menor a 3 Å con respecto a un oxígeno (alta electronegatividad y un radio de enlace significativo) y a otros átomos que deberían influir positivamente en fenómenos de atracción (como nitrógenos, que no interactúan directamente por hacer parte de la estructura principal de la proteína, pero su nube electrónica es considerable y puede generar momentos de atracción por efectos ion-dipolo o dipolo-dipolo, dipolo-dipolo instantáneo para el glicerol), el potasio fue fuertemente alejado del sitio de interés.

Figura 15. Comparativo del RMSF de la proteína y del Potasio 1. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína; Para el potasio 1 se pueden ver claramente 2 puntos de interés en la curva; inicialmente fluctúa hasta casi los 14 ångströms y alrededor de los 360 ps ocurre un desplazamiento significativo, Esta perturbación se ve fuertemente marcada durante casi la mitad de la dinámica (entre 400 y 1400 ps); otro punto de interés es entre los 1400 y casi 2300 ps, donde se ve una fluctuación no tan pronunciada como la anterior. El fenómeno de perturbación observado a partir de los 2400 ps no es de interés puesto que no depende de algún efecto directo ocasionado por la proteína o algún contraión.

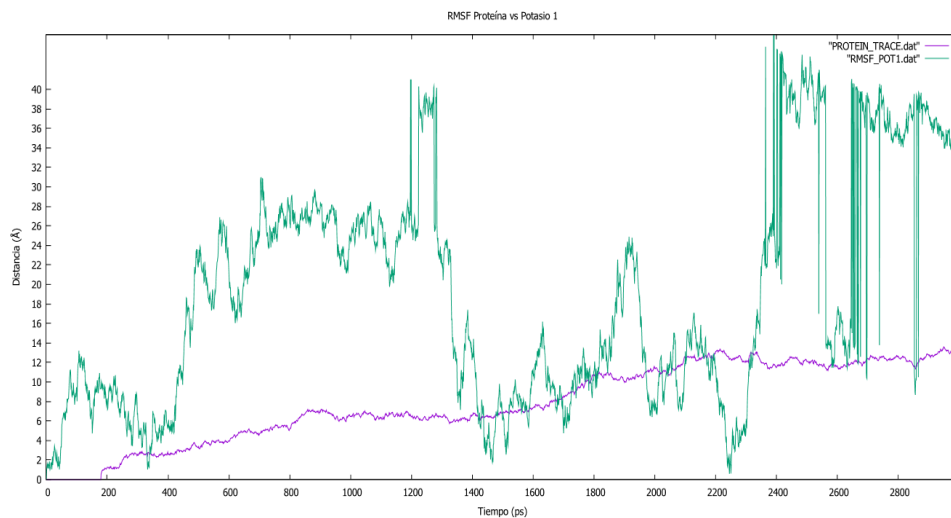


Figura 16. Comparativo del RMSF de la proteína y del Potasio 2. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína; Para el potasio 2 se pueden ver claramente 3 puntos de interés en la curva; inicialmente presenta fluctuaciones que lo alejan de la zona de interés (210ps a 230 ps), de ahí mantiene un comportamiento parecido al potasio 1 durante toda la dinámica; entre los 722 ps y 740 ps se ve una marcada reducción por poco tiempo de las fluctuaciones y el otro punto de interés es entre los 2360 ps y 2450 ps, donde se ve una reducción de las fluctuaciones.

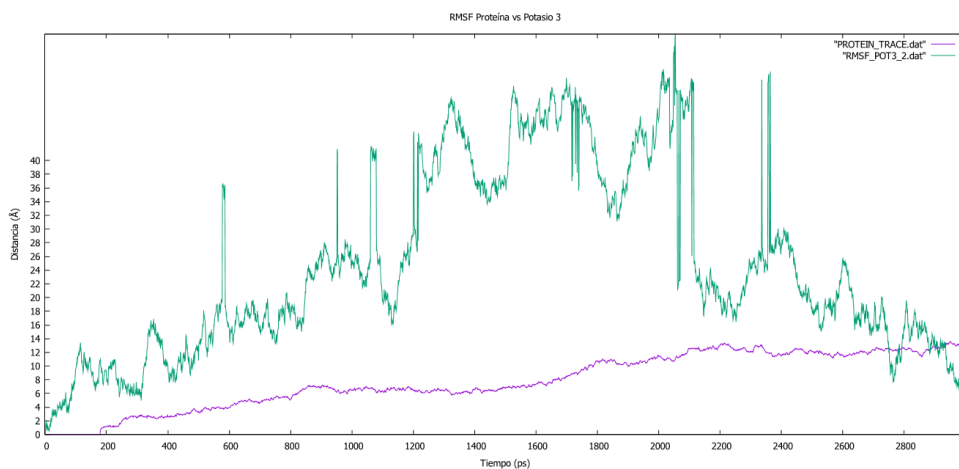


Figura 17. Comparativo del RMSF de la proteína con los potasio 1, 2 y 3. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína. Se evidencia la tendencia particular y con respecto a los otros potasio de alejarse de su posición inicial y vibrar libremente dentro de la caja de estudio.

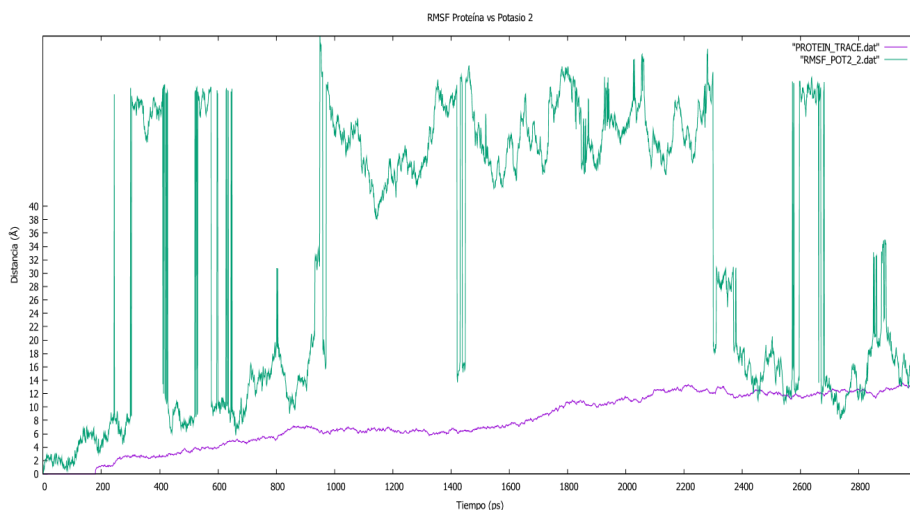
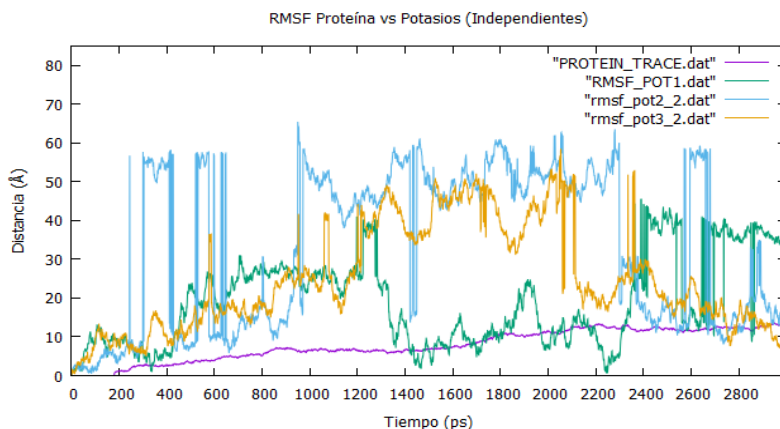
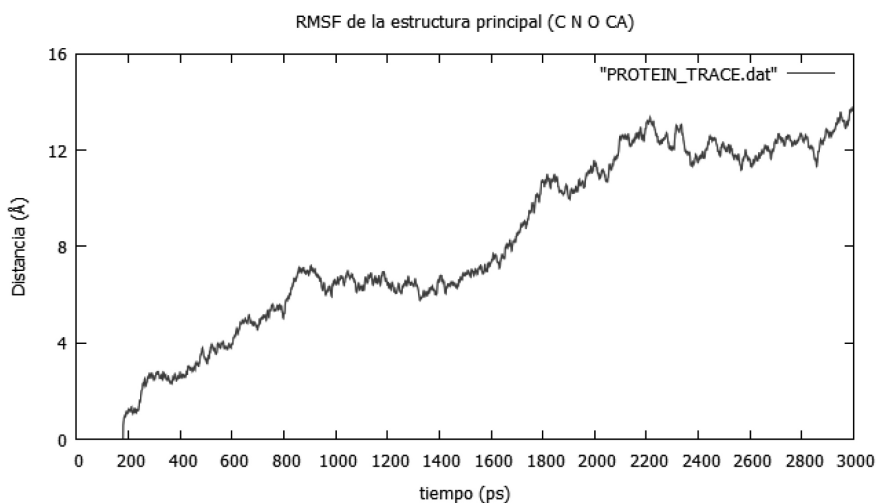


Figura 18. Comparativo del RMSF de la proteína y del Potasio 3. En el eje X se muestra el tiempo en picosegundos y en el eje Y la distancia en ångströms. La curva con menores fluctuaciones representa la proteína; Para el potasio 3 se puede ver claramente una total separación sin tendencia a acercarse a la proteína; se evaluaron entonces las condiciones iniciales (tiempo 0), identificando los posibles aminoácidos responsables de la repulsión y el tiempo alrededor de 2700 ps, donde las fluctuaciones decrecen de manera considerable.



En la figura 19, superponiendo los RMSF individuales de los tres potasio contra el RMSF de la proteína hay un comportamiento similar dentro de la primera parte de la dinámica, es decir, dado el reordenamiento de mínimo de energía, la temperatura suministrada y los efectos de las posibles especies cercanas, la estructura tridimensional de la proteína seguramente dificulta la presencia de interacciones atractivas entre las especies electronegativas (sean oxígenos terminales de ácidos, nitrógenos, efectos electrónicos atrayentes por anillos aromáticos, interacciones ion-dipolo y demás). Como se vio en la figura 13, la tendencia de la proteína a deformarse levemente es causante directo del efecto sobre las interacciones de moléculas o iones que sobre ella se pudiesen alojar, incluidas especies con alta capacidad de formar puentes como el glicerol, los cuales, a pesar de realizar interacciones atractivas mediante puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, dipolo – dipolo instantáneo, entre otras, por la misma deformación de la proteína (la cual confiere un impedimento estérico para orientarse de manera efectiva para realizar interacciones más estables) termina eventualmente alejándose de los sitios de interés.

Figura 19. RMSF del esqueleto proteínico respecto al tiempo. Se muestra en el eje Y la distancia en ångströms; en el eje X el tiempo en picosegundos. Considerando solamente el movimiento de los átomos Carbono, Oxígeno y Nitrógeno de la estructura principal de la proteína, se ve cómo tendió a modificar su estructura tridimensional debido al efecto de la energía aplicada en forma de calor.

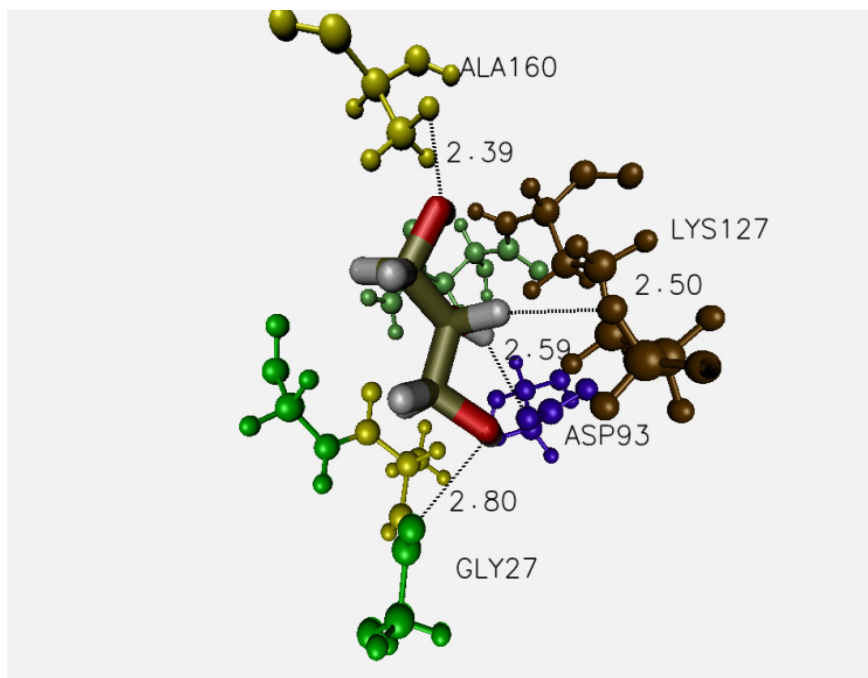


Con base en la información que se obtuvo de los gráficos para los ligandos de las fluctuaciones uno con respecto a la proteína se encontró que el ligando MGLY 184 tuvo mucha mayor interacción en cuanto a estabilidad molecular en varios momentos de la dinámica (ver figura 12), se evidenció de igual manera que a pesar de que los potasio están a una distancia significativa de átomos y puntos superficiales con cargas parciales atractivas (electronegativos) el ion tiende a alejarse de la proteína. Durante la dinámica se encontraron varios puntos de interés junto con las condiciones iniciales, los cuales se representaron con las figuras que ilustran los tiempos de interacción por parte del ligando con la proteína, las distancias en ångströms entre los aminoácidos más cercanos en el punto de acción y al aminoácido de mayor afinidad con el ligando dentro del punto de acción de la proteína para el potasio y el glicerol por igual.

3.1. Caracterización de las interacciones del glicerol con la proteína.

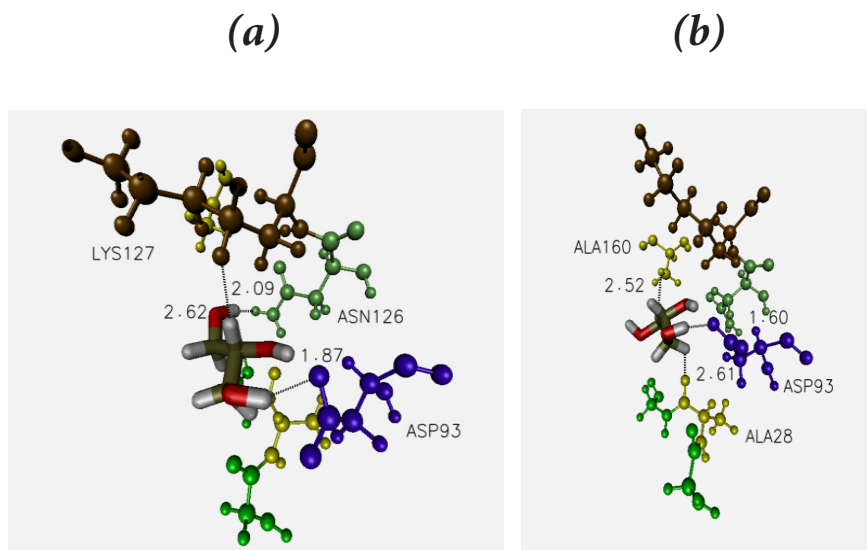
Después de analizar en detalle las fluctuaciones atómicas de los ligandos de glicerol y potasio con respecto a la proteína, se realizaron en primer lugar las caracterizaciones de las interacciones de los aminoácidos presentes en la proteína en el punto de acción dentro de la proteína con el ligando que tuvo mayor estabilidad observada en su RMSE, por lo que, se tomaron puntos de referencia en la dinámica que mostraron interacción del ligando y la proteína de acuerdo a lo reflejado en la figura 12, ya que, al ser las fluctuaciones atómicas son una medida más precisa de lo que sucedió durante la dinámica y del comportamiento de los átomos de ambas moléculas en tiempos determinados. Los 4 puntos específicos de análisis, de acuerdo a, la condición inicial, un momento anterior a la interacción y otro posterior a la misma con respecto al tiempo durante la dinámica, así:

Figura 20. Condición inicial del ligando MGLY 184 interacción a tiempo 0. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



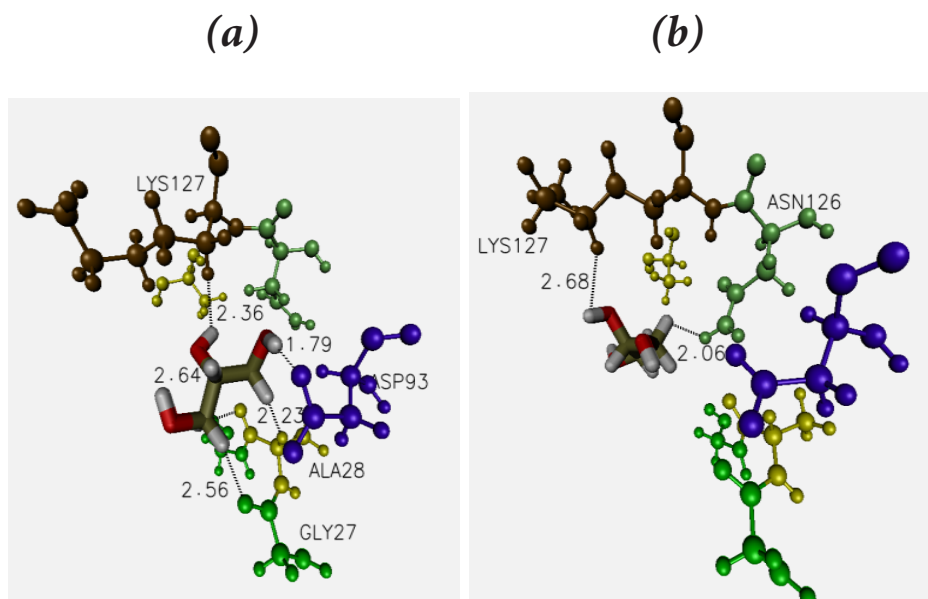
La posición inicial del ligando MGLY 184 a distancias determinadas con respecto a los aminoácidos presentes en los puntos de acción de la proteína es la primera pauta para observar una estabilidad apropiada durante la dinámica. Las distancias que se determinaron para la interacción fueron entre 2 a 4 ångströms asegurando el radio mínimo de enlace de las fuerzas de Van Der Waals y el radio atómico de los oxígenos e hidrógenos que interactúan con el ligando por las fuerzas de puentes de hidrógeno o enlaces O-H [20].

Figura 21. (a). Interacción a 400 ps y (b). A 600 ps teniendo 3 aminoácidos cercanos en distancias apropiadas. En el centro se encuentra el ligando (MGLY 184) en interacción y distancias apropiadas con respecto a sus aminoácidos. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



Durante la dinámica, específicamente a los 400 ps, se observó una estabilidad continua entre los ligandos y aminoácidos generando una interacción apropiada en estos primeros momentos de la dinámica, siendo ASP más afín con el ligando con una distancia de 1.83 Å. De acuerdo a la figura 12, se observó una estabilidad frecuente durante los primeros pasos de la dinámica, de misma forma, en los 600 ps se observó la estabilidad del ligando con la proteína en interacción determinada por las distancias apropiadas con una continua afinidad del aminoácido ASP con distancia de 1.60 Å con la proteína. Es decir, se encontró que entre el aminoácido ASP y el ligando glicerol 184 hay alta afinidad (un hidrógeno más del glicerol se encuentran orientados hacia la posición del ASP, LYS y ASN). Se puede entonces concluir que la estabilidad observada en la figura 12 de la interacción entre el ligando y la proteína se debe en gran medida a la formación de enlaces de Hidrógenos (puentes de Hidrógeno) los cuales son de característica dipolo-dipolo que se pueden llegar a presentar durante la dinámica.

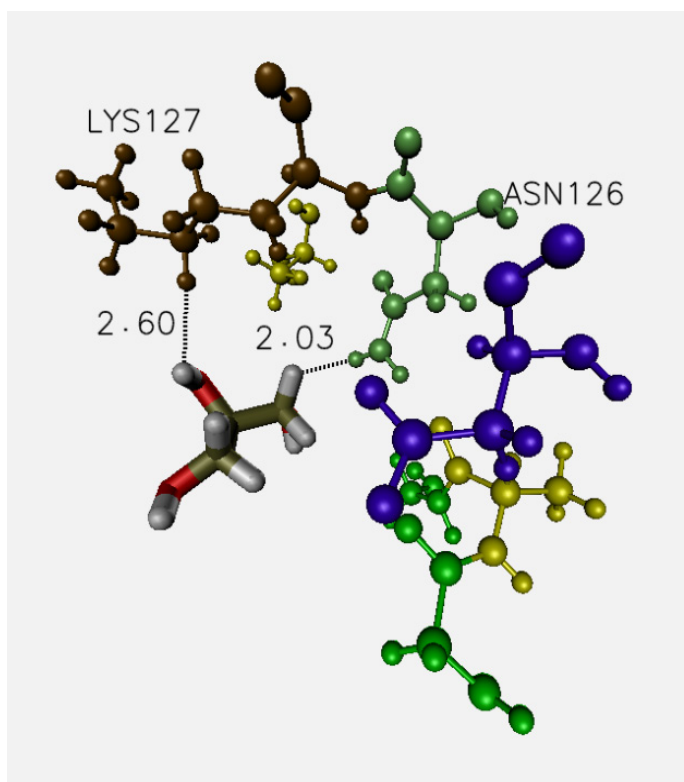
Figura 22. (a). interacción a 700 ps con una particular cercanía con el ASP y (b). Interacción a 866 ps con solo dos aminoácidos cercanos. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



Los acercamientos del ligando con sus aminoácidos cercanos en los 700 ps se observó una acercamiento acorde al radio atómico del oxígeno presente en el aminoácido ASP93 (ácido aspártico) que permite observar una afinidad mayor con dicho aminoácido y que se representó en el RMSF del gráfico 6, mientras que, a 866 ps se observó solamente dos interacciones con LYS127 (Lisina) y el ASN126 (Asparagina) dentro de las distancias determinadas, donde, pierde las demás interacciones con los otros aminoácidos ya que la proteína en su movimiento en la dinámica genera una deformación de su estructuras laterales que alejó el ligando por motivo del impedimento estérico que se formó. Sin embargo, a pesar de estas perturbaciones notorias en la dinámica del ligando MGLY 184 se pudo apreciar que hay un acercamiento a 1.79 ångströms (Å) de un hidrógeno del glicerol con el oxígeno del residuo ASP93, lo cual, entre el residuo ASP93 y el ligando glicerol 184 existe alta afinidad (un hidrógeno más del

glicerol se encuentran orientados hacia la posición del ASN126 y con los hidrógenos terminales del aminoácido LYS127). Se concluyó que la estabilidad observada en el gráfico 6 de la interacción entre el ligando y la proteína se debe en gran medida a la fuerte atracción dada por puentes de hidrógenos, algunos enlaces O-H y, además, de la fuerza y energía cinética por dichos enlaces que pueden llegar a presentar durante la dinámica.

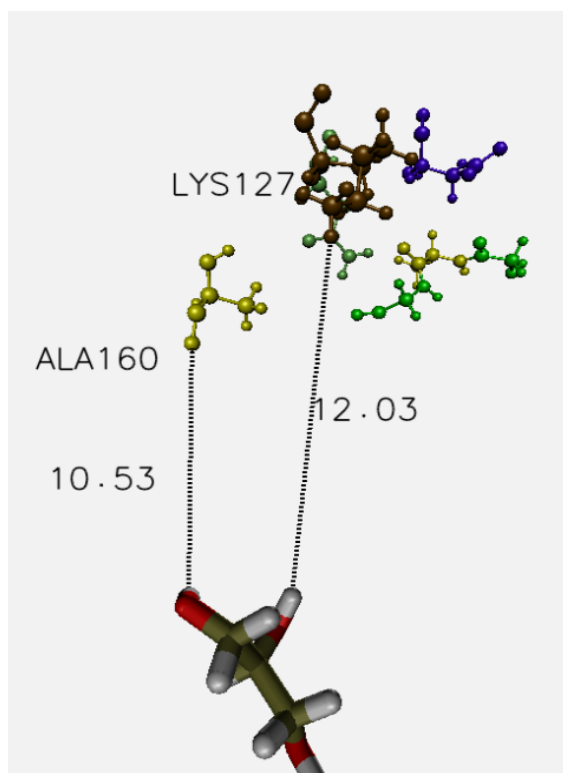
Figura 23. Última interacción a 955 ps con dos acercamientos previos a la deformación de la proteína. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



Las interacciones que se presentaron en los 955 ps mostraron el último acercamiento del ligando con sus aminoácidos más cercanos, siendo LYS127 y ASN126, los últimos con el cual tuvo interacción antes de ser sometido por el impedimento estérico que formó la proteína

alejando el ligando del punto de acción, quizás, por la rotación de algún aminoácido de la proteína produciendo un reordenamiento de los mismos y causando el alejamiento del ligando por dicho fenómeno anteriormente mencionado.

Figura 24. Pérdida total de interacción, en 2503 ps, del ligando MGLY 184 con sus aminoácidos más cercanos. Los aminoácidos de la proteína están representados en barras y esferas y el ligando en barras.



Ya en los 2503 ps, se observó que el ligando perdió toda interacción con sus aminoácidos más cercanos presentes en su punto de acción de la proteína. Es evidente que este alejamiento se debió a una rotación o un reordenamiento de alguno de los aminoácidos cercanos, o aquellos con los que interactuó durante la dinámica. El reordenamiento estructural en la proteína afecta entonces directamente la interacción de ligandos en su superficie. Este impedimento

como fenómeno de repulsión posicional del ligando con respecto a sus aminoácidos afines en la proteína es congruente con lo visto en la figura 12, ya que, durante la dinámica las fluctuaciones fueron marcando el movimiento del ligando con respecto a la proteína y se notaron varias perturbaciones posicionales, que además, se reflejaron en las caracterizaciones como se mostraron anteriormente.

3.2. Caracterización de las interacciones del potasio con la proteína.

Continuando con el comportamiento y las interacciones entre la proteína y el potasio, uno de los componentes mayoritarios y de mayor interés por sus distintas aplicaciones para la agricultura, de acuerdo a lo que se pudo observar en las simulaciones aquí descritas, se podría estimar la viabilidad de la separación selectiva del potasio en base a sus interacciones dentro de la vinaza.

Las interacciones intermoleculares del complejo proteínico con las sales de potasio arrojaron datos que permiten asumir que el carácter de las interacciones es repulsivo; se considera así por el efecto que tienen las distintas torsiones y movimientos naturales de la proteína en sus estructuras terciaria y cuaternaria, adicional a esto, la energía suministrada al sistema mediante temperatura hace que los átomos terminales de cadena o grupo funcional, sean oxígenos, hidrógenos u otro tipo de elemento, vibren. A continuación se presentan imágenes de desviaciones, fluctuaciones y representaciones gráficas del fenómeno observado de repulsión. Para mejor comprensión, se evaluará individualmente cada potasio para determinar los aminoácidos responsables de la interacción en cada punto de interés.

A partir de las condiciones descritas anteriormente y considerando lo ya expuesto en la figura 9 y 15, el átomo de potasio empezó a “moverse” libremente, la energía (en forma de temperatura) que se le añadió al sistema hizo que el potasio vibrara y se desplazara de acuerdo a los movimientos de las moléculas de agua de la caja, junto al posible efecto de la proteína sobre él. Es importante resaltar que durante todo este

tiempo no hubo un acercamiento directo del potasio hacia la proteína, pero considerando que inicialmente se encontraba a menos de 3 ångströms de distancia de una zona de alta influencia por contener numerosos posibles puntos de interacción y que lentamente fue saliéndose de ésta, podemos afirmar que el potasio preferirá encontrar una especie con la cual poder enlazarse (dada su característica iónica, tenderá a buscar interacciones de esa naturaleza) antes que ser atraída por fuerzas electrostáticas relativamente débiles. A partir de este punto, para el potasio 1, se puede asumir que no va a haber interacción. Considerando la figura 25 se evidenció que en el tiempo 0 ps el potasio 1 se encontraba ubicado a menos de 3 Å del GLN156 (Glutamina), a 3,77 Å del PHE154 (Fenilalanina) y a 4,12 Å de ILE155 (Isoleucina). El potasio está representado por su radio de Van der Waals y los aminoácidos representados en barras y esferas (figura 25 (a), izquierda). Como se observó en la figura 15, el comportamiento de la fluctuación estándar del potasio 1 fue altamente inestable y tendió a alejarse fuertemente de su posición inicial, es decir, tiende a ser empujado fuera de su punto de equilibrio. La proteína contiene en su superficie bastantes puntos de interés teórico para una especie electropositiva como el potasio, pero se evidenció que a pesar que la posición inicial del potasio 1 era menos a 3 Å con respecto a un oxígeno (alta electronegatividad y un radio de enlace significativo) y a otros átomos que deberían influir positivamente en fenómenos de atracción (como nitrógenos, que no interactúan directamente por hacer parte de la estructura principal de la proteína, pero su densidad electrónica es considerable y puede generar momentos de atracción por efectos dipolo), el potasio fue fuertemente alejado del sitio de interés (figura 25 (b), derecha). Se evidenció que debido a una torsión del GLN156 (figura 26), la organización espacial del GLN156, en específico, el hidrógeno y el nitrógeno, se orientaron en un plano frontal hacia el potasio y determinó el comienzo del proceso de repulsión.

La dinámica vista para el potasio 2 mostró también un comportamiento no atractivo sobre la proteína y sus puntos de alta electronegatividad como se ve en la figura 16 (y en la figura 27 izquierda); aun así, se evidenció un comportamiento atractivo de un oxígeno perteneciente al aminoácido GLU que alcanza a influenciar el potasio 2 hasta que quedó a una distancia de menos de 3 Å del oxígeno (figura 27 (b), derecha). Ya

a los 2360 ps y en adelante se evidenció la reducción en las fluctuaciones por la lejanía del potasio 2 del complejo proteínico. La ausencia de una marcada fluctuación afirma que las interacciones para el potasio 2 son nulas, y las vistas inicialmente son de carácter seguramente repulsivo, exceptuando puntos como el visto en la figura 27 (b) (derecha) en la que los oxígenos están lo suficientemente expuestos sin ningún átomo que pueda apantallar el efecto inductivo de ellos sobre el potasio 2 (permitiendo realizar interacciones ion-dipolo); aunque, por el carácter iónico del potasio, esta atracción leve no fue suficiente para mantener ese comportamiento por más de un poco de picosegundos.

De acuerdo a la figura 28 (b) y teniendo en cuenta la figura 17, el ambiente químico que rodeaba el potasio 3 contenía moléculas con oxígenos e hidrógenos. Comparando el sitio de interés del potasio 3 con el sitio de interés de los potasios 1 y 2 se ven 3 oxígenos cercanos (a menos de 3 Å de distancia), aun así se observa la tendencia a alejarse del sitio de interés desde el comienzo de la dinámica hasta que el potasio 3 se encontró a más de 16 Å (cerca a los 2700 ps) como se ve en la figura 29 (b) (derecha). Dada la ausencia de interacción con la proteína, se ve una marcada reducción de fluctuaciones (ya que se encuentra relativamente libre de influencias electrónicas).

De acuerdo a la figura 29, se puede ver como el esqueleto de la proteína (se evaluó el movimiento de los carbonos, nitrógenos y oxígenos que conforman la cadena principal proteínica) empieza a moverse, comparando el gráfico con la figura 29, se puede ver una clara deformación; en la parte superior derecha de la proteína, donde se encuentra una de las zonas de estudio para los ligandos se ve una clara deformación que efectivamente ejerce un efecto importante sobre las interacciones; para el caso de los gliceroles, genera un impedimento estérico que evita la correcta generación de puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas menores y para los potasios, evita su correcta orientación para interactuar mediante fuerzas ion-dipolo.

Figura 25. Capturas de las condiciones para el potasio 1 en los tiempos $t = 0$ ps (a) y $t = 55$ ps (b). El potasio representado mediante esfera y los aminoácidos de la proteína mostrados en barras y esferas. En $t = 0$ picosegundos: El potasio se encuentra a 3,26 Å de un hidrógeno de ILE155 (1), a 3,41 Å de

un hidrógeno de PHE154 (2), a 3,77 Å de un hidrógeno de GLN156 (3) y a 2,70 Å de un oxígeno de ILE155. Los aminoácidos involucrados son entonces Isoleucina (ILE), Glutamina (GLN) y Fenilalanina (PHE).

(a)

(b)

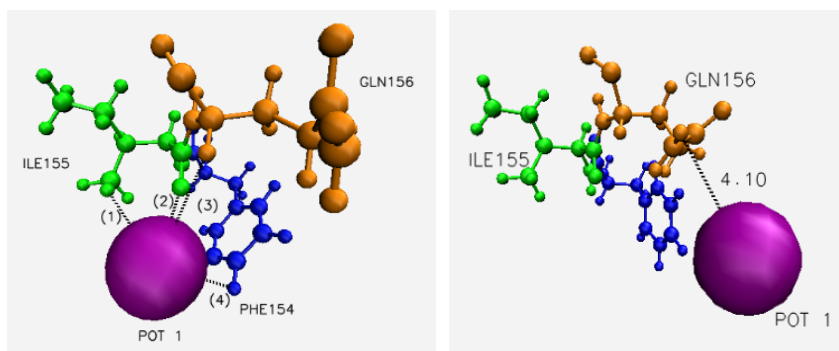


Figura 26. Capturas de las torsiones del GLN155, reordenamiento posiblemente responsable de la repulsión del potasio en los tiempos $t = 50$ ps hasta $t = 58$ ps. Nitrógeno en azul, hidrógeno en blanco, oxígeno en rojo y carbono en bronce. Se puede apreciar la torsión del nitrógeno hacia abajo con el paso del tiempo de dinámica.

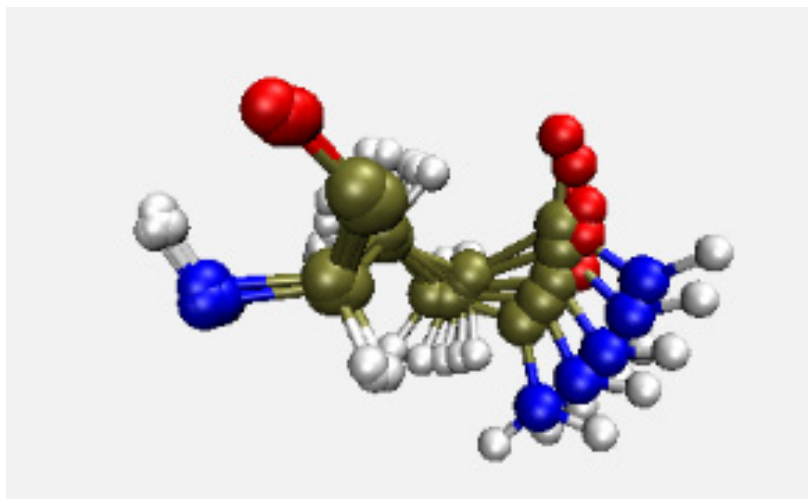


Figura 27. Capturas de pantalla para el potasio 2 en tiempos $t = 0$ ps (a) y $t = 731$ ps (b). Se puede apreciar que la zona de interés presenta suficientes puntos de posible interacción, estando a distancias entre 2,39 y 3,78 con respecto a átomos electronegativos (oxígeno de la leucina LEU130 y oxígeno del ácido aspártico ASP129) y un electropositivo (hidrógeno de la Treonina THR161). Pasados 731 ps se observó un breve acercamiento sin generar un cambio significativo a la tendencia del potasio de no realizar interacciones relevantes ion-dipolo. Potasio representado en esfera y aminoácidos representados en barras y esferas.

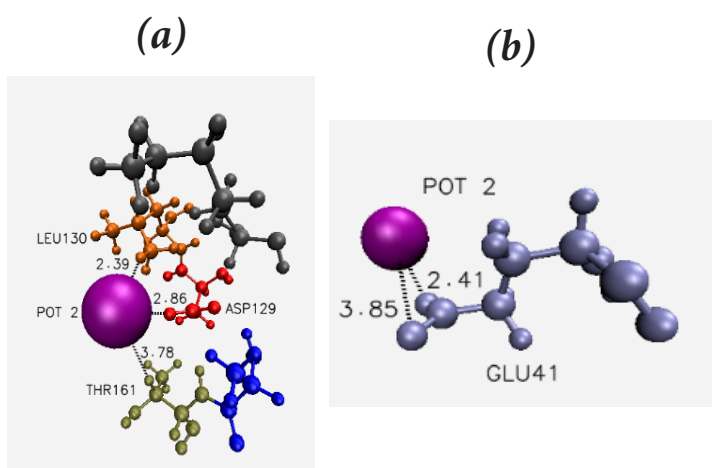


Figura 28. Capturas de pantalla para el potasio 3 en los tiempos $t = 0$ ps (a) y $t = 2690$ ps (b). Se evidencia que el potasio se sale de la zona de interés y empieza a moverse dentro de la caja de agua como ion libre, sin sentir ningún efecto electrostático después de ser empujado fuera del punto inicial.

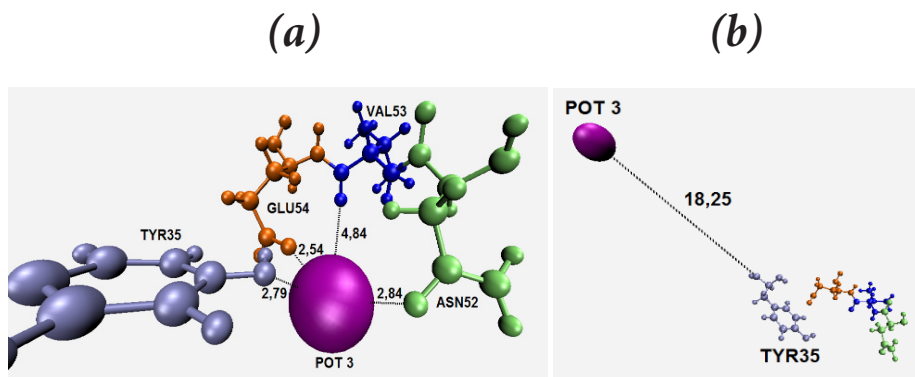


Figura 29. Potasios 1, 2 y 3 en tiempo $t=2279$ ps. Se muestra la estructura tridimensional de la proteína y los potasios representados mediante esferas; se ve claramente que no hay interacción de ningún tipo entre ion-proteína o ion-ion.

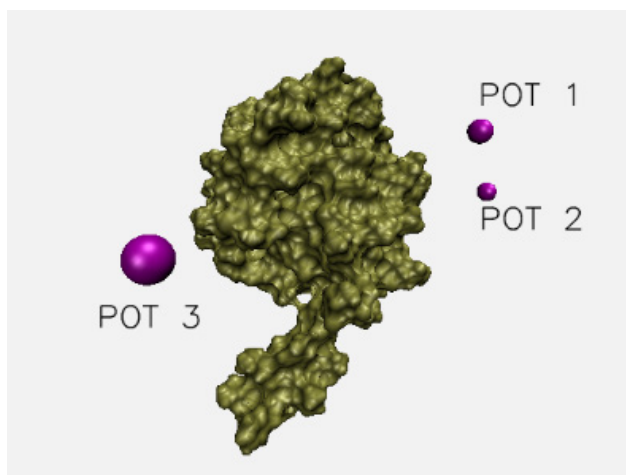
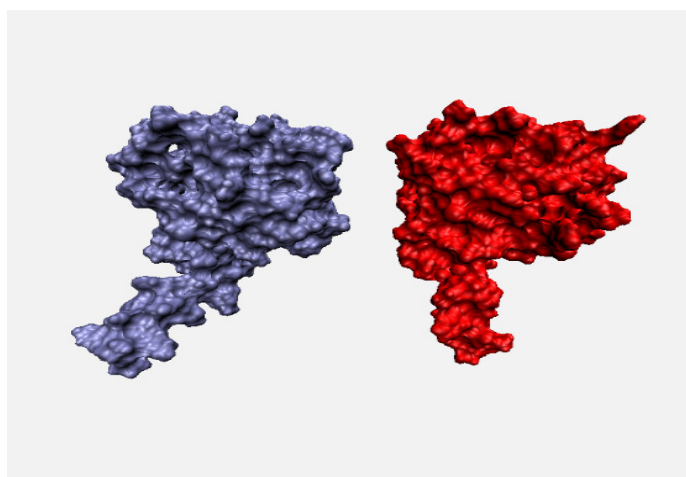


Figura 30. Comparativo de la estructura tridimensional de la proteína en los tiempos $t = 0$ ps (izquierda) y $t = 2700$ ps (derecha). Se pueden apreciar distintas características superficiales que evidentemente afectaron la capacidad de interacción de los ligandos.



4. CONCLUSIONES

Es evidente que gracias a fuerzas de interacción electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, puente de hidrógeno, ion-dipolo, dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido, las moléculas con átomos como oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógenos (en general, moléculas orgánicas como el glicerol) tienden a ser “atrapadas” por la proteína, sea superficialmente por puentes, efectos inductivos o apantallamientos atómicos; para el caso de átomos, puntualmente sales de potasio, no se determinó posible que la proteína tuviera algún efecto atrayente considerable sobre éste; caso contrario se puede evidenciar el efecto repulsivo de la proteína sobre los átomos libres de potasio, donde ellos preferirán encontrar su equilibrio cerca de otros ligandos (recordando que en la vinaza hay muchos compuestos además del glicerol y el potasio).

Los aminoácidos GLN, GLY y LYS son los mayormente responsables del efecto repulsivo de la proteína en los sitios activos. A pesar de tener posibles puntos con cargas parciales atractivas para el potasio, el mismo movimiento natural de sus átomos evitan que el ligando se ubique a una distancia y de una manera efectiva, siendo totalmente bloqueado o expulsado por el resto de la cadena (se pudo ver, por ejemplo, que los hidrógenos terminales del GLN (para el potasio 1) y GLY y LYS (para MGLY 184) influyen directamente en éste fenómeno.

Además de lo realizado en esta investigación, se recomienda una caracterización rigurosa de las proteínas contenidas en la vinaza y los constituyentes de mayor interés para la industria; la posibilidad de evaluar en su totalidad las interacciones de cada componente teniendo en cuenta todos los factores electro-atrayentes o electro-repulsivos que puede dar información de qué requiere cada ligando para su verdadero aprovechamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Phillips, James C.; Braun, Rosemary; Wang, Wei; Gumbart, James; Tajkhorshid, Emad; Villa, Elizabeth; Chipot, Christophe; Skeel, Robert D.; Kalé, Laxmikant; Schulten, Klaus; “Scarable Molecular Dynamics with NAMD”; 2005, *J. Comput. Chem.*, vol 26, pp. 1781-1802.
- [2] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. “Basic local alignment search tool.”, 1990, *J. Mol. Biol.*, vol. 215, pp. 403-410. More info at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [3] Gish, W. & States, D.J. “Identification of protein coding regions by database similarity search.”, 1993, *Nature Genet.*, vol 3, pp. 266-272. More info at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [4] Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., & Miller W., “A greedy algorithm for aligning DNA sequences”, 2000, *J Comput Biol* 2000; vol. 7(1-2), pp. 203-14. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [5] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., “VMD - Visual Molecular Dynamics”, *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38. More info at <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- [6] Hidalgo, K. Evaluación de la vinaza concentrada de destilería como aditivo en pollitas de reemplazo y gallinas ponedoras, 1920–1990. Retrieved from <http://www.e-libro.com/titulos>, 2012
- [7] Congreso De Colombia. . Ley 693 De Septiembre 19 De 2001, (44), 2–3. Retrieved from <http://www.minminas.gov.co/documents/10180//23517//21462-3660.pdf>, 2001
- [8] Minas y Energia, M. de. Resolución 41072 30 Oct 2015 - mezcla de alcohol carburante, Colombia. Retrieved from <https://www.minminas.gov.co/documents/10180//23517//36794-Resolución-41072-30Oct2015.pdf>, 2015.

- [9] Bermúdez, I. P., & Garrido, N. Aprovechamiento integral de vinazas de destilerías Una revisión actual. *Ingeniería Química*, 129–133. 2006
- [10] ANDI, & FENALCO. . Informe Del Sector Automotor. Retrieved from http://web.econometria.com.co/images/Vehiculos/Avance_Abr_2015.pdf, 2015.
- [11] Tecnicaña. Capacitación Técnica para la Agroindustria. *Revista Tecnicaña*, (28), 34., 2012
- [12] Irisarri, D. Usos Industriales y Agrícolas de la Vinaza de Caña de Azúcar, (*Las Vinazas*), 20–25, 1996.
- [13] MacKerell, A.D., Jr. Feig, M., Brooks, C.L., III, Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations, *Journal of Computational Chemistry*, 25: 1400-1415, 2004.
- [14] MacKerell, Jr., A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack Jr., R.L.; Evanseck, J.D.; Field, M.J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F.T.K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D.T.; Prodhom, B.; Reiher, III, W.E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics Studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 1998, 102, 3586-3616.
- [15] Guvench, O., Mallajosyula, S.S. Raman, E.P., Hatcher, E. Vannommeslaeghe, K., Foster, T.J., Jamison II, F.W., and MacKerell, A.D., Jr. “CHARMM additive all-atom force field for carbohydrate derivatives and their utility in polysaccharide and carbohydrate-protein modeling,” *Journal of Chemical Theory and Computing*, 7: 3162-3180, 2011, [DOI], PMC3224046
- [16] Mallajosyula, S.S., Guvench, O., Hatcher, E., MacKerell, A.D., Jr., “CHARMM Additive All-Atom Force Field for Phosphate and Sulfate Linked to Carbohydrates,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8: 759-776, 2012, [DOI], PMC3367516

- [17] Raman, P. Guvench, O. MacKerell, Jr. A.D. "CHARMM Additive All-Atom Force Field for Glycosidic Linkages in Carbohydrates Involving Furanoses," *Journal of Physical Chemistry B* 114: 12981-12994, 2010, [DOI], PMC2958709
- [18] Guvench, O. Hatcher, E.R. Venable, R.M. Pastor, R.W. and MacKerell Jr., A.D. "Additive Empirical CHARMM Force Field for glycosyl linked hexopyranoses," *Journal of Chemical Theory and Computation* 5: 2353-2370, 2009, [DOI], PMC2757763
- [19] Cross, S. Kuttel, M. Stone, J. Gain, J. Visualization of cyclic and multi-branched molecules with VMD, In *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, Volume 28, Issue 2, 2009, Pages 131-139, ISSN 1093-3263, <https://doi.org/10.1016/j.jmngm.2009.04.010>.
- [20] Bondi, A. (1964). "Van der Waals Volumes and Radii". *J. Phys. Chem.* 68 (3): 441-451. doi:10.1021/j100785a001
- [21] Yizhou, L., Kahn, Richard A., Prestegard, James H., "Dynamic Structure of membrane-anchored Arf*GTP", 2010, *Nat.Struct. Mol.Biol.*, vol 17. pp. 876-881. More info at DOI: 10.1038/nsmb.1853
- [22] Abdallah, M., Khelissa, O., Ibrahim, A., Benoliel, C., Heliot, L., Dhulster, P., & Chihib, N. (2015). International Journal of Food Microbiology Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bio films to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 38-47. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.02>
- [23] Alves, P. R. L., Natal-da-Luz, T., Sousa, J. P., & Cardoso, E. J. B. N. 2015. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. *Science of The Total Environment*, 526, 222-232. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.150>
- [24] Bandala, E. R., Gelover, S., Teresa, M., Arancibia-bulnes, C., Jimenez, A., & Estrada, C. A. 2002. Solar photocatalytic degradation of Aldrin, 76, 189-199.
- [25] Bock, L. J., Wand, M. E., & Sutton, J. M. 2016. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against *Klebsiella pneumo-*

- niae clinical isolates and adapted strains. *Journal of Hospital Infection*, 93(1), 42–48. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.12.019>
- [26] Campos, C. R., Mesquita, V. A., Silva, C. F., & Schwan, R. F. 2014. Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. *Waste Management*, 34(11), 2036–2046. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.006>
- [27] Chamakura, K., Perez-ballester, R., Luo, Z., Bashir, S., & Liu, J. 2011. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 88–96. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.020>
- [28] Chang, C. T., Colicino, E. G., Dipaola, E. J., Al-hasnawi, H. J., & Whipps, C. M. (2015). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Evaluating the effectiveness of common disinfectants at preventing the propagation of *Mycobacterium* spp. isolated from zebra fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 178, 45–50. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.09.008>
- [29] Chioma, A., Chaudhuri, M., Rahman, S., & Kutty, M. 2014. International Biodeterioration & Biodegradation UV Fenton and sequencing batch reactor treatment of chlorpyrifos, cypermethrin and chlorothalonil pesticide wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 195–201. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.002>
- [30] Christofolletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>
- [31] Gomez, J. M. (Universidad C. O. L. A. 2009. Efecto de la aplicación de vinaza en la producción y calidad de la caña de azúcar.
- [32] Gutiérrez-martín, C. B., Yubero, S., Martínez, S., Frandoloso, R., & Rodríguez-ferri, E. F. (2011). Research in Veterinary Science Evaluation of efficacy of several disinfectants against *Campylo-*

- bacter jejuni strains by a suspension test, 91, 44–47. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.020>
- [33] Ha, J., Choi, C., Lee, H., Ju, I., Lee, J., & Ha, S. 2016. Efficacy of chemical disinfectant compounds against human norovirus. *Food Control*, 59, 524–529. <http://doi.org/10.1016/j.food-cont.2015.04.040>
- [34] Hong, H., Forbes, D., Rn, M., Sandora, T. J., & Priebe, G. P. 2013. American Journal of Infection Control Disinfection of needleless connectors with chlorhexidine-alcohol provides long-lasting residual disinfectant activity. *American Journal of Infection Control*, 41(8), e77–e79. <http://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.10.018>
- [35] Korndörfer, G. H., Nolla, A., & Ailton, G. (n.d.). Manejo, aplicación y valor fertilizante de la vinaza para caña de azúcar y otros cultivos. *Control*, 23–28.
- [36] Kusvuran, E., & Erbatur, O. 2004. Degradation of aldrin in adsorbed system using advanced oxidation processes : comparison of the treatment methods, 115–125. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2003.10.004>
- [37] Kusvuran, E., Gulnaz, O., Irmak, S., Atanur, O. M., Yavuz, H. I., & Erbatur, O. (2004). Comparison of several advanced oxidation processes for the decolorization of Reactive Red 120 azo dye in aqueous solution, 109, 85–93. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.03.009>
- [38] Lazaro, Y. (UNAH), & Castro, I. (UNAH). 2014. Efecto de la aplicación de vinaza sobre algunos indicadores físicos de un suelo Pardo Sialítico carbonatado cultivado con tomate (*Solanum lycopersicum L*) cv . Amalia Effect of vinasse application on some soil physical indicators Pardo sialítico carbonat, 4(4), 24–29.
- [39] Liu, Y., Kahn, R. A., & Prestegard, J. H. 2010. Dynamic structure of membrane-anchored Arf•GTP. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(7), 876–881. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1853>

- [40] Moraes, B. S., Junqueira, T. L., Pavanello, L. G., Cavalett, O., Mantelatto, P. E., Bonomi, A., & Zaiat, M. (2014). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? *Applied Energy*, 113, 825–835. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.018>
- [41] Oosterik, L. H., Tuntufye, H. N., Butaye, P., & Goddeeris, B. M. 2014. Effect of serogroup, surface material and disinfectant on biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli*. *The Veterinary Journal*, 202(3), 561–565. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.001>
- [42] Perumal, P. K., Wand, M. E., Sutton, J. M., & Bock, L. J. 2014. Evaluation of the effectiveness of hydrogen-peroxide-based disinfectants on biofilms formed by Gram-negative pathogens. *Journal of Hospital Infection*, 87(4), 227–233. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.004>
- [43] Pesticide Research Institute. 2013. Vinasse Technical Evaluation Report.
- [44] Portuguez, R. A., & Chinchilla, R. O. 2007. Cambios Físico-Químicos provocados por la Vinaza en un Suelo Vertisol en Costa Rica Introducción Objetivos Materiales y Métodos.
- [45] Pozo, C., Gã, M. A., Calvo, C., & Gonzã, J. 2002. Studies on the effects of the insecticide aldrin on aquatic microbial populations, 50, 83–87.
- [46] Rajdev, S., Mulla, S., & Kumar, A. (n.d.). Development of an indigenous automated surveillance system in India : Its impact on device associated infections at a trauma center, 3, 50–51.
- [47] Santos, M., Diánez, F., de Cara, M., & Tello, J. C. 2008. Possibilities of the use of vinasses in the control of fungi phytopathogens. *Bioresource Technology*, 99(18), 9040–9043. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.032>
- [48] Santos, M., Carretero, F., & Cara, M. De. 2009. Efecto de la aplicación de vinaza de vino como biofertilizante y en el control de enfermedades en el cultivo de pepino, 58–66.

- [49] Scull, I., Savón, L., Gutiérrez, O., Valiño, E., Orta, I., Mora, P. O., ... Noda, A. 2012. Physic-chemical composition of concentrated vinasse for their assessment in animal diets, 46(4), 385–389.
- [50] Smilanick, J. L., Mansour, M., & Sorenson, D. 2014. Postharvest Biology and Technology Performance of fogged disinfectants to inactivate conidia of *Penicillium digitatum* within citrus de-greening rooms . *Postharvest Biology and Technology*, 91, 134–140. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.12.020>
- [51] Speight, S., Moy, A., Macken, S., Chitnis, R., Hoffman, P. N., Davies, A., ... Walker, J. T. 2011. Evaluation of the sporicidal activity of different chemical disinfectants used in hospitals against *Clostridium dif fi cile*. *Journal of Hospital Infection*, 79(1), 18–22. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.05.016>
- [52] Subirós, J. F., & Molina, E. 1992. Efecto de la aplicación de vinazas en la producción de caña de azúcar y en las características químicas de un inceptisol de Guanacaste, costa rica. *Agronomía Costarricense*, 16(1), 55–60.
- [53] Tezel, U., & Pavlostathis, S. G. 2015. ScienceDirect Quaternary ammonium disinfectants : microbial adaptation , degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology*, 33(Mic), 296–304. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.018>
- [54] Yamanaka, T., Bannai, H., Dvm, K. T., Dvm, M. N., Dvm, T. K., & Dvm, T. M. (2014). Journal of Equine Veterinary Science Comparison of the Virucidal Effects of Disinfectant Agents Against Equine In fluenza A Virus. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(5), 715–718. <http://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.12.010>
- [55] MacKerell AD Jr, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL Jr, Evanseck J, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FTK, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT,
- [56] MacKerell AD1, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph-McCarthy D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FT, Mattos C, Michnick S, Ngo T,

- Nguyen DT, Prodrom B, Reiher WE, Roux B, Schlenkrich M, Smith JC, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiórkiewicz-Kuczera J, Yin D, Karplus M, All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins, *J Phys Chem B*. 1998 Apr 30;102(18):3586-616. doi: 10.1021/jp973084f.
- [57] Weiner SP, Kollman PA, Case DA, Singh UC, Ghio C, Alagona G, Profeta J, Weiner P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J Am Chem Soc* 1984;106:765–784.
- [58] Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: A message passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun* 1995;91:43–56.
- [59] Lourencetti, C., de Marchi, M. R. R., & Ribeiro, M. L. 2008. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV. *Talanta*, 77(2), 701–709. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.013>.
- [60] Christofolletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761.
- [61] Alves, P. R. L., Natal-da-Luz, T., Sousa, J. P., & Cardoso, E. J. B. N. 2015. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. *Science of The Total Environment*, 526, 222–232. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.150>