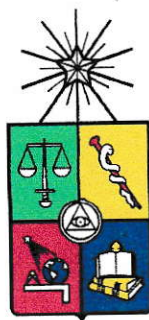


VCH-FC  
DOC-Q  
R 934  
C. 1



# **Cristales líquidos liótropos nemáticos con fosfolípidos naturales, como miméticos de membrana**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Química  
Facultad de Ciencias

por

**Álvaro Rodrigo Ruiz Fernández**

Octubre, 2016

Director de Tesis: **Dr. Boris Weiss López**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO

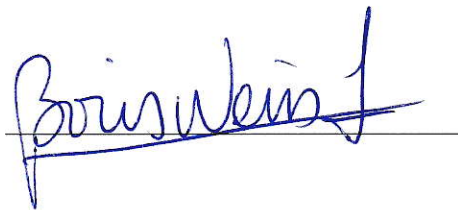
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**Álvaro Rodrigo Ruiz Fernández**

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Octubre de 2016.

Director de Tesis

Dr. Boris Weiss



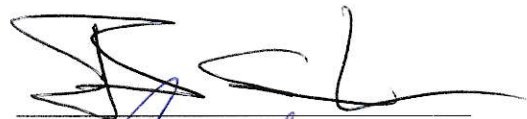
**Co-Director**

Dr. Javier López

---

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

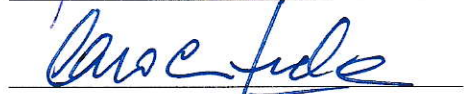
Dr. Eduardo Soto (Presidente)



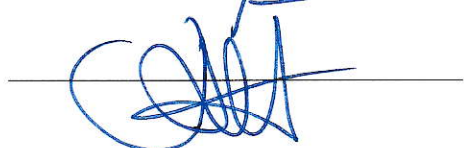
Dr. Andrés Olea



Dra. Carolina Jullian



Dr. Gerald Zapata





*A mi Madre*

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a mi profesor tutor, Dr. Boris Weiss, quien nunca me dio la espalda cuando le presentaba algún problema y nunca escatimó en tiempo para resolver mis dudas, con un espíritu docente en extinción en este país. También agradezco a aquellas personas que trabajaron y trabajan en el grupo del Dr. Weiss que tuve el gusto de conocer, quienes con desinteresada nobleza colaboraron en mi formación de manera muy relevante, en especial el Dr. Victor Bahamonde, que pacientemente logró introducirme en el mundo de Linux y la Dinámica Molecular. Por supuesto, agradezco a mi familia por haberme dado las herramientas necesarias para poder haber llagado a esta instancia.

...

La financiación de este plan de doctorado fue gracias a la Beca de Doctorado CONICYT y a FONDECYT proyecto N° 1150138.



# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Marco teórico. . . . .	4
1.1.1. Resonancia magnética nuclear, RMN. . . . .	4
1.1.2. Dinámica Molecular, DM. . . . .	10
1.2. Hipótesis. . . . .	13
1.3. Objetivos. . . . .	13
1.3.1. Objetivo general. . . . .	13
1.3.2. Objetivos específicos. . . . .	13
<b>2. Materiales y métodos.</b>	<b>15</b>
2.1. Preparación mesofases. . . . .	15
2.2. Microscopía óptica de luz polarizada, MOLP. . . . .	17
2.3. Resonancia magnética nuclear, RMN. . . . .	17
2.4. Viscosidad cinemática, $\eta$ . . . . .	17
2.5. Dinámica molecular, DM. . . . .	18
2.5.1. Montaje de sistemas. . . . .	18
2.5.2. Parámetros de simulación. . . . .	19
<b>3. Resultados y discusión.</b>	<b>22</b>

3.1. Resultados Fase TTAC. . . . .	22
3.1.1. Caracterización de la fase. . . . .	22
3.1.2. Extremos de la fase nemática. . . . .	25
3.1.3. Cambio de fase. . . . .	31
3.1.4. Cálculo del módulo de bending, $k^b$ . . . . .	34
3.1.5. Forma de los agregados. . . . .	36
3.1.6. Desdoblamiento cuadrupolares, $\Delta v_q$ , simulados. . . . .	40
3.1.7. Dinámica rotacional del agua. . . . .	44
3.1.8. Coeficiente de difusión traslacional del agua, $D_t$ . . . . .	47
3.1.9. Esferas de hidratación de Cloro y Sodio. . . . .	49
3.1.10. Estructura de la bicapa. . . . .	51
3.2. Resultados Fase TTAB. . . . .	56
3.2.1. Selección de los extremos de la fase. . . . .	56
3.2.2. Espectros $^2\text{H}$ -RMN de los extremos de la fase. . . . .	58
3.2.3. Microscopía Óptica de Luz Polarizada, MOLP. . . . .	61
3.2.4. Caracterización de la fase. . . . .	62
3.2.5. Viscosidad cinemática, $\eta$ . . . . .	62
3.2.6. Cambio de fase. . . . .	62
3.3. Resultados Fase SDS. . . . .	65
3.4. Inserción L-DOPA. . . . .	66
3.4.1. Inserción de L-DOPA en fase SDS. . . . .	69
3.4.2. Inserción de L-DOPA en fase TTAC. . . . .	71
<b>4. Conclusiones.</b>	<b>75</b>
<b>5. Apéndice</b>	<b>78</b>

## RESUMEN

En esta tesis se estudian tres cristales líquidos liótropos nemáticos a base de cloruro de tetradeciltrimetil amonio (TTAC), bromuro de tetradeciltrimetil amonio (TTAB) y dodecil sulfato de sodio (SDS). Las principales técnicas utilizadas son espectroscopía de resonancia magnética nuclear de deuterio, dado que los agregados de las fases nemáticas tienen la capacidad de orientarse en un campo magnético posibilitando la aparición de desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu_q$ ), y dinámica molecular, que demostró ser una herramienta muy útil para la interpretación de resultados experimentales y obtención de propiedades no observables. Estas fases son novedosas por poseer fosfolípidos de origen natural, haciéndolas más aptas como miméticos de membrana.

El estudio de estas fases, se centró en como el cambio en la concentración de sus componentes afecta las propiedades fisicoquímicas de los agregados que forman estos sistemas. En la fase con TTAC, se registró un interesante aumento de viscosidad con el aumento en el contenido de TTAC. Se demostró que este fenómeno estaba relacionado a un cambio de simetría, pasando de nemática mono-axial a nemática bi-axial, lo que también ocurre en las fases de TTAB y SDS, preservando la estructura de bicapa. Este cambio estructural de los agregados de TTAC está determinado por la densidad de carga superficial de los mismos. También se determinó que los cambios en  $\Delta\nu_q$  de los deuterios de las cadenas de SDS-d<sub>25</sub>, no necesariamente se deben a cambios en la dinámica interna del agregado, también pueden ser debidos a fluctuaciones orientacionales dadas por vibraciones del agregado.

Por último se estudio la interacción de L-DOPA, molécula más ampliamente utilizada para el tratamiento del Parkinson, con los agregados de la fase SDS y TTAC, como miméticos de membrana. En la fase SDS se hizo inviable el estudio pues L-DOPA induce la aparición de dos fases. En la fase TTAC se determinó que L-DOPA no interactúa con el

agregado, manteniéndose en el dominio isótropo del solvente.

## ABSTRACT

In this thesis three nematic lyotropic liquid crystals, based on tetradecyltrimethyl ammonium chloride (TTAC), tetradecyltrimethyl ammonium bromide (TTAB) and sodium dodecyl sulphate (SDS) are studied. The main used techniques are NMR of deuterium, since the aggregates of nematic phases spontaneously orient in magnetic fields enabling the emergence of quadrupole splittings, and molecular dynamics, which has proved to be very useful for the interpretation of experimental results and for obtaining unobservable properties. These phases are novel by containing natural phospholipids.

The study of these phases, was centered in how changes in composition affect physicochemical properties of the aggregates that form these systems. In the TTAC phase, an interesting viscosity increase by augmenting the TTAC content was registered. This phenomenon, also observed in TTAB and SDS, appears to be related to a phase change, from nematic mono-axial to nematic bi-axial. This geometric change in TTAC is closely related to the surface charge density. It was also determined that the changes in the quadrupole splittings of deuterium, from SDS-d<sub>25</sub>, is not necessarily due to changes in the internal dynamics of the aggregate, rather they may have their origin in orientational fluctuations, given by vibrations of the aggregate.

Finally, we study the interaction of L-DOPA, molecule most widely used for the treatment of Parkinson's disease, with aggregates forming SDS and TTAC phases, used as membrane mimetics. The study in SDS phase was non-viable because L-DOPA induces the appearance of two phases, and from the study in the TTAC phase we determined that L-DOPA does not interact with the aggregate forming this mesophase, remaining in the isotropic domain.



# Capítulo 1

## Introducción

Todo organismo viviente está compuesto de células que mantienen su organización morfofuncional gracias a una membrana que las delimita. Además, células eucariontes presentan en su interior organelos que también se delimitan por membranas. La superficie total de las membranas internas de una célula eucarionte es de  $7000 \mu m^2$  [1], aproximadamente 10 veces la superficie de la membrana citoplasmática, dilucidando la importancia del rol de las membranas biológicas en la vida [2]. Básicamente estas membranas permiten a los seres vivos compartimentalizar funciones y mantener una diferencia de potencial electroquímico entre el medio interno y el externo, lo que constituye la fuerza impulsora de procesos fuera del equilibrio.

Todas estas membranas celulares tienen una estructura común de bicapa, formada por fosfolípidos. En estas bicapas van inmersas una extensa variedad de moléculas, como colesterol, proteínas y azúcares, conformándose así el llamado mosaico fluido. La composición lipídica de las membranas celulares varía de acuerdo al tipo celular, organelos y organismos [3]. Incluso la composición lipídica puede variar entre ambas monocapas de una misma membrana y, más aun, dentro de una misma monocapa (balsas lipídicas) [4]. El contenido proteico de las membranas es variable y depende del tipo celular y su actividad [5]. El interior de las membranas está constituido por las cadenas hidrocarbonadas

de los fosfolípidos, generando un marcado ambiente hidrofóbico en contraste con el ambiente polar exterior, esencialmente agua. Esta diferencia de polaridad entre el interior y el exterior, tiene consecuencias fundamentales para el sostén de la vida como la conocemos.

Alrededor de un tercio de los genes humanos codifica para Proteínas de Transmembrana [6], PTs, por lo que no es de extrañar que las PTs tengan una enorme incidencia en patologías humanas [7, 8], siendo así el blanco de más del 50% de las drogas [9, 10], de aquí que la relación estructura-función de estas macromoléculas sea de gran interés. Pero a pesar de su importancia sólo se conocen las estructuras de 100 PTs, aproximadamente el 3% de todas las proteínas conocidas [11], esto debido a la dificultad de obtener datos experimentales.

En condiciones favorables la estructura 3D de PTs, moléculas muy hidrofóbicas, se puede determinar empleando resonancia magnética nuclear (RMN). Para esto, necesitan ser transferidas a un mimético de membrana. El mimético debe cumplir con dos criterios: reproducir el ambiente natural y conducir a espectros de RMN bien resueltos. Al disolver anfifilos en agua espontáneamente se forman diferentes agregados, dependiendo de las condiciones experimentales. Algunos de estos agregados son empleados como miméticos de membrana. Particularmente útiles en RMN son aquellos que se orientan espontáneamente en campos magnéticos. Hay diferentes clases de miméticos, entre los más empleados se encuentran micelas esféricas no orientadas, y los que forman bicapas, orientadas y no orientadas. Ambos son posibles de obtener con detergentes y/o fosfolípidos. Mientras que los primeros extraen directamente la PT desde su membrana nativa, los segundos necesitan un paso adicional, pero representan mejor la membrana celular. La principal diferencia entre ambos es, que si bien es cierto, los primeros forman micelas esféricas y proveen espectros de mejor resolución, no entregan información de acoplamientos dipolares y cuadrupolares residuales, de gran importancia para estudiar la estructura, orientación

y dinámica de PTs [12] y de solutos disueltos en ellas. La determinación estructural de PTs usa RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^2\text{H}$ , por lo tanto éstas tienen que ser enriquecidas isotópicamente empleando métodos biotecnológicos, con la complejidad experimental involucrada [13–15].

La naturaleza y composición de los lípidos presentes en la membrana celular y/o mimético influyen directamente en sus características como tamaño, grosor, curvatura, fluidez y propiedades mecánicas [9, 16–23]. Estas características inciden directamente en las propiedades de las PTs [21–23], esto porque afectan su estructura, por ejemplo, ángulos de inclinación, rotación y orientación de cadenas laterales [24]. De manera inversa, las PTs pueden afectar la dinámica de las cadenas hidrocarbonadas colindantes, lo que induce la formación de diferentes fases o promoviendo la fusión y fisión de membranas. Es más, estas interacciones proteína-membrana son esenciales para una enorme variedad de procesos celulares, incluyendo transporte, señalización y génesis de membranas [25, 26].

De lo anterior resulta evidente la necesidad de contar con un mimético de membrana lo más cercano posible en composición y estructura a la membrana natural. También es importante contar con un mimético cuyas propiedades fisicoquímicas sean conocidas, no sólo para entender el efecto que puedan tener en la estructura orientación y dinámica de las PTs y de moléculas de interés farmacológico, sino que tanto o más importante para entender mejor las propiedades de la membrana misma. Entonces, se propone desarrollar un mimético de membrana con un importante contenido de una mezcla de lípidos naturales extraídos del poroto de soya. Debe combinar la capacidad de orientación en campos magnéticos, para la obtención de acoplamientos dipolares y cuadrupolares residuales, con una razonable resolución, la que va a depender del tamaño y dinámica de los agregados. El interés principal por estudiar estos sistemas es que debido a su contenido de fosfolípidos naturales, es muy probable que representen mejor el comportamiento de las membranas



celulares que miméticos sintéticos.

Para lo anterior primero se llevarán a cabo estudios parciales del diagrama de fase de diferentes cristales líquidos liótropos nemáticos (CLLN), esto a través del seguimiento de espectros  $^2\text{H}$ -RMN asistido con imágenes de microscopía óptica de luz polarizada (MOLP). Con este estudio se determinarán los diferentes límites de las fases nemáticas, con diferentes concentraciones de sus componentes. A estos extremos se le harán estudios de mayor profundidad para investigar la estructura y dinámicas de estas fases. Esto se hará con  $^2\text{H}$ -RMN, viscosidad, diversas microscopías electrónicas de transmisión (TEM, Cryo-TEM y FF-TEM) y DM. A continuación se presenta un marco teórico de estas técnicas.

## **1.1. Marco teórico.**

### **1.1.1. Resonancia magnética nuclear, RMN.**

La espectroscopía RMN se basa en transiciones de energía de espín del núcleo atómico por interacción con radio frecuencias, en presencia de un campo magnético externo. Esta interacción ocurre porque las partículas que constituyen el núcleo también poseen un campo magnético intrínseco, originado por su espín. El espín es una propiedad que poseen algunas partículas elementales, como electrones, protones y neutrones. Toda carga en movimiento genera un campo magnético, pero este movimiento puede no ser sólo traslacional, sino también rotacional, por lo tanto el espín de un cuerpo cargado, cuya distribución de carga no es esférica, también genera un campo magnético. El núcleo posee dos números cuánticos que describen sus propiedades magnéticas,  $I$  y  $m_I$ , el momento angular total de espín y la proyección en el eje  $z$  del mismo, respectivamente.  $|I|$  está determinado por

$$|I| = [I(I + 1)]^{1/2}\hbar \quad (1.1)$$



donde  $I$  corresponde al número cuántico de espín nuclear y  $\hbar = h/2\pi$ , donde  $h$  es la constante de Planck.  $\hbar$  es la unidad natural del momento angular. En el núcleo, pares de neutrones o protones anulan sus números cuánticos de espín por ser anti-paralelos, por lo mismo cuando la suma de protones y neutrones es impar  $I \neq 0$ . Estos núcleos con  $I \neq 0$  son los que dan señal en RMN. Algunos ejemplos al respecto

Isótopo	$I$
$^{12}\text{C}, ^{16}\text{O}$	0
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$	$1/2$
$^2\text{H}, ^{14}\text{N}$	1

Tabla 1.1:  $I$  de diferentes núcleos.

El número cuántico de proyección de espín nuclear,  $m_I$ , análogo a  $m_s$  del electrón, describe la proyección en el eje  $z$  del momento angular de la siguiente forma

$$I_z = m_I \hbar \quad (1.2)$$

$m_I$  puede tomar valores desde  $-I$  a  $+I$  en intervalos de números enteros. Es decir, un elemento con  $I = 1/2$ , puede tomar valores de  $m_I$  de  $-1/2$  y  $+1/2$ , lo que significa que puede tener dos proyecciones en el eje  $z$  de su momento angular de espín nuclear. Por lo anterior si sometemos a un núcleo con  $I = 1/2$  a un campo magnético en el eje  $z$ , tendremos dos niveles energéticos con poblaciones de núcleos distintas, aquellos de baja energía, con  $m_I = 1/2$  (espín  $\alpha$ ), por tener su momento angular de espín nuclear paralelo al campo magnético y aquellos de alta energía, con  $m_I = -1/2$  (espín  $\beta$ ), que poseen su proyección en el eje  $z$  del momento angular de espín nuclear antiparalelo al campo magnético. La transición entre estos dos estados energéticos, que como cualquier transición cuántica viene dada por  $\Delta E = h\nu$ , es lo que da origen al espectro RMN convencional de  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$  (Figura 1.1).

Estas diferencias de energía entre las poblaciones  $\alpha$  y  $\beta$ , como se mencionó, depende

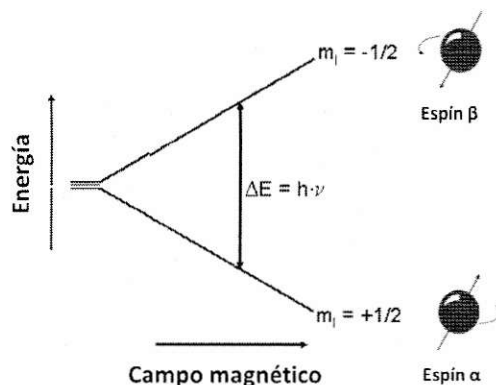


Figura 1.1: Origen de la señal de RMN.

del campo magnético entregado por el equipo, pero este no es el efectivo sobre el núcleo, ya que este campo magnético se ve modulado por el entorno electrónico, por lo cual esta diferencia de energía depende también de la posición del núcleo en la molécula y de otros tipos de fenómenos como acoplamientos con otros núcleos, de aquí es que se puede desprender información para la determinación estructural de moléculas. Pero aparte de esta información, la espectroscopía de RMN, bajo diferentes combinaciones de pulsos, es capaz de obtener información de otro tipo, como lo son en nuestro caso particular los desdoblamientos cuadrupolares ( $\Delta\nu$ ) y tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ )

### **Desdoblamientos cuadrupolares, $\Delta\nu$ .**

En la Figura 1.1, se ve lo que ocurre a nivel energético para un núcleo con  $I=1/2$ , que son los más comunes en química orgánica, pero para núcleos con  $I=1$ ,  $m_l$  puede tomar tres valores: -1, 0 y 1, lo que tiene como consecuencia que existen tres posibilidades para la proyección del momento magnético de espín del núcleo en el eje z, la dirección del campo magnético. La orientación extra resulta ser perpendicular al campo magnético, además de la paralela y antiparalela. Las transiciones energéticas entre estas diferentes

orientaciones, en el caso de núcleos cuadrupolares, dependen en parte de un término proporcional a  $\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle$ , donde  $\langle \rangle$  denota promedio y  $\theta$  es el ángulo formado por el gradiente de campo eléctrico y el campo magnético. Este gradiente de campo eléctrico está dado por el cambio en la densidad electrónica a lo largo del enlace en el que participa el núcleo cuadrupolar, en nuestro caso el enlace carbono-deuterio, ver Figura 1.2. En presencia de una solución isótropa, donde hay igual probabilidad de rotación en cualquier dirección del espacio, tenemos que  $\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle = 0$ . Esto produce que las diferencias de energías entre núcleos con  $m_I = -1$  y  $m_I = 0$  y entre núcleos con  $m_I = 0$  y  $m_I = 1$  sea de la misma magnitud, dando lugar a dos transiciones energéticas que aparecen a la misma frecuencia, por lo tanto se genera sólo una señal, Figura 1.2. Pero en presencia de una solución anisótropa, el enlace carbono-deuterio tendrá una orientación preferencial, por lo tanto  $\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle \neq 0$ , y como este término va a estar afectando la energía de estas tres orientaciones, se producen diferencias energéticas entre estos estados de diferente magnitud, apareciendo dos señales en el espectro. La diferencia en frecuencia entre las dos señales es el llamado desdoblamiento cuadrupolar,  $\Delta\nu$ , ver Figura 1.2.

### **Tiempos de relajación longitudinal, $T_1$ .**

Como mencionamos anteriormente, bajo un campo magnético externo núcleos con  $I=1/2$  se dividirán en dos niveles energéticos, uno de baja energía poblado con los núcleos con espín  $\alpha$  y el otro de mayor energía poblado con los núcleos de espín  $\beta$ . La relación entre estas poblaciones está dada por la ley de distribución de Boltzmann, relación conocida como el Factor de Boltzmann, que en nuestro caso se puede expresar de la siguiente manera:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} \quad (1.3)$$

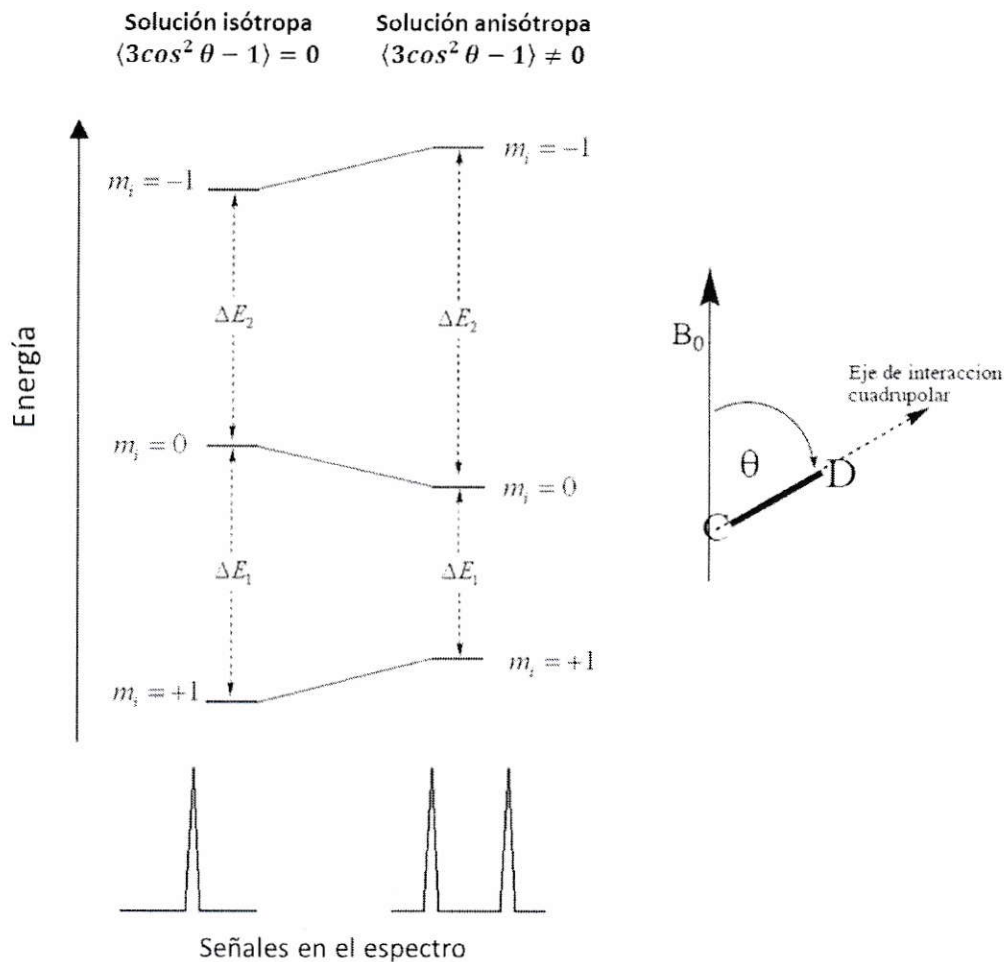


Figura 1.2: Origen de los desdoblamientos cuadrupolares,  $\Delta\nu$ .

Donde  $N_\beta$  y  $N_\alpha$  son los números de núcleos con espín  $\beta$  y  $\alpha$ , respectivamente,  $\Delta E$  es la diferencia de energía entre estos estados,  $k$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta.

Dado que los núcleos con espín  $\alpha$  tienen menor energía será el nivel energético más poblado, por lo que la proyección en el eje  $z$  del momento magnético total macroscópico,  $M_z$  (suma de todos los espines individuales), en condiciones de equilibrio resulta también paralelo al campo magnético. Tras un pulso de radiofrecuencia de  $180^\circ$ , perpendicular al



campo magnético externo, que entre en resonancia con la frecuencia de precesión de los núcleos, conocida como la frecuencia de Larmor, las poblaciones se invierten, al igual que  $M_z$ . El tiempo característico para la restitución de  $M_z$  al equilibrio, tras este pulso de  $180^\circ$ , es  $T_1$ , Figura 1.3. Cabe mencionar que existe otro proceso de relajación relacionado con la restitución del equilibrio de la proyección del momento magnético total en el plano  $xy$ , relacionado con  $T_2$ , tiempo de relajación transversal. Inmediatamente tras un pulso de radio frecuencia de  $90^\circ$  los componentes  $x$  e  $y$  del vector del momento magnético del núcleo estarán en fase apuntando en la dirección del pulso. El tiempo característico con que se desfasan los componentes  $x$  e  $y$  del momento magnético, es  $T_2$ . Es decir el tiempo relacionado con la restitución del equilibrio del vector del momento magnético a lo *largo* (longitudinal) y a *través* (transversal) del campo magnético externo, es  $T_1$  y  $T_2$ , respectivamente, los que no necesariamente son iguales.

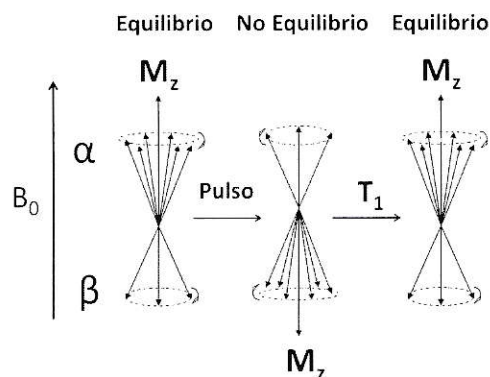


Figura 1.3: Tiempo de relajación longitudinal,  $T_1$ .

Debido a la dependencia de los coeficientes de emisión espontánea con la frecuencia, los núcleos no relajan de manera espontánea, es decir, en un medio ideal donde la conservación del momento angular se satisface en forma estricta  $T_1$  no existiría. La relajación solo puede ser producida por la interacción del núcleo con otros campos magnéticos, los

que son originados aleatoriamente por el movimiento browniano de otras moléculas. Estos campos magnéticos aleatorios pueden ser subdivididos en componentes perpendiculares y paralelos al campo magnético externo. Los componentes perpendiculares que oscilen a la frecuencia de Larmor inducen transiciones de espín nuclear que dan lugar a la relajación no-adiabática, la cual contribuye a la restitución del equilibrio de  $M_z$ . Este proceso da lugar a  $T_1$ , relajación conocida también como relajación entálpica (no adiabática). Los componentes perpendiculares al campo magnético externo del vector de magnetización total  $M$ , son afectados por los componentes paralelos de los campos magnéticos fluctuantes del medio, lo que induce la relajación de los componentes  $x$  e  $y$  de  $M$ , proceso durante el cual no hay intercambio energético con el medio. Por esto es que  $T_2$  también se conoce como relajación entrópica (adiabática). El origen de estos campos magnéticos fluctuantes que dan origen a la relajación, pueden ser agrupados en cuatro fenómenos: 1) Interacciones dipolo-dipolo: interacciones moduladas por el *tumbling* molecular y por difusión traslacional 2) Anisotropía del apantallamiento: cambio en el apantallamiento electrónico del núcleo por cambiar su orientación con respecto al campo magnético externo 3) Interacciones espín-rotación: el campo magnético generado por la rotación molecular puede acoplarse con el momento magnético del núcleo. Colisiones que interrumpen este acoplamiento contribuyen a la relajación. 4) Interacciones con electrones desapareados: Acoplamientos entre los momentos angulares de electrones desapareados y el núcleo contribuyen drásticamente a los tiempos de relajación, esto por el gran momento angular que presenta el electrón en comparación con el de otros núcleos y 5) relajación cuadrupolar, nuestro caso.

### **1.1.2. Dinámica Molecular, DM.**

La DM es una simulación computacional, en la que bajo un campo de fuerza clásico (newtoniano) que detalla las interacciones entre los átomos, se permite que átomos y

moléculas interactúen en un intervalo de tiempo. Esta interacción de átomos en el tiempo permite al sistema evolucionar a pozos de potencial, es decir a arreglos más estables, generándose así la llamada trayectoria del sistema. Esta trayectoria contiene todas las coordenadas de los átomos a lo largo del tiempo. A partir de esta trayectoria es posible calcular algunas propiedades observables, pero más interesante es que se puede obtener información muy valiosa del sistema, que de otra manera no es posible, los llamados datos no observables.

A fines de la década de los 50 la DM fue introducida por primera vez para resolver problemas de física teórica a través de la modelación de esferas duras [27, 28]. Un par de años más tarde se logró simular un sistema líquido [29], ya en 1974 se lograba simular agua líquida [30]. Actualmente la DM es un campo multidisciplinario aunando criterios matemáticos, físicos y químicos, y está siendo utilizada cada vez más para estudios biológicos; la DM es ampliamente utilizada para determinar la relación entre estructura, dinámica y función de biomoléculas [31–34]. El abanico de biomoléculas simuladas por DM incluye proteínas [35–37], ácidos nucleicos [38–40], biomembranas [41–44], glucanos, etc [45–47]. Para estudios de miméticos de biomembranas, sistemas simulados en esta tesis, la mayoría de los estudios antes del 2000 se enfocaban en bicapas simples de fosfolípidos compuestas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) [48–50]. Hoy en día la DM se está utilizando para simular proteínas en membranas celulares más realistas [51, 52] para examinar dinámicas conformacionales en la escala de microsegundos [53, 54].

La base de la DM es la mecánica molecular, que ocupa las leyes de la física clásica para predecir estructuras y propiedades moleculares. Este método está caracterizado por un campo de fuerza que describe la hipersuperficie de energía potencial que genera el espacio fase de las  $3N$  coordenadas y los  $3N$  momentos de los  $N$  átomos del sistema en estudio.



El campo de fuerzas gobierna tanto las interacciones enlazantes (como estiramientos de enlace, ángulos de enlace, deformaciones fuera del plano y ángulos de torsión) como las no enlazantes (interacciones electrostáticas y de van der Waals) de los átomos constituyentes del sistema. La energía potencial del sistema se calcula en función sólo de las posiciones nucleares de los átomos a través de la siguiente expresión

$$V(r^N) = \sum_{\text{Estiramientos}} \frac{k_i}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{Ángulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\substack{\text{Deformaciones} \\ \text{fuera del plano}}} k_i (\varepsilon_i - \varepsilon_{i,0})^2 \\ + \sum_{\text{Torsiones}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

$V(r^N)$  corresponde a la energía potencial del sistema en función de las posiciones ( $r$ ) de las  $N$  partículas. El primer término de la ecuación representa la interacción entre pares de átomos enlazados. Esta interacción, una por cada enlace, esta modelada por una función potencial armónica cuya variable es la longitud de enlace,  $r_i$ , con respecto a la posición de equilibrio,  $r_{i,0}$ . El segundo término corresponde a la variación de los ángulos entre tres átomos secuencialmente enlazados, con respecto a la posición de equilibrio ( $\theta_{i,0}$ ). El tercer término describe las variaciones en los ángulos impropios o deformaciones fuera del plano, presentes en los átomos con hibridación  $sp^2$  de la molécula, a través de un potencial armónico. El cuarto término corresponde a los ángulos diedros propios, con la definición usual para un ángulo de torsión y representados por potenciales periódicos dados por series de Fourier, donde el parámetro  $n$  determina la periodicidad,  $V_N$  determina el tamaño de la barrera rotacional alrededor del enlace central que depende del tipo de átomos y su entorno y  $\gamma$  determina el ángulo de mínima energía. De esta manera con estos cuatro potenciales enlazantes se describen todas las interacciones de los átomos que forman todas las moléculas del sistema. El quinto y sexto término corresponde a las interacciones no



enlazantes del tipo electrostática y de van der Waals, respectivamente, las que representan las interacciones intermoleculares. Los subíndices  $i$  y  $j$  en las sumatorias de los potenciales no enlazantes, representan iteraciones para calcular la interacción de un átomo con todos los átomos de su alrededor y así consecutivamente para todos los átomos del sistema.

Entonces, considerando la importancia de la composición lipídica en un mimético de membrana y asumiendo que el conocimiento detallado de las propiedades fisicoquímicas de nuestros sistemas facilitará el desarrollo de un mimético más representativo de la membrana celular, la hipótesis será la siguiente.

## **1.2. Hipótesis.**

Las propiedades fisicoquímicas de los agregados de cristales líquidos liótrofos nemáticos son función de la naturaleza del grupo polar o cargado de los anfífilos, de sus contracciones, de la concentración de sus componentes y de moléculas huésped.

## **1.3. Objetivos.**

### **1.3.1. Objetivo general.**

Desarrollo de un mimético de membrana, a base de bicelas con un importante contenido de fosfolípidos naturales, que presente un espectro  $^2\text{H}$ -RMN de buena resolución para su consecuente uso en el estudio de inserción, dinámica e interacciones de moléculas de interés biológico o farmacológico con la membrana.

### **1.3.2. Objetivos específicos.**

- 1 Estudio parcial del diagrama de fases de un cristal líquido liótrofo nemático (CLLN) a base de TTAC (cloruro de tetradeciltrimetil amonio), NaCl, decanol (DeOH), fosfolípidos naturales extraídos del poroto de soya (PL) y agua.

- II Estudio parcial del diagrama de fases de un CLLN a base de TTAB (bromuro de tetradeciltrimetil amonio), NaBr, decanol, fosfolípidos naturales extraídos del poroto de soya y agua.
- III Estudio parcial del diagrama de fases de un CLLN a base de SDS (dodecilsulfato de sodio), NaCl, decanol, fosfolípidos naturales extraídos del poroto de soya y agua.
- IV Estudio de los extremos de las fases obtenidas en I, II y III, a través de TEM, viscosidad y  $^2\text{H}$ -RMN.
- V Simulación con DM de los sistemas más representativos para explicar los observables y obtener información adicional.
- VI Simulaciones con HYDRO para relacionar cambios de viscosidad con cambios estructurales de los agregados conformantes de las fases CLLN.
- VII Inserción de L-DOPA en el mimético de membrana que cumpla con el objetivo general, para a través de  $^2\text{H}$ -RMN y simulación determinar orientación, dinámica y mecanismos de inserción.

# Capítulo 2

## Materiales y métodos.

### 2.1. Preparación mesofases.

En esta Tesis se estudiaron tres sistemas a base de TTAC, TTAB y SDS. Con la idea de maximizar la concentración de PL en estos tres sistemas. PL es una mezcla de fosfatidilcolina (DOPC) y fosfatidiletanolamina (POPE) en una proporción aproximada de 2,3:1.

Se realizó un estudio preliminar para encontrar un punto donde además de tener una significativa cantidad de PL se conserve un buen espectro  $^2\text{H}$ -RMN. Los puntos seleccionados, que llamaremos soluciones base (sb), fueron los siguientes:

- I **sb fase TTAC:** 0.2253 g de TTAC + 0.1165 g de PL + 0.012 g de SDS + 0.0912 g de NaCl + 58  $\mu\text{l}$  de DeOH + 1 ml de H<sub>2</sub>O.
- II **sb fase TTAB:** 0.4413 g de TTAB + 0.1165 g de PL + 0.012 g de SDS + 0.0674 g de NaBr + 58  $\mu\text{l}$  de DeOH + 1 ml de H<sub>2</sub>O.
- III **sb fase SDS:** 0.5240 g de SDS + 0.0874 g de PL + 0.0307 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 108  $\mu\text{l}$  de DeOH + 1 ml de H<sub>2</sub>O.

Además de estos puntos, definimos tres puntos en la fase TTAC que fueron estudiados

por DM, y que llamaremos muestras 1, 2 y 3, que en el texto también serán mencionados como los puntos 0,225 g/ml TTAC (sb fase TTAC), 0,293 TTAC y 0,104 g/ml NaCl. Catalogar estos puntos como muestra 1, 2 y 3 facilita la comparación con sus análogos de DM, sistemas 1, 2 y 3, que serán detallados en la sección 2.5.1. Muestra 1 es la sb de la fase TTAC, muestra 2 es la muestra 1 con un 30% p/p más de TTAC y la muestra 3 es la muestra 1 con un 15% p/p más de NaCl, de manera que sus composiciones fueron las siguientes:

**Muestra 1 o sb fase TTAC:** 0.2253 g de TTAC + 0.1165 g de PL + 0.012 g de SDS + 0.0912 g de NaCl + 58  $\mu$ l de DeOH + 1 ml de H<sub>2</sub>O.

**Muestra 2:** 0.2930 g de TTAC + 0.1165 g de PL + 0.012 g de SDS + 0.0912 g de NaCl + 58  $\mu$ l de DeOH + 1 ml de H<sub>2</sub>O.

**Muestra 3:** 0.2253 g de TTAC + 0.1165 g de PL + 0.012 g de SDS + 0.1040 g de NaCl + 58  $\mu$ l de DeOH + 1 ml de H<sub>2</sub>O.

Estos sistemas se prepararon por simple mezclado, y dejando en agitación por 48 hr. Las fases TTAC y TTAB fueron estudiadas y preparadas a 25 °C y la fase SDS fue estudiada y preparada a 37 °C. El estudio parcial del diagrama de fases se realizó cambiando la concentración de sus componentes, salvo la del agua. Además de MOLP ocupamos espectroscopía <sup>2</sup>H-RMN, para lo cual DeOH se ocupó con un 20% p/p de 1,1-dideuterodecanol (DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub>) y H<sub>2</sub>O se ocupó con un 5% p/p de D<sub>2</sub>O (DHO), como sondas de la dinámica de la interfase. De este estudio parcial del diagrama de fases se obtuvieron los extremos, para cada uno de los componentes, donde aún se conserva la fase nemática. Para estudiar la dinámica interna de los agregados, se adicionó SDS deuterado a lo largo de toda la cadena (SDS-d<sub>25</sub>) a muestras características de las diferentes fases encontradas.



## **2.2. Microscopía óptica de luz polarizada, MOLP.**

Para observar las texturas de los sistemas se utilizó un microscopio Motic serie B equipado con polarizadores cruzados. La muestra fue colocada en un porta objetos cóncavo de profundidad 1 mm, se sellaron los bordes del cubreobjeto y se dejó en un imán de 2.35 T por 15 minutos para dejar que la muestra se oriente. Periodos más largos en el imán no afectan las texturas. Para el caso de las fases TTAC y TTAB, las fotos fueron tomadas a 25 °C y para fase SDS a 37 °C. Las fotos fueron tomadas con una amplificación de 20, teniendo la precaución de obtener las fotos del centro de la concavidad, evitándose así cambios de textura por cambiar el grosor de la muestra.

## **2.3. Resonancia magnética nuclear, RMN.**

Se utilizó un espectrómetro Bruker Avance 400, ubicado en la Universidad de Santiago de Chile, con una sonda inversa de banda ancha sintonizada a 61.425 MHz. El pulso de  $^2\text{H}$  de 90 ° fue de 19  $\mu\text{s}$  y se acumularon más de 1000 transientes por muestra de una ventana espectral de 40 kHz. La señal fue almacenada en archivos de 32 kB. Todas las muestras se depositaron en tubos de 5 mm y se dejaron estabilizar por 48 hr antes de ser medidas. Las fases TTAC y TTAB fueron medidas a 25 °C . La fase SDS fue medida a 37 °C, pues bajo 30 °C se encuentra en estado sólido.

## **2.4. Viscosidad cinemática, $\eta$ .**

La viscosidad cinemática,  $\eta$ , fue medida utilizando un viscosímetro Ubbelohde. Las fases TTAC y TTAB fueron medidas a 25 °C. Todas las mediciones fueron hechas a 1 atmósfera de presión. Los estándares utilizados fueron decanol y tetraetilenglicol.

## 2.5. Dinámica molecular, DM.

### 2.5.1. Montaje de sistemas.

Todos los sistemas simulados consisten en una bicapa de anfifilos rodeada de agua y sal, esto en una caja de 10 nm por arista aproximadamente, en condiciones de bordes periódicos. Los sistemas simulados fueron las fase TTAC y TTAB a diferentes concentraciones.

#### Fase TTAC.

Para estudiar el efecto de la concentración de TTAC y la fuerza iónica en las propiedades de estos sistemas, hemos realizado tres simulaciones, que representan distintas composiciones de la fase TTAC. A la solución base (sb) la llamaremos **muestra 1**; la sb con un 30% p/p más de TTAC la llamaremos **muestra 2** y la sb con un 15% p/p más de NaCl, con respecto a la sb, la llamaremos **muestra 3**. Ver sección 2.1 para detalles de sus composiciones. De esta manera los tres sistemas simulados, que llamaremos **sistema 1**, **sistema 2** y **sistema 3**, son las representaciones de las **muestra 1**, **muestra 2** y **muestra 3**, respectivamente. A continuación se detallan el tipo y el número de moléculas presentes en cada uno de los sistemas.

1. **Sistema 1**: 392 iones positivos de TTAC ( $\text{TTA}^+$ ) + 72 DOPC + 32 POPE + 200 DeOH + 32 iones negativos de SDS ( $\text{DS}^-$ ) + 32 ácido cis-10-Octadecanoico (AOL) + 32 iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) + 392 iones cloro ( $\text{Cl}^-$ ). 392  $\text{Cl}^-$  son requeridos para neutralizar 392  $\text{TTA}^+$  y 32  $\text{Na}^+$  son requeridos para neutralizar 32  $\text{DS}^-$ . Las dimensiones de la caja original son 10,3, 10,3 y 9,5 nm para los ejes x, y, z, respectivamente. Este sistema representa la muestra 1.
2. **Sistema 2**: En este sistema la cantidad de TTAC fue incrementada en un 30% p/p

con respecto al sistema 1, de esta manera el número total de moléculas es:  $512 \text{ TTA}^+ + 72 \text{ DOPC} + 32 \text{ POPE} + 200 \text{ DeOH} + 32 \text{ DS}^- + 32 \text{ AOL} + 32 \text{ Na}^+ + 512 \text{ Cl}^-$ . Las dimensiones de la caja original son 12,2, 12,2 y 10,6 nm, para los ejes x, y, z, respectivamente. Este sistema representa la muestra 2.

3. **Sistema 3:** Este sistema corresponde al sistema 1 incluyendo una concentración 1M de NaCl. Las dimensiones de la caja original son 10,4, 10,4 y 9,6 nm, para los ejes x, y, z, respectivamente. Este sistema representa la muestra 3. Aunque esta cantidad de sal no es la experimental, refleja un incremento en la fuerza iónica, que es lo que ocurre experimentalmente al comparar la muestra 1 con la muestra 3.

En estos tres sistemas, las especies fueron distribuidas homogéneamente entre las dos capas que forman el agregado.

## 2.5.2. Parámetros de simulación.

### Fase TTAC.

El método de minimización de energía utilizado, previa generación de la trayectoria, fue “steepest descent”, para remover el exceso de energía asociado al solapamiento de átomos adyacentes. Una vez que se alcanza un mínimo de energía, una trayectoria de 200 ns fue simulada para cada uno de los sistemas. El paquete utilizado fue GROMACS, versión 4.5.3, con el campo de fuerza GROMOS 54a7. El intervalo de tiempo entre los pasos de integración fue de 4 fs. Las fuerzas de Van der Waals fueron simuladas utilizando el potencial de Lennard Jones (LJ), y las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron calculadas con el método de Ewald [55, 56]. Tanto para LJ como para las interacciones electrostáticas de largo alcance el “cut-off” fue de 1,2 nm. El “cut-off” es la distancia a partir de la cual no se calculan las interacciones electrostáticas con la ley de Coulomb

sino que se hace una aproximación, que en nuestro caso es la suma de Ewald, y para LJ es la distancia hasta donde se calcula la interacción. El largo de los enlaces es restringido usando el algoritmo LINCS [57]. Todas las simulaciones fueron en un ensamble NPT a 300 K y 1 atm, acoplado a algoritmos de baños débiles de temperatura y presión [58], con constantes de tiempo de 0,1 ps y 1 ps para la temperatura y presión, respectivamente. El potencial de Ryckaert-Belleman [59] fue el utilizado para las torsiones de las cadenas alifáticas, pues reproduce mejor las transiciones cis-trans.

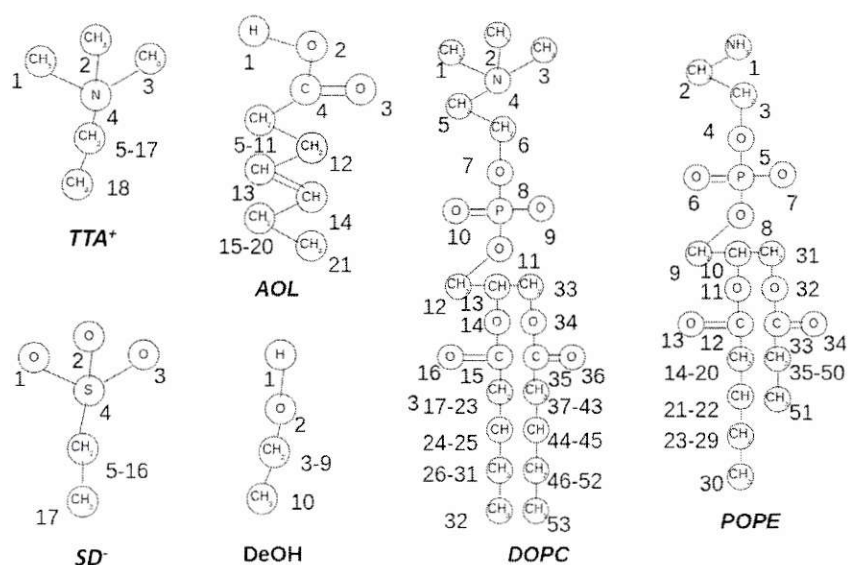


Figura 2.1: Numeración de los átomos de todas las moléculas involucradas en este estudio.

Los parámetros de LJ utilizados son los mismos especificados en Bahamonde-Padilla *et al* [60]. El campo de fuerza ocupado fue el estándar GROMOS 54a7 [61]. La distribución de carga de TTA<sup>+</sup>, DS<sup>-</sup>, DeOH, DOPC, POPE y AOL, fue calculada utilizando el método “Complete Neglect of Differential Overlap”(CNDO) [62], Los resultados (en



unidades  $e^-$ ) se presentan en la Tabla 2.1, esto considerando la numeración de los átomos presentada en la Figura 2.1. Como se argumenta en Bahamonde-Padilla *et al* [60], la distribución de carga de todas las especies se redujo a la mitad para considerar la ausencia de polarizabilidad y la constancia del medio dieléctrico [60,63–68]. El modelo utilizado para el agua es de Cargas Puntuales Simples (SPC por sus siglas en inglés) [69].

Átomo	TTA <sup>+</sup>	DOPC	POPE	DeOH	DS <sup>-</sup>	AOL
	0,400	0,40	0,645	0,426	-0,404	0,24
2	0,400	0,40	0,148	-0,722	-0,404	-0,24
3	0,400	0,40	0,005	0,329	-0,404	0,41
4	-0,500	-0,50	-0,383	-0,033	0,418	-0,304
5	0,300	0,30	0,447	0,0	-0,286	-0,106
6	0,0	0,40	-0,256	0,0	0,108	0,0
7	0,0	-0,80	-0,259	0,0	-0,028	0,0
8	0,0	1,70	-0,347	0,0	0,0	0,0
9	0,0	-0,80	0,60	0,0	0,0	0,0
10	0,0	-0,80	0,109	0,0	0,0	0,0
11	0,0	-0,70	-0,232	0,0	0,0	0,0
12	0,0	0,40	0,380	0,0	0,0	0,0
13	0,0	0,30	-0,344	-	0,0	0,0
14	0,0	-0,70	0,027	-	0,0	0,0
15	0,0	0,070	0,0	-	0,0	0,0
16	0,0	-0,70	0,0	-	0,0	0,0
17	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0
18-21	-	0,0	0,0	-	-	0,0
22-30	-	0,0	0,0	-	-	0,0
31	-	0,0	0,121	-	-	-
32	-	0,0	-0,233	-	-	-
33	-	0,0	0,426	-	-	-
34	-	0,50	-0,341	-	-	-
35	-	-0,70	0,027	-	-	-
36	-	0,8	0,0	-	-	-
37	-	-0,6	0,0	-	-	-
38-53	-	0,0	0,0	-	-	-
Carga total	1,0	0,0	0,0	0,0	-1,0	0,0

Tabla 2.1: Cargas atómicas CNDO de todas las moléculas en estos sistemas acorde a la numeración de los átomos presente en la Figura 2.1.

# Capítulo 3

## Resultados y discusión.

### 3.1. Resultados Fase TTAC.

#### 3.1.1. Caracterización de la fase.

Lo primero para el análisis de los resultados es demostrar que nuestros cristales líquidos se encuentran en la fase nemática. La Figura 3.1 muestra el espectro  $^2\text{H}$ -RMN de SDS- $d_{25}$  disuelto en muestra 1 (sb fase TTAC) y 2 (sb fase TTAC + 30% p/p TTAC), ver sección 2.1. La presencia y magnitud de  $\Delta\nu_q$ , junto con la forma de la línea de ambos espectros, fuertemente sugieren que los agregados corresponden a micelas con estructura de bicapa de orden nemático [70–74]. Es importante enfatizar que estos agregados no pueden ser micelas esféricas dado que estas no generan  $\Delta\nu_q$ .

A pesar de las similitudes entre los espectros  $^2\text{H}$ -RMN de la muestras 1 y 2, estas presentan texturas MOLP muy diferentes, ver Figuras 3.1 C y 3.1 D. Esta observación evidencia la existencia de dos tipos de fases nemáticas, que necesariamente provienen de un cambio estructural en los agregados. Sin embargo, este cambio no puede estar afectando a la estructura de bicapa de las micelas, como se evidencia por los espectros  $^2\text{H}$ -RMN. Las texturas de “oily streaks” observadas en la Figura 3.1 C aparecen usualmente como consecuencia de un ordenamiento homeótopo, generalmente observado en fases lamela-

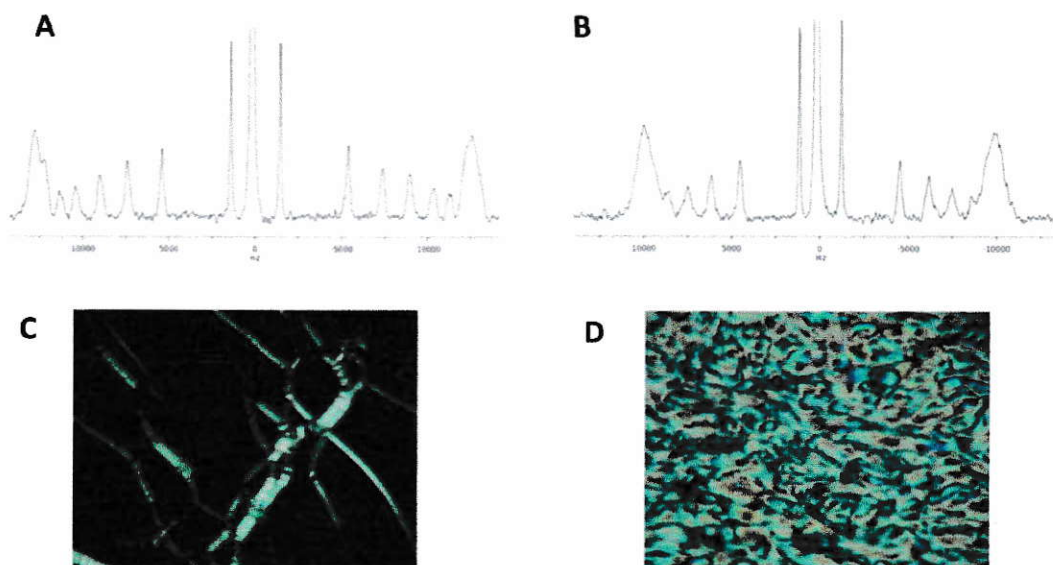


Figura 3.1: A y B muestran el espectro  $^2\text{H}$ -RMN de la muestra 1 y 2 respectivamente (ver sección 2.1).  $\Delta\nu_q$  de SDS- $d_{25}$  puede ser medido directamente desde el espectro. C y D muestran las texturas de MOLP de la muestra 1 y 2 respectivamente.

res, aunque suele aparecer en cristales líquidos liótropos nemáticos discoidales, como es en este caso. La textura observada en 3.1 D es la típica textura de Schlieren, usualmente observada en fases nemáticas [75]. Estas texturas no pueden venir de una fase esméctica dado que estas fases arrojan un espectro  $^2\text{H}$ -RMN típico de patrón de polvo; las fases esmécticas no se orientan en campos magnéticos.

La Figura 3.2 muestra imágenes de Cryo-TEM y FF-TEM de la muestra 1. Ambas imágenes corroboran la existencia de agregados individuales de tamaño finito, sustentando la presencia de una fase nemática. En particular, agregados de 2 a 5 nm se pueden observar en ambas figuras, también se observan aglomeraciones de agregados que podrían estar dando origen a las texturas de “oily streak” observadas por MOLP.



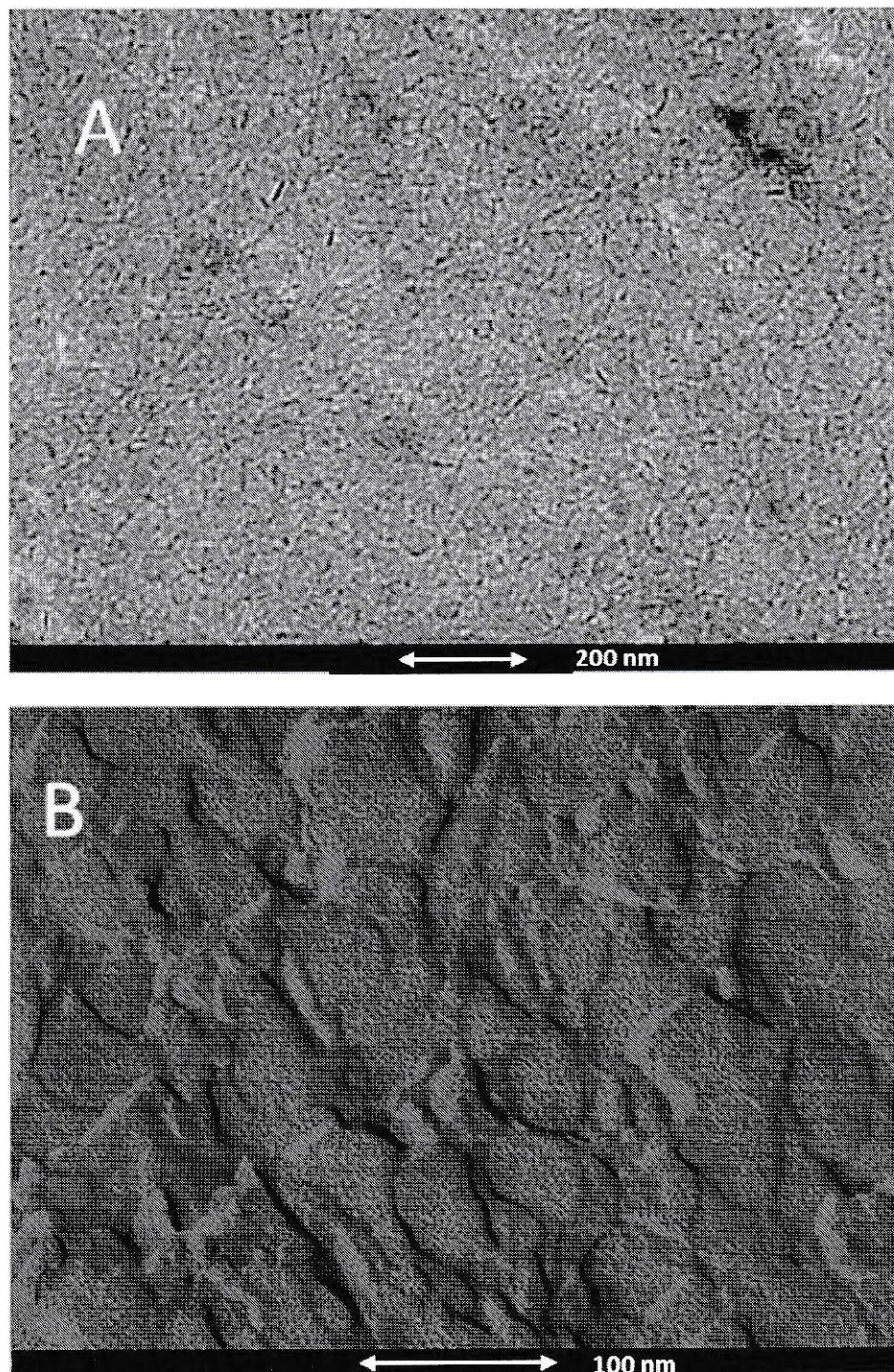


Figura 3.2: (A) Imagen de Cryo-TEM de la muestra 1 y (B) imagen de FF-TEM de la muestra 1. La composición de las muestras está en la sección 2.1.



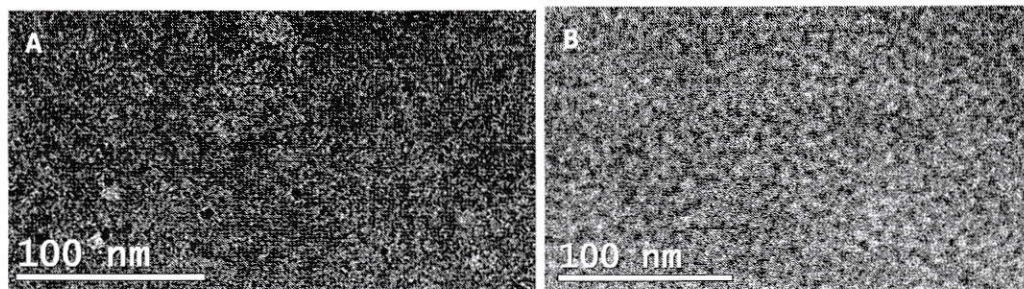


Figura 3.3: Imágenes TEM correspondientes a A) muestra 1 y B) muestra 2. La composición de las muestras está en la sección 2.1

La Figura 3.3 muestra imágenes TEM de la muestra 1 y 2. Ambas imágenes presentan agregados discretos, de 1 a 2 nm para la muestra 1 y de 10 a 20 nm para la muestra 2. De esta manera todos las imágenes de microscopía electrónica (Cryo-TEM, FF-TEM y TEM) permiten descartar la presencia de fases lamelares o hexagonales, que son las que usualmente rodean a la región de la fase nemática en el diagrama de fases [76].

Toda la evidencia anterior, es decir, los espectros  $^2\text{H}$ -RMN, MOLP, Cryo-TEM y FF-TEM, demuestran que las muestras 1 y 2 presentan una fase liótrope nemática.

### 3.1.2. Extremos de la fase nemática.

Para estudiar el efecto del cambio de concentración de los componentes de esta fase, excepto agua, es decir TTAC, PL, DeOH y NaCl, hicimos un estudio preliminar para identificar los extremos de la fase nemática para cada uno de estos componentes. Esto se realizó obteniendo  $\Delta v_q$  de DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub> para diferentes concentraciones de sus componentes, hasta que el espectro se pierde, señal inequívoca de que la fase nemática se rompe. En la Figura 3.4 se presentan estos resultados para el rango de concentraciones donde aun se presentan las fases nemáticas.

Los extremos identificados son 0,225 g/ml y 0,293 g/ml para TTAC, 0,047 g/ml y 0,140

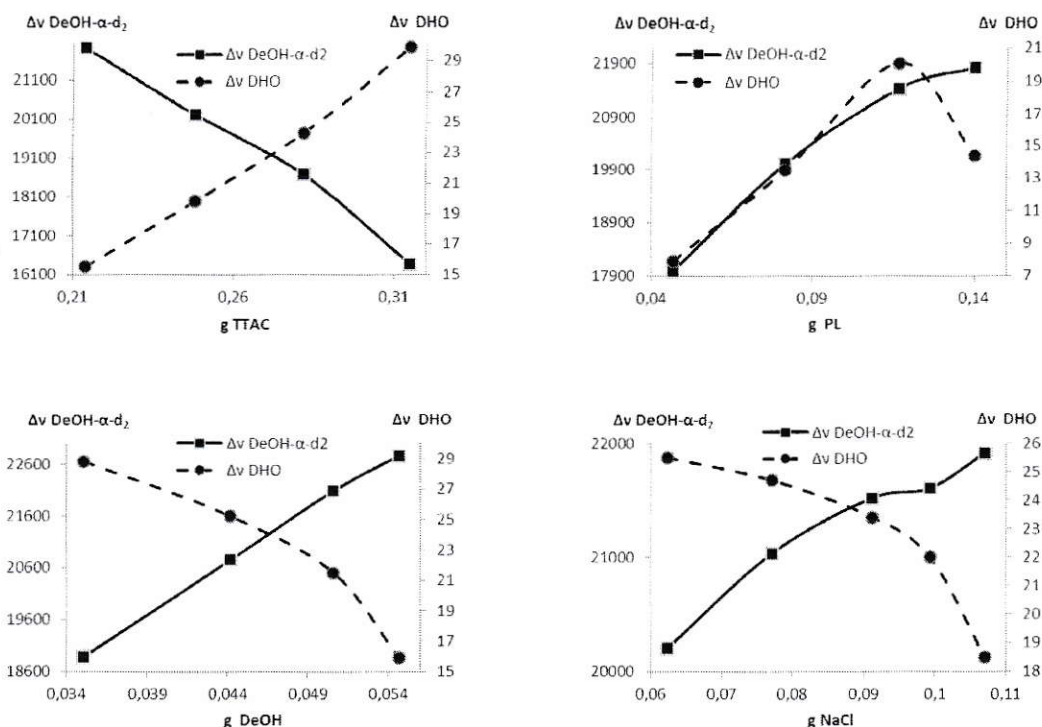


Figura 3.4:  $\Delta v$  de  $\text{DeOH-}\alpha\text{-d}_2$  y DHO a diferentes cantidades de sus componentes.

g/ml para PL, 0,040 g/ml y 0,050 g/ml para DeOH y 0,073 g/ml y 0,104 g/ml para NaCl, estas cantidades por ml de agua. Para estudiar más a fondo el orden y la dinámica de estos extremos, característicos de las diferentes fases, no solo en la interfase, sino también hacia el interior de la región hidrofóbica, se reemplazó el SDS por SDS- $\text{d}_{25}$  [77]. La Figura 3.5 muestra los espectros  $^2\text{H}$ -RMN de SDS- $\text{d}_{25}$  y DHO. La Figura 3.6 muestra las texturas de MOLP y la Figura 3.7 son las imágenes TEM de los mismos extremos, salvo para el caso de NaCl.

Los valores medidos de  $\Delta v_q$  y  $T_1$  de SDS- $\text{d}_{25}$  y DHO se presentan en la tabla 3.1, y los valores de  $\eta$  en la tabla 3.2.

Los datos de la tabla 3.1 revelan que, como es esperado,  $\Delta v_q$  es mayor para los primeros  $\text{CD}_2$  de la cadena y disminuye a medida que nos adentramos en la región hidrofóbica,

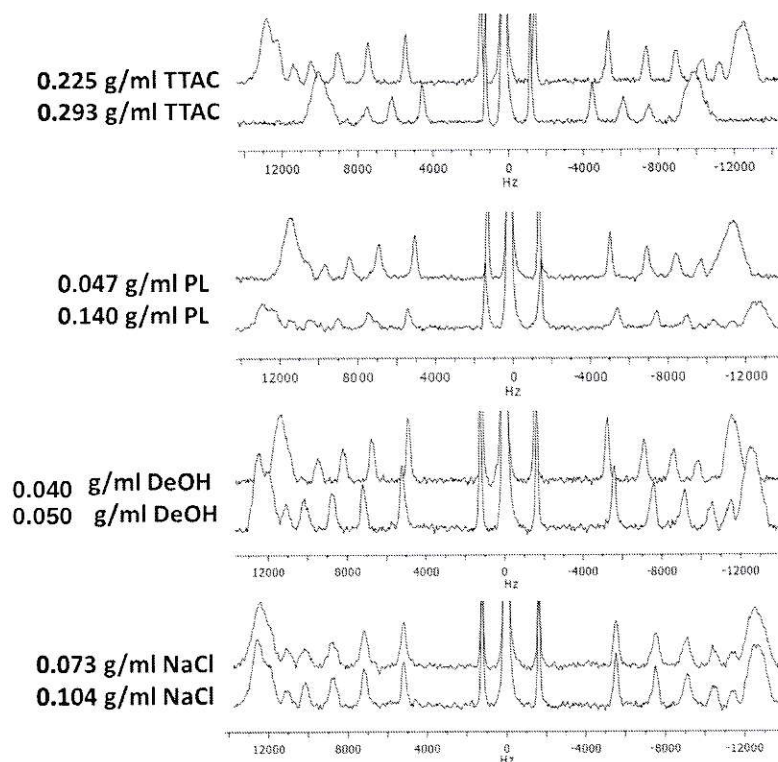


Figura 3.5: Espectros  $^2\text{H}$ -RMN de SDS- $\text{d}_{25}$  y DHO de los extremos de la fase.

esto para todos los extremos. También se observa que tanto el incremento de PL como el de DeOH tienen básicamente el mismo efecto sobre  $\Delta\nu_q$  y  $T_1$  de SDS- $\text{d}_{25}$ .  $\Delta\nu_q$  aumenta y  $T_1$  disminuye. En el caso de los  $\Delta\nu_q$  esto ocurre en los deuterios de los carbonos 1 al 6, mientras que para los deuterios de los carbonos 7 al 12 el efecto no es significativo. Para el caso de  $T_1$  esta disminución se observa a lo largo de todos los deuterios de la cadena, a excepción de los  $T_1$  de los deuterios del último carbono (carbono 12) cuando se aumenta DeOH, esto posiblemente porque al ser DeOH un alcohol de cadena corta, comparado con el resto de los anfífilos, su cambio de concentración debiera tener menos efectos en las regiones más internas del agregado con respecto al resto de los anfífilos y lípidos constituyentes del agregado. Esto está indicando que el alineamiento de las cadenas alifáticas con



.	0,225 g/ml TTAC muestra 1		0,293 g/ml TTAC muestra 2		0,047 g/ml PL		0,140 g/ml PL	
	$\Delta v_q$ (Hz)	$T_1$ (ms)	$\Delta v_q$ (Hz)	$T_1$ (ms)	$\Delta v_q$ (Hz)	$T_1$ (ms)	$\Delta v_q$ (Hz)	$T_1$ (ms)
Carbono								
1	25371	34,2	20153	45,9	22966	40,4	25792	35,4
2	25371	34,2	20153	45,9	22966	40,4	25792	35,4
3	25371	34,2	20153	45,9	22966	40,4	25792	35,4
4	25371	34,2	20153	45,9	22966	40,4	25792	35,4
5	25371	34,2	20153	45,9	22966	40,4	25792	35,4
6	25371	34,2	20153	45,9	22966	40,4	25792	35,4
7	22734	36,7	20153	45,9	22966	40,4	22812	38,7
8	20750	50,2	17386	45,9	19432	66,9	20988	43,3
9	18016	61,5	15054	69,5	16907	76,3	18101	56,2
10	14815	81,9	12371	186,8	13890	94,7	14919	71,7
11	10852	112,4	9046	120,4	10106	125,6	10893	103,4
12	2889	308,3	2383	309,9	2635	352,1	2885	289,4
DHO	18,8	338,9	28,7	317,7	5,8	365,5	26,2	331,4
.	0,040 g/ml DeOH		0,050 g/ml DeOH		0,073 g/ml NaCl		0,104 g/ml NaCl muestra 3	
	$\Delta v_q$ (Hz)	$T_1$ (ms)	$\Delta v_q$ (Hz)	$T_1$ (ms)	$\Delta v_q$ (Hz)	$T_1$ (ms)	$\Delta v_q$ (Hz)	$T_1$ (ms)
Carbono								
1	23142	37,9	25269	33,4	24983	34,6	25232	31,1
2	23142	37,9	25269	33,4	24983	34,6	25232	31,1
3	23142	37,9	25269	33,4	25232	34,6	25232	31,1
4	23142	37,9	25269	33,4	24983	34,6	25232	31,1
5	23142	37,9	25269	33,4	24983	34,6	25232	31,1
6	23142	37,9	25269	33,4	24983	34,6	24489	31,1
7	21182	41,2	22482	33,9	22468	33,5	22564	36,7
8	20988	54,6	20714	41,9	20562	50,3	20663	42,2
9	18101	59,0	17980	56,1	17831	58,5	17951	52,1
10	14919	75,3	14779	69,2	14689	80,3	14710	70,0
11	10893	111,9	10809	109,1	10723	110,3	10772	99,1
12	2888	289,5	2883	313,2	2865	307,4	2854	294,4
DHO	23,5	337,0	24,5	339,5	28,1	329,8	18,9	334,8

Tabla 3.1: Valores experimentales de  $\Delta v_q$  y  $T_1$  de SDS-d<sub>25</sub> y DHO de los extremos de la fase.

el campo magnético aumenta y consecuentemente su dinámica re-orientacional disminuye. Lo opuesto ocurre cuando aumentamos el TTAC, por lo que es muy probable que este cambio en el alineamiento de los anfifilos se deba al efecto espaciador de las especies no cargadas como PL y DeOH sobre TTA<sup>+</sup>, lo que disminuiría la repulsión entre estos últimos permitiendo así un mejor empaquetamiento de las cadenas y un mayor alineamiento.

Por otra parte la tabla 3.2 nos dice que el aumento tanto de PL como de DeOH disminuye  $\eta$ , disminuyendo 13,3 veces con el aumento de PL y 7,8 veces con el aumento de DeOH, esto presumiblemente porque los agregados se vuelven más pequeños. El aumento en TTAC produce un notorio aumento en la viscosidad, alrededor de 24 veces. Esto,



Muestra	$\eta$ (mPa · s)
0,225 g/ml TTAC	12.9 ± 0.1
0,293 g/ml TTAC	310 ± 4
0,047 g/ml PL	106.7 ± 0.8
0,140 g/ml PL	8.0 ± 0.2
0,040 g/ml DeOH	59.8 ± 0.4
0,050 g/ml DeOH	7.7 ± 0.1
0,073 g/ml NaCl	29.5 ± 0.2
0,104 g/ml NaCl	10.3 ± 0.1

Tabla 3.2:  $\eta$  de los extremos de la fase.

junto con  $\Delta v_q$ ,  $T_1$  (ver Tabla 3.1) y las fotografías de MOLP analizadas más adelante (ver Figura 3.6) indican que el aumento de DeOH y PL aparentemente tienen un efecto equivalente a una disminución de TTAC sobre nuestros sistemas, por lo que postulamos que es el cambio en la densidad de carga superficial de los agregados lo que estaría provocando un cambio en su tamaño. La idea de que los agregados disminuyan su tamaño para explicar la disminución de viscosidad al aumentar el contenido de PL y DeOH toma más sentido si analizamos  $\Delta v_q$  de DHO (ver Tabla 3.1), el cual aumenta tanto en el caso de PL como de DeOH. La disminución en el tamaño del agregado genera una mayor superficie de la interfase, de esta manera hay más superficie para orientar las moléculas de agua, incrementando de esta manera  $\Delta v_q$  de DHO. El hecho de que el aumento de  $\Delta v_q$  con el aumento de PL sea de 20,4 Hz y para el aumento de DeOH sea solo de 1 Hz, tiene una explicación a través del análisis de los gráficos de distribución radial de estas especies, ver Figura 3.14; de este análisis se desprende que la razón entre la primera esfera de solvatación de PL y DeOH es de 2,1, por lo que un aumento de PL ordena más moléculas de agua que un aumento de DeOH, contribuyendo esto a explicar la diferencia en el aumento de los  $\Delta v_q$  de DHO con el aumento de PL y DeOH.

El incremento de la fuerza iónica no afecta significativamente el orden y dinámica de los anfifilos, ver tabla 3.1, a pesar de esto,  $\eta$  disminuye aproximadamente 2,9 veces con

el aumento de contenido de NaCl, ver tabla 3.2. Se ha reportado en sistemas similares a los nuestros que un aumento en la fuerza iónica repercute en un incremento del tamaño de los agregados [78, 79]. Pero dada la disminución de viscosidad al aumentar el contenido de NaCl este no parece ser el caso. Si analizamos las fotografías MOLP al aumentar el contenido de NaCl (ver Figura 3.6) vemos que se induce un cambio de fase desde una textura Schlieren a “oily streak”, estas texturas más adelante veremos que se asocian a fases nemáticas con agregados bi-axiales y mono-axiales respectivamente. Entonces el incremento de NaCl cambia la estructura de un agregado bi-axial a uno mono-axial lo que reduce el radio hidrodinámico explicando el descenso de la viscosidad, esto aunque haya un posible aumento en el número de agregación.

Con respecto al TTAC, un incremento en un 30% p/p trae los resultados más interesantes tanto en  $\Delta v_q$  como en  $\eta$ . La disminución en más de 5 kHz en los  $\Delta v_q$  de los primeros  $CD_2$  al aumentar un 30% p/p el TTAC, podría ser explicado porque el incremento en la densidad de carga, producto del aumento de  $TTA^+$ , aumenta las repulsiones entre los mismos aumentando la movilidad, lo que disminuye el alineamiento, explicándose así la disminución de los desdoblamientos cuadrupolares y el aumento de los tiempos de relajación. Pero como se verá más adelante con asistencia de dinámica molecular y con valores de  $\eta$  obtenidos tanto experimental como teóricamente, postulamos que otros fenómenos intervienen en esta variación de  $\Delta v_q$  y  $T_1$ , relacionados con movimientos colectivos del agregado, que afectan la orientación y dinámica de los anfifilos y consecuentemente  $\Delta v_q$  y  $T_1$ . El notorio aumento de  $\eta$ , de unas 30 veces, cuando se aumenta 30% p/p el TTAC, se explica principalmente por el paso de un agregado mono-axial a uno bi-axial, tema que se ahondará más adelante.

En las imágenes MOLP de los extremos (Figura 3.6) se observa que para todos los casos, tanto para el cambio de contenido de TTAC, PL, DeOH y NaCl, aparecen dos tex-

turas: “oily streak” y Schlieren. Este cambio de textura manifiesta un cambio de fase para todos los casos. La textura de Schlieren aparece a bajas concentraciones de PL, DeOH o de NaCl, mientras que a mayor concentraciones aparece la textura “oily streak”, lo inverso ocurre con el TTAC. Este cambio de fase tiene que necesariamente surgir de un cambio en la morfología del agregado, pues la propiedad nemática se mantiene, como lo demuestran los perfiles de los espectros  $^2\text{H}$ -RMN (ver Figura 3.5).

Esta observación de cambios de textura sostiene aun más la explicación de que la densidad de carga de la superficie del agregado, por lo tanto el contenido de TTAC, estaría controlando la morfología del agregado, dado que el incremento de PL o DeOH sería equivalente a una disminución de TTAC, en cuanto al cambio en la densidad de carga superficial. Entonces, este cambio en la densidad de carga superficial es lo que estaría induciendo esta transición de fase observada por MOLP. Para más evidencia experimental de esta transición de fase, imágenes TEM de los extremos, salvo para los extremos de NaCl, fueron obtenidas, ver Figura 3.7. Los extremos de PL y de DeOH muestran imágenes similares a los extremos de TTAC, pero en orden inverso, corroborando la idea que la densidad de carga superficial del agregado estaría determinando su forma.

### 3.1.3. Cambio de fase.

La Figura 3.8 muestra  $\eta$  en función del contenido de TTAC. Como era de esperar se observa una clara dependencia de  $\eta$  con el contenido de TTAC, pero inesperadamente también se evidencia un cambio de pendiente. La concentración de TTAC a la cual la pendiente cambia coincide con el cambio de texturas de MOLP, lo que corrobora la existencia de un cambio de fase. Adicionalmente, la información entregada por las imágenes TEM (Figura 3.7), son congruentes con este cambio de pendiente del gráfico presentado en la Figura 3.8, esto porque en la imagen TEM para la muestra 1 (Figura 3.7, 0,225 g/ml



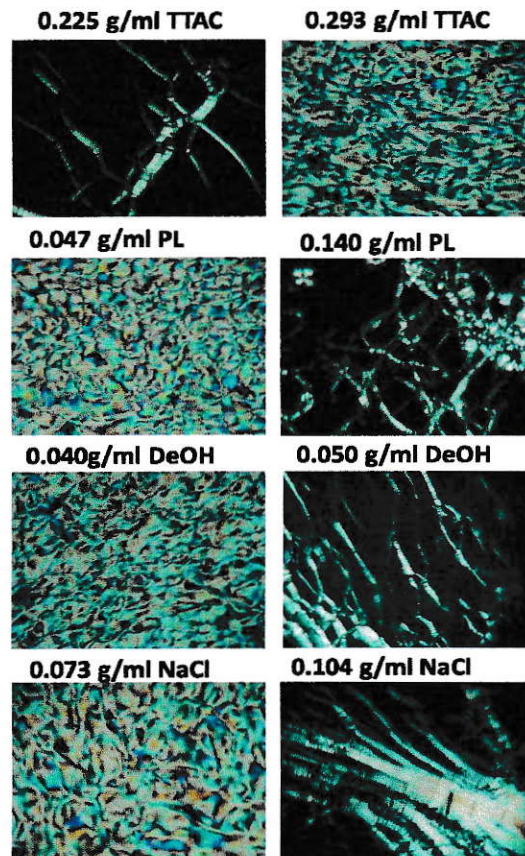


Figura 3.6: Texturas de MOLP de todos los extremos.

TTAC) se pueden apreciar agregados más bien circulares de un radio de 2 a 5 nm mientras que para la muestra 2 (Figura 3.7, 0,293 g/ml TTAC) se observan agregados alargados de entre 10 a 20 nm. De la comparación de ambas imágenes TEM y los datos anteriores se puede presumir que el cambio de fase evidenciado por MOLP, sería de una fase nemática discoidal mono-axial a una nemática elipsoidal bi-axial. Esto se sustenta con datos de simulación entregados por el programa HYDRO (sección 3.1.5). Como se dijo antes, esto sería congruente con el cambio de pendiente presentado en el gráfico de la Figura 3.8, pues



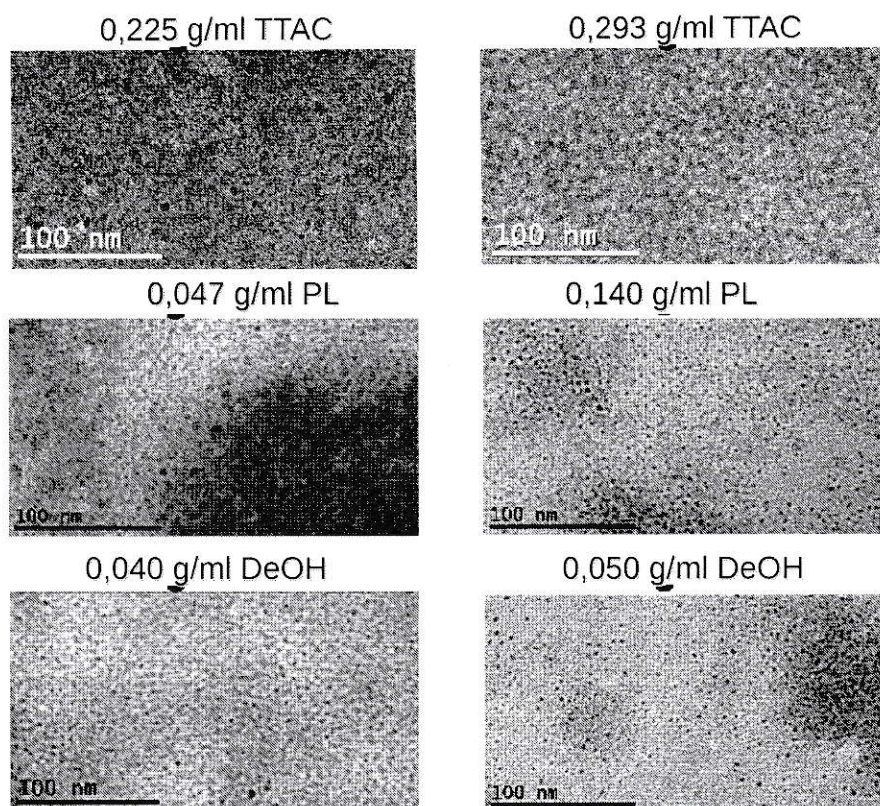


Figura 3.7: Imágenes TEM de las distintas fases observadas.

el aumento de tamaño de un disco mono-axial genera menos aumento de viscosidad que el aumento de tamaño y cambio de forma a un agregado bi-axial.

Para encontrar evidencia a nivel molecular que explique los cambios en la viscosidad, se hará un estudio detallado de dos variables que repercuten directamente sobre  $\eta$ : la flexibilidad, a través del cálculo del módulo de bending,  $k^b$ , y la forma de los agregados, a través de cálculos hidrodinámicos de la viscosidad.

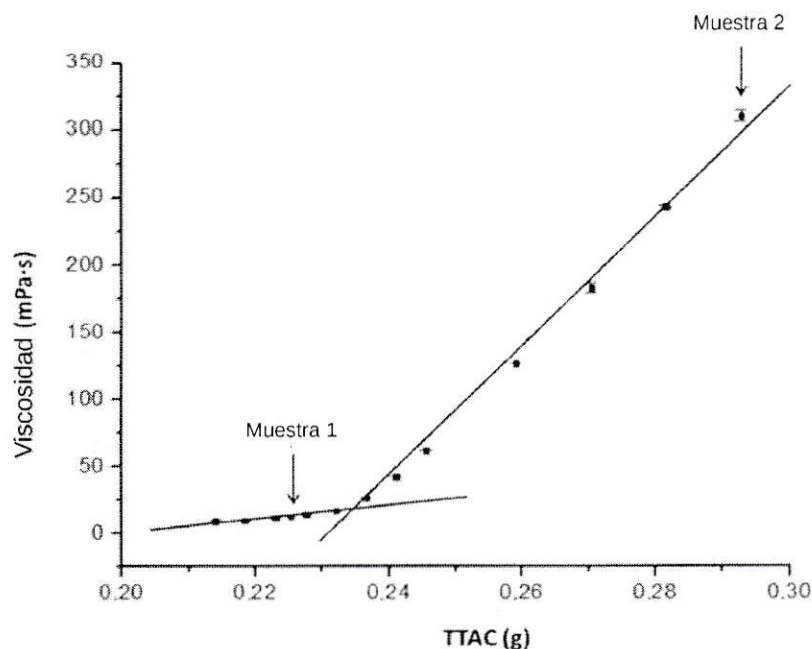


Figura 3.8:  $\eta$  en función del contenido de TTAC.

### 3.1.4. Cálculo del módulo de bending, $k^b$ .

En ciertas soluciones, como en las de macromoléculas o agregados moleculares, el incremento en la flexibilidad del soluto produce un aumento en la viscosidad de la solución. Esto se puede entender de la siguiente manera; un soluto rígido fluiría con una conformación orientada de la manera más óptima para disminuir el roce, mientras que en un soluto flexible, la flexión de esta conformación aumentará el roce, y considerando que la viscosidad es básicamente la resistencia a fluir, este aumento de roce producto de la flexibilidad del soluto generará un aumento de viscosidad con respecto a un soluto rígido. En este sentido, la flexibilidad del agregado molecular que constituye el cristal líquido fue estimada a través del cálculo del módulo de bending,  $k^b$ . Este término se relaciona en nuestro caso con

la energía necesaria para flectar la membrana. De esta manera mientras menor es  $k^b$  más flexible serán los agregados y por lo tanto más viscoso el sistema.  $k^b$  se define como [80]:

$$k^b = \frac{K_A \xi^2}{24} \quad (3.1)$$

$\xi$  es el grosor *efectivo* de la bicapa, definido por  $\xi = d - 1$  donde  $d$  es el grosor de la bicapa, que en nuestro caso es la distancia mínima entre los nitrógenos de los TTA<sup>+</sup> que se encuentren en caras opuestas de la bicapa.  $K_A$  representa el módulo de compresibilidad, que se define como:

$$K_A = \frac{k_B T A}{\sigma^2(A)} \quad (3.2)$$

Donde,  $A$  y  $\sigma(A)$  corresponden al promedio y a la desviación estándar del área que ocupa TTA<sup>+</sup> en el plano x-y, respectivamente.  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta. La tabla 3.3 muestra  $k^b$  calculado usando DM.

sistema	$A/(nm^2)$	$d/(nm)$	$K_A/(J/m^2)$	$k^b/(k_B T)$
1	$0.5361 \pm 0.0007$	3,7	$0.181 \pm 0.019$	$12.9 \pm 1.4$
2	$0.574 \pm 0.003$	2,6	$0.25 \pm 0.06$	$6.1 \pm 1.4$
3	$0.537 \pm 0.007$	3,8	$0.24 \pm 0.08$	$16 \pm 3$

Tabla 3.3:  $K_A$  y  $k^b$  para los tres sistemas simulados.  $A$  corresponde al promedio del área ocupado por los TTA<sup>+</sup> en el plano x-y y  $d$  es el grosor de la bicapa, que en nuestro caso es la distancia mínima entre los nitrógenos de los TTA<sup>+</sup> que se encuentren en caras opuestas de la bicapa. Los sistemas 1, 2 y 3 están descritos en la sección 2.5.1.

$k^b$  en los sistemas 1, 2 y 3 se obtuvo por DM. Los sistemas fueron descritos en la sección 2.5.1. Desafortunadamente no existen resultados experimentales para validar los resultados de  $k^b$  listados en la Tabla 3.3. Sin embargo, estos valores están en razonable acuerdo con valores experimentales obtenidos para otras bicapas lipídicas, que van de 15 a



$30 k_B T$ , empleando difracción de rayos-X, aspiración por pipetas, Espín Eco de Neutrones [81–85] y DM [86].

De los resultados de la Tabla 3.3 se observa una reducción de más del 50% en  $k^b$  con el aumento de 30% p/p TTAC, es decir, cuando se pasa del sistema 1 al sistema 2. Esto significa que la flexibilidad del agregado aumenta cuando aumenta el contenido de TTAC, lo que se condice con los resultados de viscosidad, ver Tabla 3.2. Es más, se observa que el incremento en la fuerza iónica (sistema 3), produce un aumento de  $k^b$  menor al 20%, esto relativo al sistema 1, por lo que como era de esperar, el incremento de la fuerza iónica aumenta solo moderadamente la rigidez de la bicapa, pudiéndose explicar también por esta vía la disminución de la viscosidad con el aumento de NaCl, ver Tabla 3.2. No podemos determinar cuanto está influyendo  $k^b$  en la viscosidad pues no existe una relación cuantitativa entre flexibilidad y viscosidad, pero lo más plausible es que los cambios en viscosidad sean por cambios de tamaño de los agregados acompañados de variaciones en la flexibilidad de los mismos.

Finalmente, de la Tabla 3.3 se puede deducir que el incremento en la flexibilidad cuando se aumenta el contenido de TTAC, o la disminución de  $k^b$ , radica en la reducción del grosor de la membrana, pues  $K_A$  y  $A$  permanecen casi invariantes en los tres sistemas. La disminución del grosor de la membrana es debido a la interdigitación de las colas hidrocarbonadas de  $\text{TTA}^+$  localizados en capas opuestas de la bicapa, fenómeno extensamente estudiado más adelante. El aumento de  $k^b$  con el aumento del contenido de sal, es atribuido básicamente al aumento de  $K_A$ .

### 3.1.5. Forma de los agregados.

Como ya hemos mencionado anteriormente, un factor que puede estar afectando los cambios en viscosidad es el paso de un agregado mono-axial a bi-axial. Para estudiar más



a fondo este fenómeno, trataremos de cuantificar el aumento de viscosidad con cambios de tamaño y forma, a través de una simulación de un agregado compuesto de esferas duras con el programa HYDRO, pero antes un breve repaso teórico.

La ecuación (3.3) de Solomon-Ciuta [87], nos da una relación entre la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  de un soluto y la viscosidad  $\eta$  de la solución. Esta ecuación se puede aplicar si la ecuación lineal de Huggins y la ecuación de Kraemer son ambas válidas [88]. En nuestro caso esto no se cumple a cabalidad, pero como obtendremos una relación que cancela las concentraciones esta ecuación puede ser aplicada, considerando además que en nuestro caso lo importante es el resultado cualitativo y comparativo, en ningún caso cuantitativo. Esta ecuación se puede expresar de la siguiente manera:

$$[\eta] = \frac{(2 * (\eta_{sp} - \ln \eta_r))^{1/2}}{c} \quad (3.3)$$

Aquí  $[\eta]$  es la viscosidad intrínseca (o viscosidad a dilución infinita),  $\eta_{sp}$  es la viscosidad específica de una solución de bicelas a una concentración  $c$  (en este caso  $c$  corresponde a la concentración de agregados) y  $\eta_r$  es la viscosidad relativa calculada de la razón,  $\eta_r = \eta/\eta_0$ , siendo  $\eta_0$  la viscosidad del solvente.

Por lo tanto, la viscosidad específica,  $\eta_{sp}$ , de una cierta solución puede expresarse como,  $\eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 = \eta_r - 1$ , entonces la viscosidad intrínseca adopta la siguiente forma:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_r - 1}{c} \quad (3.4)$$

La viscosidad intrínseca,  $[\eta]$ , nos entrega información de la forma y flexibilidad de las especies disueltas, como polímeros, macromoléculas, nano partículas, agregados o coloides [89, 90]. Por lo anterior, la ecuación de Solomon-Ciuta puede ser reformulada de la siguiente manera:

$$[\eta]c = (2 * (\eta_{sp} - \ln \eta_r))^{1/2} \quad (3.5)$$

La razón entre la viscosidad intrínseca de dos cristales líquidos con diferentes contenidos de TTAC puede ser calculada por la ecuación 3.6:

$$\frac{[\eta]_2 c_2}{[\eta]_1 c_1} = \frac{(2 * (\eta_{sp,2} - \ln \eta_{r,2}))^{1/2}}{(2 * (\eta_{sp,1} - \ln \eta_{r,1}))^{1/2}} \quad (3.6)$$

De los resultados de las microscopías TEM (ver Figura 3.3) se determinó que los agregados al aumentar sólo el 30 % p/p TTAC aumentan su tamaño unas 10 veces, por lo tanto podemos asumir que  $c_1 \cong 10c_2$ , y estableciendo que  $\eta_0$  es la viscosidad del agua pura a 298 K ( $\eta_0 = 1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ),  $\eta_1 = 12,9 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  y  $\eta_2 = 310,2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  para las muestras 1 y 2 respectivamente, la ecuación 3.6 se reduce a la siguiente expresión:

$$\frac{[\eta]_2}{[\eta]_1} = 57,0 \quad (3.7)$$

En general, la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  depende de la forma, tamaño y flexibilidad de la macromolécula o coloide en solución. Dado que la flexibilidad de los agregados ya fue estudiada, en los siguientes cálculos solo la forma y tamaño del agregado serán considerados.

En este punto, el objetivo principal es reproducir la razón entre la viscosidad intrínseca de un cristal líquido con diferentes contenidos de TTAC, usando cálculos de hidrodinámica basados en agregados moleculares de diferentes tamaños y formas.

Para esto se ocupó el programa HYDRO [91], el cual permite calcular viscosidades intrínsecas adimensionales (disponible en <http://leonardo.inf.um.es/macromol>). Se construyó un modelo compuesto por 2 capas de 244 esferas duras cada una, formando una estructura mono-axial circular, como la mostrada en la Figura 3.9. Para este modelo una

viscosidad intrínseca de 1,39 fue calculada. A continuación se repiten los cálculos para el sistema 2, para dos formas diferentes, circular y elíptica (con una relación de sus semi-ejes  $a/b = 20$ ). Ambas formas con 2440 esferas duras. De estos cálculos se obtiene que  $[\eta]_{2,circular}^* = 6,25$  y  $[\eta]_{2,eliptica}^* = 75$ , dando una relación  $[\eta]_{2,circular}^*/[\eta]_{1,circular}^* = 4,5$  y  $[\eta]_{2,eliptica}^*/[\eta]_{1,circular}^* = 54$ , siendo esta última relación la que refleja mejor la relación  $[\eta]_2/[\eta]_1 = 57,0$ . De estos cálculos, se puede decir que el incremento en el contenido de TTAC, no sólo aumenta el tamaño, sino que también induce cambios en la forma del agregado que forma el cristal líquido, pasando de una simetría circular a una elíptica, en otras palabras de mono-axial a bi-axial, incrementando así la viscosidad. Se preserva, sin embargo, la estructura de bicapa.

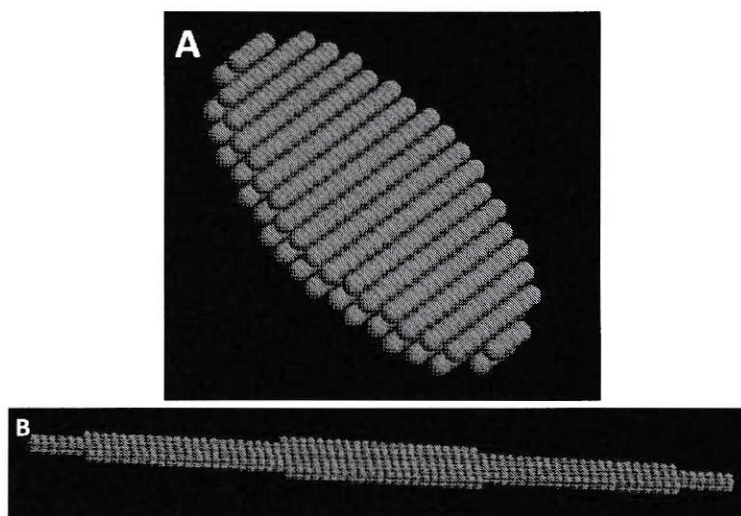


Figura 3.9: Modelos hidrodinámicos usados en la estimación de  $[\eta]$ . A) Círculo y B) elipse con  $a/b=20$ .

### 3.1.6. Desdoblamientos cuadrupolares, $\Delta\nu_q$ , simulados.

La Tabla 3.1 muestra los valores de  $\Delta\nu_q$  de SDS-d<sub>25</sub> disuelto en las muestras 1, 2 y 3 (para detalles de la composición de las muestras ver sección 2.1). Esta Tabla muestra como los  $\Delta\nu_q$  de SDS-d<sub>25</sub> disminuyen significativamente con el incremento del contenido de TTAC (muestra 2). Esto indica una significativa disminución en el alineamiento de las cadenas alifáticas con el campo magnético, que puede ser debido a repulsiones electrostáticas entre las cabezas cargadas de los amonios, entre otras razones. Por otra parte el incremento en un 15% p/p de NaCl (muestra 3) presenta un leve aumento en los  $\Delta\nu_q$  experimentales, que podría deberse al aumento del efecto de apantallamiento de los iones para con los TTA<sup>+</sup>, lo que contribuye al orden de la interfase con un consecuente aumento de los  $\Delta\nu_q$ . Pero este efecto del aumento de la fuerza iónica es poco significativo, mostrando que la integridad de los agregados en nuestros sistemas no depende en mayor medida de la concentración salina.

Los valores de  $\Delta\nu_q$  obtenidos por <sup>2</sup>H-NMR están relacionados con el parámetro de orden de deuterio,  $S_{CD}$ , por la siguiente expresión:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3C \langle S_{CD} \rangle}{2} \quad (3.8)$$

$C$  es la constante de acoplamiento cuadrupolar ( $C = 170 \text{ kHz}$  [92]), y  $S_{CD}$  es el parámetro de orden de un dado enlace  $C - D$ . El parámetro de orden puede ser directamente obtenido de las simulaciones usando la siguiente ecuación:

$$\langle S_{CD} \rangle = \frac{\langle 3 \cos^2 \phi - 1 \rangle}{2} \quad (3.9)$$

Aquí  $\phi$  es el ángulo entre el enlace  $C - D$  y el plano de la interfase, y el promedio se obtiene a lo largo de la simulación y entre todas las moléculas idénticas del ensamble. Sin



embargo, teniendo en cuenta que los hidrógenos de los grupos metilenos no fueron considerados explícitamente en las diferentes moléculas que componen la bicapa, ver sección 2.5.2, el parámetro de orden correspondiente a un dado enlace  $C - D$  puede ser calculado empleando una metodología bien descrita [60, 66], exceptuando los parámetros de orden de  $C - D$  para el último carbono,  $C_{12} - D$ , que no se pueden obtener.

La Tabla 3.4 muestra los  $\Delta v_q$  obtenidos por DM, correspondientes a los sistemas 1, 2 y 3 (descritos en sección 2.5.1), que son las correspondientes representaciones de las muestras 1, 2 y 3 (sección 2.1).

Carbono	Sistema 1 $\Delta v_q (Hz)$	Sistema 2 $\Delta v_q (Hz)$	Sistema 3 $\Delta v_q (Hz)$
1	25467±525	24975±816	24183 ± 391
2	25639±663	25596±844	25483 ± 589
3	26260±670	26415±1110	26721 ± 559
4	26651±678	26414±1254	27390 ± 583
5	26858±716	26949±1360	27600 ± 622
6	26652±659	27162±1354	27566 ± 692
7	25699±647	27067±1439	27299 ± 717
8	25268±619	26755±1390	26864 ± 690
9	23572±568	26091±1388	26019 ± 711
10	20904±410	24831±1236	24489 ± 586
11	16389±223	22688±1020	21038 ± 557

Tabla 3.4: Valores de  $\Delta v_q$  obtenidos por DM. Sistemas 1, 2 y 3 descritos en sección 2.5.1.

La comparación entre los valores de  $\Delta v_q$  experimentales (Tabla 3.1) y simulados (Tabla 3.4), muestra un acuerdo entre la muestra 1 y el sistema 1 para los  $\Delta v_q$  de los primeros carbonos de la cadena alifática, cercanos a la interfase, no así para los últimos. Esta discrepancia puede originarse tanto porque la simulación corresponde a un fragmento de la bicapa, omitiéndose de esta manera el efecto de la curvatura del agregado, especialmente importante en agregados pequeños, o bien por impurezas apolares en el PL que podrían perturbar el centro hidrofóbico, donde están estos últimos carbonos.

Los valores de  $\Delta v_q$  a lo largo de la cadena de SDS-d<sub>25</sub> no son significativamente alterados con un incremento en la fuerza iónica, como lo muestran los  $\Delta v_q$  de muestra 1 y

3 en la Tabla 3.1. Esto se refleja en los  $\Delta v_q$  obtenidos de la simulación del sistema 3, los cuales no cambian significativamente entre los sistemas 1 y 3, ver Tabla 3.4, al igual que ocurre experimentalmente entre las muestras 1 y 3.

Donde existe una clara discrepancia entre los  $\Delta v_q$  experimentales y simulados, es entre la muestra 2 y el sistema 2. El sistema 2 no refleja los datos experimentales, es más, comparado con el sistema 1  $\Delta v_q$  no cambian significativamente para los primeros carbonos y aumentan para los últimos, es decir, el aumento de TTAC en nuestras simulaciones no tuvo repercusiones en los  $\Delta v_q$  de los primeros y si en los últimos, siendo que experimentalmente el mismo aumento disminuye un 19% los  $\Delta v_q$  de los primeros carbonos, y los últimos también se ven disminuidos, pero cada vez menos, a medida que nos acercamos al centro de la bicapa. Esta discrepancia entre los datos experimentales de la muestra 2 y los de simulación del sistema 2, puede ser explicada por cambios en la forma y flexibilidad de los agregados con el incremento del contenido de TTAC, como se determinó en las secciones 3.1.4 y 3.1.5. De esta manera, el incremento en tamaño y el cambio en la geometría del agregado de mono-axial a bi-axial que junto al aumento de flexibilidad, tras el aumento de TTAC, podrían estar propiciando movimientos colectivos a lo largo del agregado, similares a las ondulaciones presentes en fases lamelares, que podrían estar aumentando la movilidad de todos los enlaces  $C - D$ , disminuyendo de esta manera los  $\Delta v_q$  sin verse afectada la orientación promedio. Para explorar el efecto de estas ondulaciones en  $\Delta v_q$ , se vio en el sistema 2, como diferentes inclinaciones entre los enlaces  $C - D$  con el campo magnético afectan  $\Delta v_q$ , los resultados se presentan en la Tabla 3.5. Se observa que una desviación en el ángulo de  $\simeq 15^\circ$ , como el representado en la Figura 3.10, es suficiente para reducir  $\Delta v_q$  a valores cercanos a los experimentales, por lo tanto, ondulaciones con oscilaciones de  $15^\circ$  de amplitud alrededor de la orientación promedio, debieran ser suficientes para explicar la disminución experimental de  $\Delta v_q$  entre las muestras 1 y 2. Este resultado

evidencia que a la hora de interpretar los cambios de  $\Delta v_q$  en estos sistemas, es importante considerar factores tales como el tamaño, geometría y flexibilidad del agregado, además de cambios en la interfase o dinámica interna del mismo.

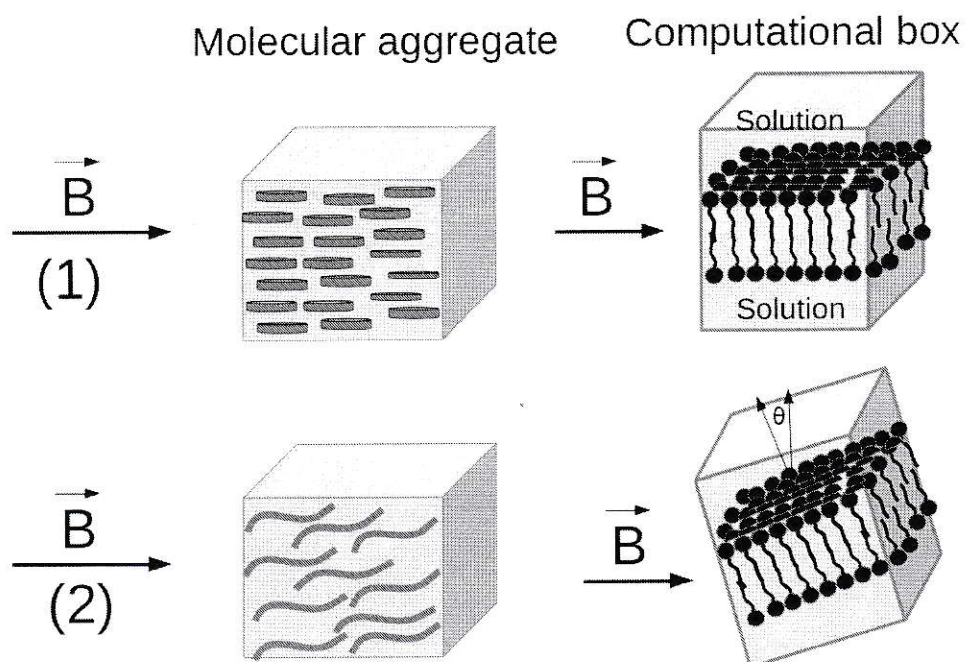


Figura 3.10: Orientación del agregado con respecto al campo magnético,  $\vec{B}$ . (1) Representa la orientación de agregados rígidos con simetría discoidal bajo un campo magnético. (2) Representa la orientación de agregados flexibles de simetría discoidal alargada bajo un campo magnético.

A continuación se presenta una serie de estudios de DM, donde se ahondará en los fenómenos de superficie enfocados principalmente en los sistemas 1 y 2, de manera de entender mejor las diferencias entre las muestras 1 y 2.



Carbono	$(\Delta v_q(Hz))^a$	$(\Delta v_q(Hz))^b$	$(\Delta v_q(Hz))^c$	$(\Delta v_q(Hz))^d$
1	24183 ± 391	21302±1211	18440±1425	14845±1718
2	25483 ± 589	22557±1354	19603±1575	15917±1882
3	26721 ± 559	23633±1268	20525±1465	16645±1752
4	27390 ± 583	24229±1253	21048±1455	17080±1755
5	27600 ± 622	24448±1237	21235±1433	17226±1726
6	27566 ± 692	24381±1231	21178±1423	17183±1720
7	27299 ± 717	24132±1246	20955±1436	16943±1724
8	26864 ± 690	23733±1199	20599±1393	16695±1681
9	26019 ± 711	22960±1183	19910±1368	16115±1646
10	24489 ± 586	21596±1123	18720±1298	15146±1561
11	21038 ± 557	18524±1063	16036±1217	12942±1443

Tabla 3.5: Valores de  $\Delta v_q$  del sistema 2 a diferentes inclinaciones de la caja computacional con respecto al eje Z: (a) 0 °, (b) 10 ° (c) 15 ° and (d) 20 °.

### 3.1.7. Dinámica rotacional del agua.

Para obtener información acerca de la dinámica rotacional del momento dipolar eléctrico del agua cerca de la interfase del cristal líquido, tiempos de correlación rotacional a diferentes distancias del centro de la bicapa fueron estimados definiendo láminas paralelas de igual grosor a diferentes distancias de la interfase. El tiempo de correlación rotacional fue calculado basándose en que cada molécula de agua es asignada a una cierta lámina. De esta manera se calculó los valores de los tiempos de correlación rotacional desde la interfase hasta la solución acuosa en los sistemas 1, 2 y 3

En general, la dinámica re-orientacional del momento dipolar del agua puede ser descrita por la función de correlación rotacional, la cual puede ser formulada en términos del primer polinomio de Legendre.

$$\langle P_1(t) \rangle = \langle \vec{\mu}(0)\vec{\mu}(t) \rangle \quad (3.10)$$

Donde  $\vec{\mu}(0)$  y  $\vec{\mu}(t)$  corresponden a la orientación del momento dipolar del agua separados por un intervalo de tiempo t.

$\langle P_1(t) \rangle$  puede ser ajustada a una función multi-exponencial como sigue:



$$\langle P_1(t) \rangle = \sum_{i=1}^3 a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (3.11)$$

Aquí  $a_i$  y  $\tau_i$  corresponden a diferentes amplitudes y tiempos de correlación asociados con la re-orientación anisótropa del dipolo del agua.

Como  $a_i$  y  $\tau_i$  no son uni-valuados, un  $\tau_{eff}$ , independiente del ajuste, debe ser definido, por lo cual  $\tau_{eff}$  es definido como sigue [93]:

$$\tau_{eff} = \frac{\sum_{i=1}^3 a_i \tau_i}{\sum_{i=1}^3 a_i} \quad (3.12)$$

La Figura 3.11 muestra los mejores ajustes de  $\langle P_1(t) \rangle$  en función del tiempo, a diferentes distancia del centro de la bicapa, para los sistemas 1 y 2. Entonces, de un ajuste multi-exponencial,  $\tau_{eff}$  a diferentes distancias de la interfase pueden ser calculados. La Figura 3.12 muestra  $\tau_{eff}$  del momento dipolar del agua para los sistemas 1, 2 y 3, a diferentes distancias de la interfase y se puede apreciar como  $\tau_{eff}$  incrementa abruptamente cuando el agua se aproxima a la interfase. Esto se debe al hecho de que el agua en la interfase se coordina con átomos de PL, DeOH y TTAC, introduciendo restricciones a la movilidad. Esta Figura también nos muestra como  $\tau_{eff}$  disminuye un orden de magnitud cuando pasa de la interfase a la solución acuosa y como este cambio es menor para el sistema 2 que para el sistema 1. Esta disminución de  $\tau_{eff}$  con el incremento en TTAC, se asocia a la relativa disminución del contenido de PL, dado que el agua se coordina preferentemente con PL, por lo mismo, como el sistema 3 tiene la misma cantidad de PL que el sistema 1, estos presentan comportamientos similares con respecto a  $\tau_{eff}$ .

Para asegurar que la simulación nos entrega una buena representación de la dinámica del solvente, los valores medidos de  $T_1$  para DHO de las muestras 1,2 y 3 son comparados con los valores obtenidos de las simulaciones. La teoría de Redfield relaciona  $T_1$  con el

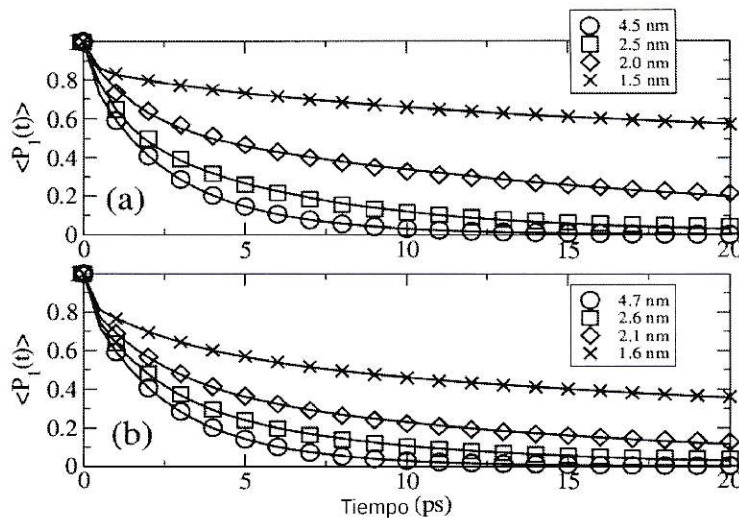


Figura 3.11:  $\langle P_1(t) \rangle$ , en función del tiempo para (a) sistema 1 y (b) sistema 2, a diferentes distancias del centro de la bicapa. Los puntos representan valores obtenidos por simulación, y la línea sólida es la regresión obtenida de un ajuste a una función multi-exponencial.

tiempo de correlación rotacional y con el gradiente de campo eléctrico experimentado por el núcleo de la siguiente manera [94]:

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{3}{80}\right) \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \left[\frac{2\pi eQ}{h} \frac{\partial^2 V}{\partial z^2}\right]^2 (J(\omega_0) + 4J(2\omega_0)) \quad (3.13)$$

Donde  $J(\omega_0)$  es la densidad espectral. La ecuación 3.13 puede ser evaluada usando  $\tau_{eff}$  anteriormente calculado. El gradiente de campo eléctrico es axialmente simétrico a lo largo del enlace  $O - D$ , ( $\eta = 0.00$ ), el término en paréntesis cuadrado es la constante de acoplamiento cuadrupolar en unidades de frecuencia angular, 308 kHz para el enlace  $O - D$ , y  $\omega_0$  es la frecuencia de Larmor. Es más, asumiendo que la función de correlación rotacional es un decaimiento mono-exponencial, el valor de  $T_1$  puede ser fácilmente calculado [94].  $T_1$  del DHO medidos fueron de 339 ms, 318 ms y 334 ms para las muestras

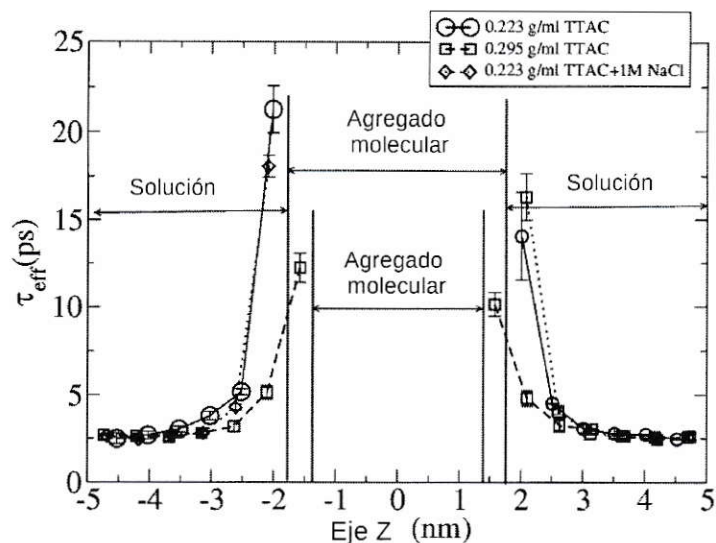


Figura 3.12: Tiempo de relajación del momento dipolar del agua para los tres casos estudiados, en función de la distancia desde el centro de la bicapa,  $Z = 0$ .

1, 2 y 3, respectivamente. Estos valores concuerdan con los valores calculados de la simulaciones de 290 ms, 265 ms y 270 ms para la solución acuosa de los sistemas 1, 2 y 3. Por lo tanto las simulaciones representan adecuadamente la dinámica del solvente.

### 3.1.8. Coeficiente de difusión traslacional del agua, $D_t$ .

Para proveer información de como la difusión del agua se ve afectada por la interfase, se calculó  $D_t$  dentro de laminas del mismo grosor en el plano-xy a diferentes distancias del centro de la bicapa, metodología similar a la empleada en la sección anterior.  $D_t$  puede ser calculado del cuadrado del desplazamiento medio de la siguiente manera:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle r^2(t) \rangle = 2n \cdot D_t^{xy} \cdot t \quad (3.14)$$

Donde  $n$  es número de grados de libertad, dos en nuestros caso,  $r^2$  es el cuadrado del

desplazamiento paralelo al plano-xy y  $t$  es el tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 3.13. El sistema 3 se omite por no mostrar diferencias con el sistema 1.

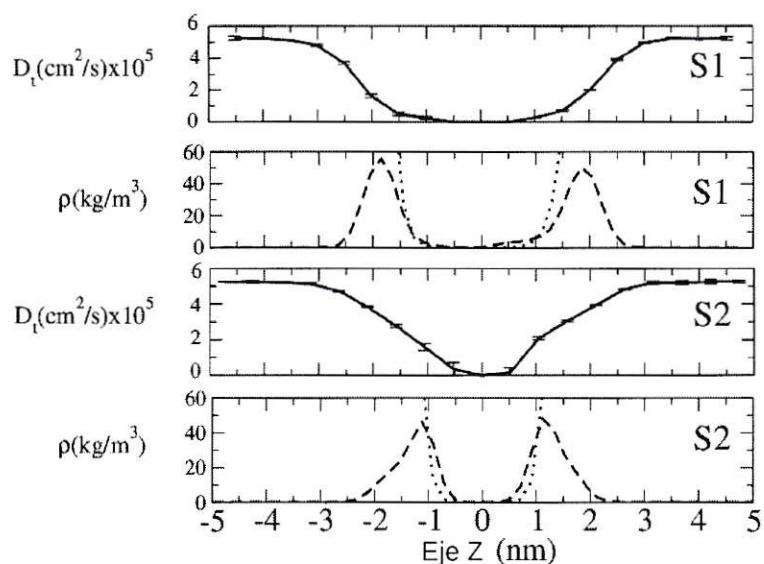


Figura 3.13: Coeficiente de difusión traslacional del agua,  $D_t$  (línea sólida), densidad del agua (línea punteada) y la distribución del nitrógeno de TTAC (línea entrecortada) desde la solución acuosa hasta el interior de la bicapa. (S1) sistema 1, (S2) sistema 2.

La Figura 3.13 muestra valores calculados de  $D_t$  de alrededor de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , cerca de la interfase, hasta  $5,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  en la solución acuosa. Estos valores se condicen con valores experimentales y de simulación. Valores de  $D_t$  que van desde  $2,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  a  $2,74 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  se han medido usando  $^1\text{H-RMN}$  [95] y  $^2\text{H-RMN}$  [96]. En simulación, con el modelo SPC, se han reportado valores de  $D_t = 7,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  para agua isotrópica [66].

En zonas más cercanas a la interfase,  $D_t$  baja a un quinto de su valor en la solución acuosa. Esta disminución se atribuye a que a medida que el agua se acerca a la interfase aumenta el carácter de agua de solvatación por sobre el carácter de agua libre. La Figura 3.13 también muestra que el grosor del dominio hidrofóbico disminuye de manera im-



portante con el aumento de TTAC, haciendo que los perfiles de  $D_t$  de los sistemas 1 y 2 sean diferentes. Como vimos en secciones anteriores, este adelgazamiento de la bicapa está asociado al fenómeno de inter-digitación de las cadenas alifáticas del TTAC de caras opuestas de la bicapa, cuando se aumenta el TTAC, fenómeno ahondado en la sección 3.1.10.

Además de la explicación anterior para las diferencias entre los perfiles de  $D_t$  correspondientes a los sistemas 1 y 2, existe otro factor que podría estar influyendo, que es la diferencia en la solvatación de las distintas especies que forman el agregado. De manera que se hizo un estudio de las aguas que coordinan PL, DeOH y TTA<sup>+</sup> a través del cálculo de funciones de distribución radial,  $g(r)$ , definida como:

$$g(r) = \frac{N(r)}{4\pi r^2 \rho \partial r} \quad (3.15)$$

Aquí  $N(r)$  es el número de átomos en un lámina esférica de grosor  $\partial r$  a una distancia  $r$  de un origen determinado, y  $\rho$  es la densidad macroscópica, calculada como la razón entre la masa de todos los átomos y el volumen de la caja de simulación. La Figura 3.14 muestra algunos de estos gráficos. Se observa que PL es la especie que coordina más moléculas de agua, por lo que la disminución de la concentración de PL al aumentar TTAC debiera cambiar los perfiles de  $D_t$ , como efectivamente ocurrió.

### 3.1.9. Esferas de hidratación de Cloro y Sodio.

Otro aspecto relacionado con la estabilidad de los cristales líquidos es la solvatación de los iones y el proceso de deshidratación cuando se acercan a la interfase. En este contexto se estudio la solvatación de sodio y cloro a diferentes distancias del centro de la bicapa, con una metodología similar a la de las secciones 3.1.7 y 3.1.8. De la integración de las funciones de distribución radial de agua alrededor de estos iones se puede estimar

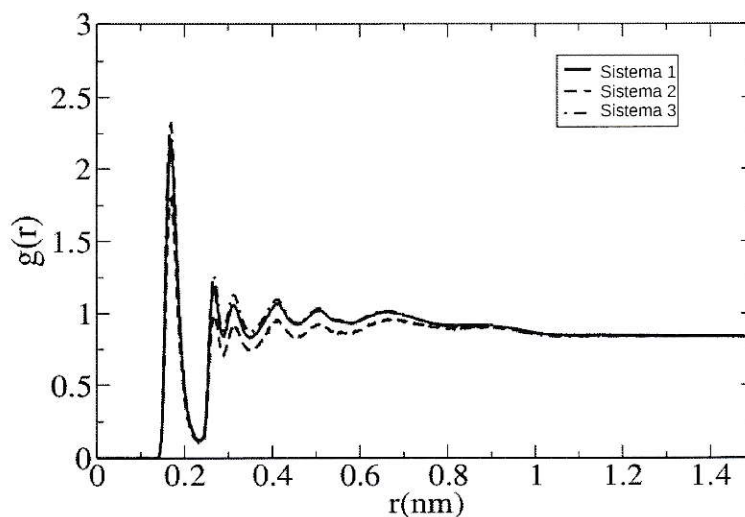


Figura 3.14: Funciones de distribución radial del agua alrededor del oxígeno de los fosfatos de DOPC correspondientes al sistema 1, 2 y 3.

el número de hidratación de los mismos.

La Figura 3.15 muestra los resultados de este estudio para el sodio. Los números de hidratación en la solución acuosa son  $5,00 \pm 0,02$  para el sistema 1 y  $4,90 \pm 0,01$  para el sistema 2. Estos valores concuerdan con valores obtenidos por difracción de rayos-X y por simulación, que van de 4 a 6 moléculas de agua alrededor del sodio [97]. La Figura 3.15 también muestra como en ambos sistemas el acercamiento de sodio a la interfase le significa una deshidratación de casi un 50%.

La Figura 3.16 muestra el número de hidratación de cloro desde la solución acuosa hasta el centro de la bicapa para los sistemas 1 y 2, siendo para la solución acuosa de  $7,98 \pm 0,04$  y  $8,06 \pm 0,03$  para los sistemas 1 y 2, respectivamente. Estos valores concuerdan con datos experimentales medidos con difracción de rayos-X [98] y difracción

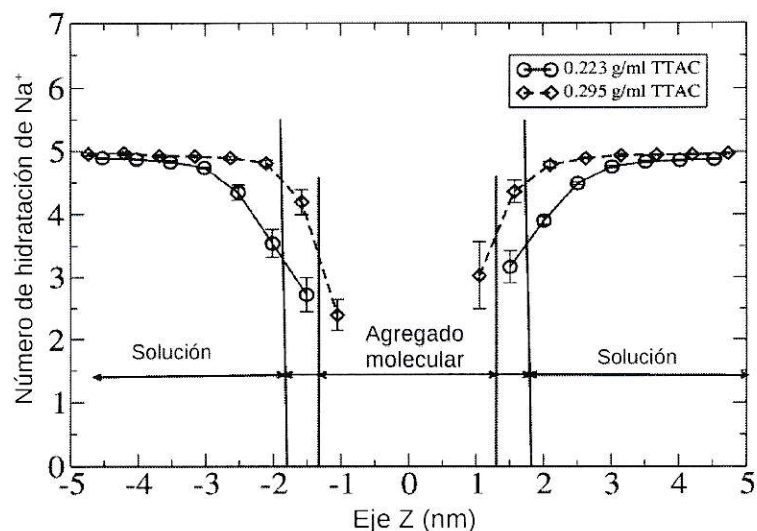


Figura 3.15: Número de hidratación de sodio desde la solución acuosa hasta el centro de la bicapa para los sistemas 1 y 2.

de neutrones [99–101], así como también con valores obtenidos por simulación [97, 102], donde los números de hidratación van de 5,2 a 7,4. En todos los casos estudiados, los iones pierden completamente su esfera de hidratación cuando pasan al dominio hidrofóbico del centro de la bicapa. La Figura 3.16 también refleja el comportamiento experimental del número de coordinación de cloro cuando se incrementa la fuerza iónica, disminuyendo un 11 % [103]. En nuestro caso el número de hidratación se redujo un 9% con un incremento de 1M en la concentración de sal.

### 3.1.10. Estructura de la bicapa.

En esta sección exploraremos con más detalle los efectos del contenido de TTAC en la estructura misma de la bicapa. La Figura 3.17 muestra los perfiles de densidad de  $\text{TTA}^+$  a lo largo del eje Z, eje perpendicular a la superficie de la bicapa. Se observa que el sistema

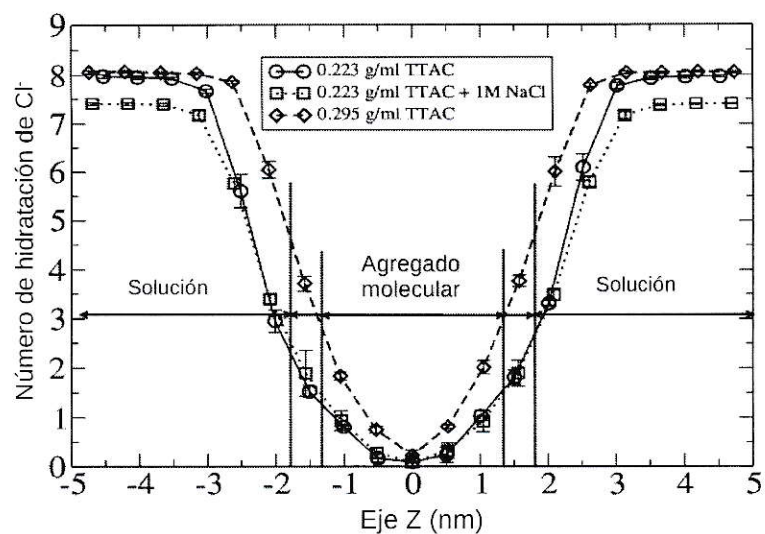


Figura 3.16: Número de hidratación de cloro desde la solución acuosa hasta el centro de la bicapa para los sistemas 1 y 2.

El gráfico muestra poco solapamiento de las cadenas hidrocarbonadas de capas opuestas, como se deduce del valle en el centro del gráfico. Este perfil contrasta con el del sistema 2, donde se observa un máximo de densidad de  $\text{TTA}^+$  en el centro de la bicapa, además de ser un perfil más estrecho. Estas observaciones claramente indican una inter-digitación de las cadenas alifáticas de los  $\text{TTA}^+$  de caras opuestas de la bicapa. Este fenómeno, aparentemente energéticamente desfavorable puesto que se están acercando cargas del mismo signo, se entiende si hacemos un análisis basado en interacciones electrostáticas y Lennard-Jones. El incremento del contenido de TTAC en un 30% p/p produce un incremento en las repulsiones electrostáticas, como era de esperarse, de 113 kJ/mol a 312 kJ/mol, pero este incremento de energía es ampliamente compensado por una mejor compactación de las cadenas alifáticas de  $\text{TTA}^+$ , lo que cambia las interacciones de Lennard-Jones desde -4157 kJ/mol a -6460 kJ/mol. Cabe mencionar que la sumatoria de las interacciones de



Lennard-Jones concentradas entre las cadenas de los anfifilos de los  $\text{TTA}^+$  son mayores que la sumatoria de las interacciones coulombicas porque las cadenas de los anfifilos se encuentran muy cercanas entre si y son un grupo lo suficientemente extenso (14 carbonos) como para superar las repulsiones electroestáticas producto de la carga de esta molécula.

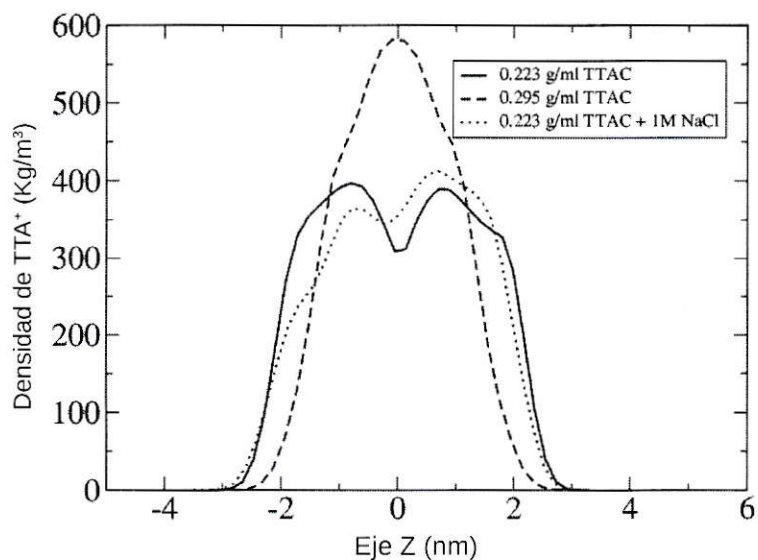


Figura 3.17: Densidad de  $\text{TTA}^+$  a lo largo del eje Z para los sistemas 1 y 2.

Otro importante aspecto a nivel estructural de la bicapa se aprecia en la Figura 3.18, donde esta imagen del plano de la superficie de la bicapa del sistema 1 revela la aparición de aglomerados moleculares, conocidos como balsas lipídicas, en este caso formados solo por PL. Cabe hacer notar que en el inicio de la simulación la disposición de las diferentes especies que conforman la bicapa fue completamente aleatoria, la imagen de la Figura 3.18 fue obtenida tras 160 ns de simulación. Con el ánimo de encontrar una justificación termodinámica a la aparición de estas balsas lipídicas, se hizo un cálculo del potencial de fuerza media (PFM) correspondiente a la inserción de DOPC en dos sistemas ideales, el primero consistente en un sistema idéntico al sistema 1 pero sin TTAC, y el segundo en un

sistema solo con TTAC. PFM a diferentes distancias del centro de la bicapa se utilizó para estimar la espontaneidad del proceso con la siguiente relación:

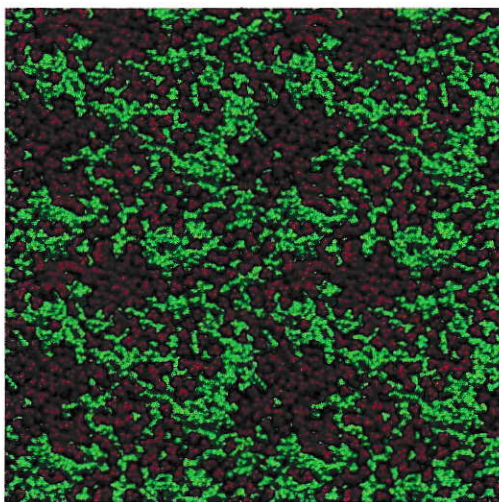


Figura 3.18: Imágenes del plano-xy del sistema 1 tras 160 ns de trayectoria. Las áreas rojas corresponden a aglomerados de lípidos.

$$\Delta G(z) = -RT \ln \frac{c_i(z)}{c_i^0} = PMF \quad (3.16)$$

Aquí  $\Delta G(z)$  es la diferencia entre la energía libre de la solución acuosa y su valor en cierta posición  $z$ , a lo largo del eje perpendicular a la interfase.  $R$  es la constante de los gases,  $T$  la temperatura absoluta,  $c_i(z)$  la concentración de DOPC en la posición  $z$ , y  $c_i^0$  la concentración de DOPC en la solución acuosa. Debido al muestreo incompleto, los perfiles de  $c_i(z)$  no pueden ser obtenidos directamente de una simulación de DM normal, sin embargo, usando las metodologías “Umbrella” [104] y WHAM [105], tales como han sido descritas en trabajos anteriores [93, 106–108], PFM puede ser estimado. Para mejorar el muestreo, dos moléculas de DOPC fueron introducidos en ambos sistemas, una en

la solución acuosa, a una distancia de 3,9 nm del centro de la bicapa, y la otra ubicada justo en el centro de la bicapa. Luego ambas moléculas de DOPC fueron simultáneamente desplazadas a lo largo del eje Z manteniendo la distancia entre ellas. El movimiento del centro de masa de cada molécula fue sujeto a una restricción en el eje Z usando un potencial armónico de  $3000N \cdot nm^{-2} \cdot mol^{-1}$ , para mantenerlas en ventanas de 0,1 nm de espesor, esto manteniendo la libertad de movimiento en el plano-xy. Para cada uno de los 40 sub-sistemas generados, 30 ns de trayectoria fueron calculados.

La Figura 3.19 muestra el PFM asociado a la inserción de DOPC desde la solución acuosa hasta el interior de la bicapa para los dos modelos descritos anteriormente. Esta Figura evidencia que para cualquier distancia del eje Z, DOPC está energéticamente más estable rodeado de otros DOPC que con TTAC. Por lo tanto, acorde a estos resultados, la formación de balsas lipídicas en el agregado es esperada. Finalmente, la formación de balsas lipídicas es favorecida en  $5 \text{ kJ/mol}^{-1}$  con respecto a la inserción en una bicapa de  $TTA^+$ .

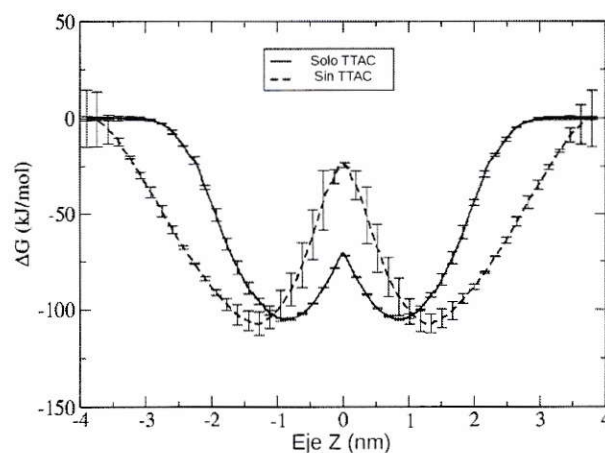


Figura 3.19: Potenciales de fuerza media (PFM) asociado a la inserción de DOPC desde la solución acuosa hasta el centro de las bicapas mencionadas anteriormente.

## 3.2. Resultados Fase TTAB.

Para estudiar el efecto del contraión, se realizó un estudio similar al presentado para la fase de TTAC pero cambiando TTAC por TTAB y NaCl por NaBr, a lo que llamamos fase TTAB.

### 3.2.1. Selección de los extremos de la fase.

Al igual que para la fase TTAC, aumentando y disminuyendo cada uno de sus componentes, salvo agua, desde un mismo punto que llamamos sb (ver sección 2.1). Se encontraron los extremos donde aún se conservaba la fase nemática, registrados por MOLP y  $^2\text{H}$ -RMN, DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub> y DHO, de la misma manera que en la sección 3.1.2. Estos extremos corresponden a 0,3971 g/ml y 0,6178 g/ml para TTAB, 0,0223 g/ml y 0,2097 g/ml para PL, 0,0289 g/ml y 0,0673 g/ml para DeOH y finalmente entre 0 y 0,3709 g/ml para NaBr. En la Figura 3.20 se presentan los gráficos de  $\Delta v_q$  de DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub> y DHO en función de las cantidades de las distintas especies analizadas. El comportamiento de los  $\Delta v_q$  presentes en estos gráficos tienen el mismo comportamiento que para la fase TTAC resistiendo el mismo análisis presente en la sección 3.1.2.

Pero en estos extremos los espectros no tienen la calidad suficiente como para hacer otros estudios de  $^2\text{H}$ -RMN, y los extremos que aun conservan un buen espectro  $^2\text{H}$ -RMN corresponden a 0,4192 g/ml y 0,5516 g/ml para TTAB, 0,0699 g/ml y 0,1398 g/ml para PL, 0,0409 g/ml y 0,0577 g/ml para DeOH y 0,0337 g/ml y 0,1348 g/ml para NaBr, estas cantidades por ml de agua. Llama la atención que comparándolo con la fase TTAC, la fase nemática, en este caso, se presente con una masa de TTAB que es prácticamente el doble de masa de TTAC requerida para que se forme la fase nemática en la fase TTAC. Esto va en desmedro del objetivo de aumentar la cantidad de fosfolípidos, ya que el porcentaje en masa de fosfolípidos presentes en el agregado pasa de un 29% a un 19%. Ahora,



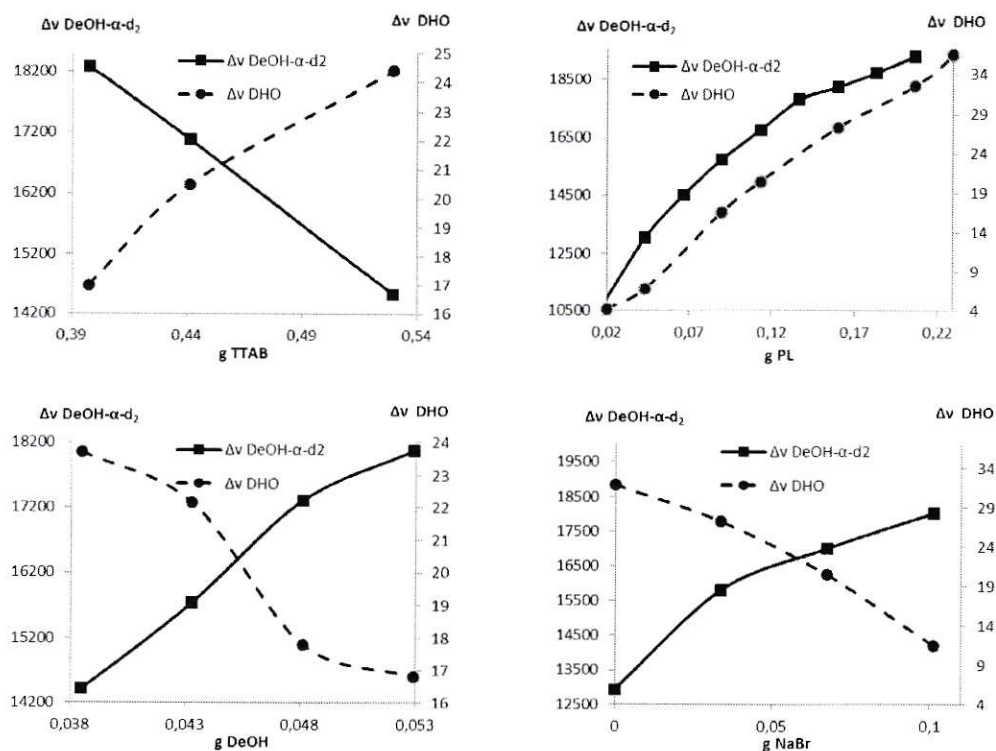


Figura 3.20:  $\Delta v_q$  de  $\text{DeOH-}\alpha\text{-d}_2$  y DHO en función de las cantidades de TTAB, PL, DeOH y NaBr.

analizando los extremos de NaBr, resulta interesante que aparentemente el ión  $\text{Br}^-$  estaría afectando menos que el  $\text{Cl}^-$  la integridad del agregado, por ende la fase nemática, esto porque el rango molar de sal que soporta la fase de TTAB (NaBr) es mayor que la fase de TTAC (NaCl), siendo de 0,3 molal a 1,3 molal en el caso de la fase TTAB y de 1,2 molal a 1,8 molal en el caso de la fase TTAC, lo que resulta en un rango de estabilidad de aproximadamente el doble para la fase TTAB (1 molal) con respecto a la de la fase TTAC (0,6 molal). TTAB presenta un rango en moles del doble que para TTAC, siendo de  $4,6 \cdot 10^{-4}$  moles de TTAB y de  $2,3 \cdot 10^{-4}$  moles de TTAC, pero esto es esperable dado

que TTAB está presente aproximadamente en el doble de cantidad que TTAC, ver sección 2.1. El resto de los componentes, PL y DeOH, presenta un rango en masa muy similar al presentado en la fase TTAC.

### 3.2.2. Espectros $^2\text{H}$ -RMN de los extremos de la fase.

De la misma manera que se hizo en la fase TTAC sección 3.1.2, para obtener más información acerca de la dinámica interna del agregado, se remplazo SDS por SDS-d<sub>25</sub>, también a H<sub>2</sub>O se le agregó D<sub>2</sub>O a una concentración 5% p/p de D<sub>2</sub>O, esto para cada uno de los extremos seleccionados. En la Figura 3.21 se muestran los espectros  $^2\text{H}$ -RMN de SDS-d<sub>25</sub> y DHO para todos los extremos, y en la Tabla 3.6 los valores de  $\Delta\nu_q$  y  $T_1$  desprendidos de estos espectros. En la Figura 3.22 se muestran los espectros obtenidos con la secuencia de pulsos T1IR y un ajuste mono-exponencial representativo de la intensidad de una señal en función del tiempo para la obtención de  $T_1$ .

Los cambios en  $\Delta\nu_q$  y  $T_1$  presentes en la Tabla 3.6, tanto a lo largo de la cadena de SDS-d<sub>25</sub> como también con los cambios en la concentración de las distintas especies, tienen el mismo comportamiento que para la fase TTAC resistiendo el mismo análisis presente en la sección 3.1.2. Es decir,  $\Delta\nu_q$  disminuye cuando aumentamos la concentración de TTAB y aumenta cuando aumentamos la concentración de PL y de DeOH, y a  $T_1$  le ocurre lo inverso, pues como se explicó anteriormente  $\Delta\nu_q$  aumenta por un mayor alineamiento de las cadenas alifáticas y este mayor alineamiento disminuye la dinámica re-orientacional lo que disminuye  $T_1$ . Se presenta un comportamiento anómalo en  $T_1$  para el caso del aumento de la concentración de PL, esto porque a pesar de que  $\Delta\nu_q$  aumenta alrededor de 4 kHz,  $T_1$  se mantiene prácticamente igual para los primeros carbonos de SDS-d<sub>25</sub>, con valores de 41,6 ms para 0,4192 g de TTAB y 42,0 ms para 0,5516 g de TTAB, por lo que en este caso el mayor alineamiento de las cadenas alifáticas al aumentar la concentración de PL

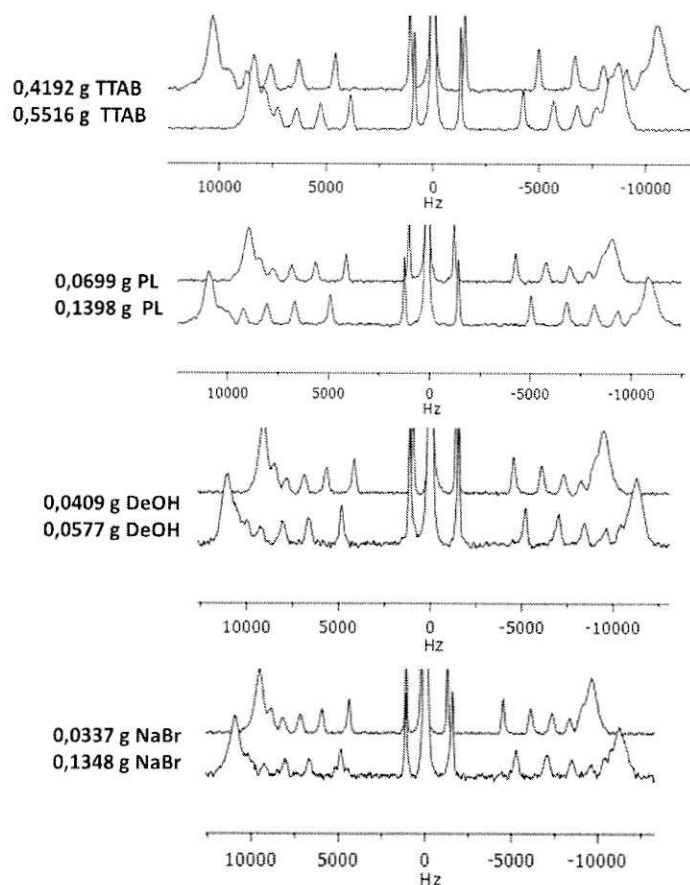


Figura 3.21: Espectros  $^2\text{H}$ -RMN de SDS- $d_{25}$  y DHO de todos los extremos de la fase TTAB.

no repercute en la dinámica re-orientacional, como podría ser el caso en que el agregado completo se oriente mejor al aumentar PL manteniendo la misma dinámica interna, o bien que efectivamente disminuya la movilidad de las cadenas alifáticas, como es lo esperado, pero esta disminución puede que esté siendo enmascarada por otros fenómenos compensatorios que aumenten la movilidad, como un aumento en las fluctuaciones orientacionales del agregado como un todo (tumbling). Dado que los cambios de  $\Delta\nu_q$  para los cambios de concentración de  $\text{TTA}^+$ , PL y DeOH son cualitativamente los mismos que para la fase

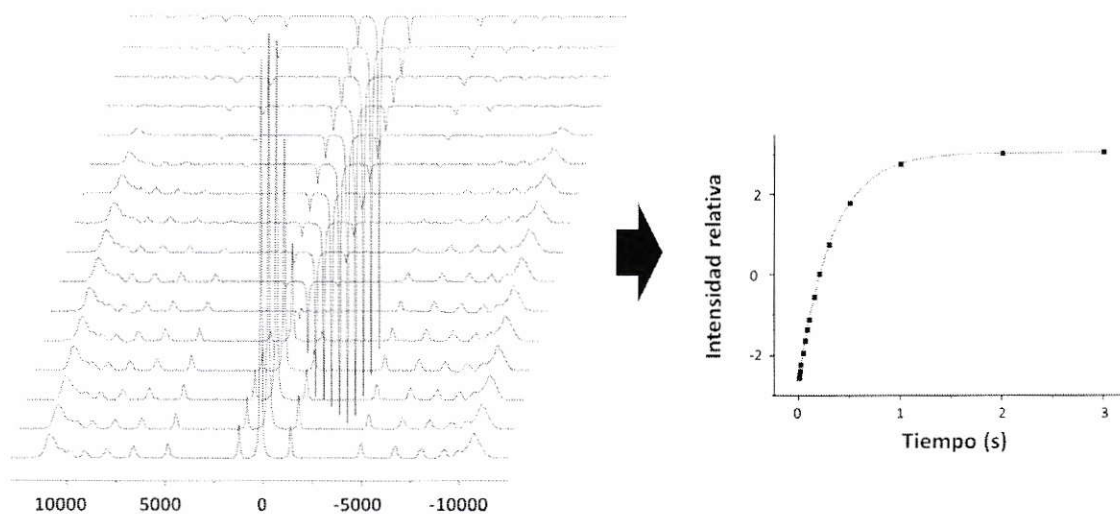


Figura 3.22: Espectros obtenidos por la secuencias de pulsos T1IR y un ajuste mono-exponencial representativo.

TTAC, el análisis basado en el efecto espaciador de las especies no cargadas (PL y DeOH) sobre  $\text{TTA}^+$ , lo que disminuiría la repulsión entre estos últimos permitiendo así un mejor empaquetamiento de las cadenas y un mayor alineamiento con el consecuente aumento de  $\Delta\nu_q$ , también puede ser aplicado en estos sistemas. Al aumentar la sal, NaBr, el efecto es diferente que para la fase TTAC. En esta fase hay un aumento de  $\Delta\nu_q$  de 3 kHz en los primeros carbonos. Esto se puede explicar porque el aumento de sal en esta fase es del 300% p/p y en la fase TTAC solo del 42% p/p, por lo tanto es de esperar que el aumento en  $\Delta\nu_q$  sea mayor. Este aumento en  $\Delta\nu_q$  producto del aumento en la fuerza iónica puede ser debido a que hay más iones disponibles para coordinarse con  $\text{TTA}^+$  generando así una interfase más estable por disminuir las repulsiones inter- $\text{TTA}^+$ . Adicionalmente la diferencia de tamaño entre estos iones también contribuiría a este aumento de  $\Delta\nu_q$ , pues como  $\text{Cl}^-$  es más pequeño que  $\text{Br}^-$  posee una esfera de solvatación mayor lo que le dificulta



	0,4192 g/ml TTAB		0,5516 g/ml TTAB		0,0699 g/ml PL		0,1398 g/ml PL	
Carbono	$\Delta v_q (Hz)$	$T_1 (ms)$	$\Delta v_q (Hz)$	$T_1 (ms)$	$\Delta v_q (Hz)$	$T_1 (ms)$	$\Delta v_q (Hz)$	$T_1 (ms)$
1	20897	37,9	17100	46,3	17987	41,6	21888	42,0
2	20897	37,9	17100	46,3	17987	41,6	21888	42,0
3	20897	37,9	17100	46,3	17987	41,6	21888	42,0
4	20897	37,9	17100	46,3	17987	41,6	21888	42,0
5	20897	37,9	17100	46,3	17987	41,6	21888	42,0
6	20897	37,9	17100	46,3	17987	41,6	21888	42,0
7	20897	41,2	17100	57,4	17987	42,0	21888	59,4
8	17834	47,8	14967	145,1	15686	55,7	18628	50,7
9	15613	55,3	13675	91,7	13770	67,1	16287	57,0
10	1294	—	10960	90,8	11422	93,8	13612	77,4
11	9557	113,3	8114	120,7	8418	127,1	10047	112,2
12	2565	317,7	2162	327,2	2237	330,6	2685	326,1
DHO	—	349,2	—	329,8	12,7	367,3	21,4	334,9
	0,0409 g/ml DeOH		0,0577 g/ml DeOH		0,0337 g/ml NaBr		0,1348 g/ml NaBr	
Carbono	$\Delta v_q (Hz)$	$T_1 (ms)$	$\Delta v_q (Hz)$	$T_1 (ms)$	$\Delta v_q (Hz)$	$T_1 (ms)$	$\Delta v_q (Hz)$	$T_1 (ms)$
1	18593	38,6	22451	36,4	19173	40,1	22061	37,7
2	18593	38,6	22451	36,4	19173	40,1	22061	37,7
3	18593	38,6	22451	36,4	19173	40,1	22061	37,7
4	18593	38,6	22451	36,4	19173	40,1	22061	37,7
5	18593	38,6	22451	36,4	19173	40,1	22061	37,7
6	18593	38,6	22451	36,4	19173	40,1	22061	37,7
7	18593	42,8	20391	32,9	17260	42,5	22061	35,4
8	16091	42,2	18929	41,1	15584	53,8	18823	50,4
9	14158	57,5	16546	56,3	14557	62,5	16523	57,8
10	11751	81,8	13741	75,4	11885	81,8	13689	77,6
11	8704	129,6	10108	109,7	8903	124,8	10106	114,1
12	2336	303,6	2683	301,8	2384	322,5	2678	318,3
DHO	—	323,4	—	341,7	28,8	350,6	—	330,3

Tabla 3.6: Valores experimentales de  $\Delta v_q$  y  $T_1$  de SDS-d<sub>25</sub> y DHO de los extremos de la fase.

más que a  $Br^-$  el ingreso a la interfase.

### 3.2.3. Microscopía Óptica de Luz Polarizada, MOLP.

La Figura 3.23 muestra las texturas de MOLP para todos los extremos de la fase TTAB. Al igual que en la fase TTAC se observan texturas de “oily streak” y Schlieren, para cada pareja de extremos, es decir también en la fase TTAB los cambios de concentración de sus componentes inducen un cambio de fase similar, siendo ambas también nemáticas. Al igual que en la fase TTAC bajas concentraciones de PL, DeOH y NaBr presentan texturas de Schlieren y a altas concentraciones aparece la textura “oily streak”, y lo inverso ocurre con el aumento de TTAB. Esta observación revela, al igual que para la fase TTAC, que la

densidad de carga de la superficie del agregado, por lo tanto el contenido de TTAB, estaría controlando la morfología de los agregados, dado que el incremento de PL o DeOH sería equivalente a una disminución de TTAB

### **3.2.4. Caracterización de la fase.**

La fase estudiada, para todas las diferentes concentraciones, en este caso, también corresponden a una fase nemática, establecida así por los mismo argumentos de  $^2\text{H}$ -RMN y MOLP presentados en la sección 3.1.1 para caracterizar la fase de TTAC. En la Figura 3.21 se muestran los espectros  $^2\text{H}$ -RMN y en la Figura 3.23 las texturas de MOLP características de las diferentes mesofases nemáticas encontradas. Efectivamente estos datos muestran que todas estas soluciones corresponden a fases nemáticas.

### **3.2.5. Viscosidad cinemática, $\eta$ .**

La Tabla 3.7 muestra  $\eta$  para todos los extremos. Estos resultados son similares a los resultados de  $\eta$  de la fase TTAC en lo que respecta al aumento o disminución de  $\eta$  con los cambios en la concentración de sus componentes, es decir al aumentar el contenido de TTAB, símil a TTAC, hay un brusco aumento de la viscosidad, mientras que el aumento de PL, DeOH o NaBr, trae consigo una disminución en la viscosidad, mismo comportamiento que en la fase TTAC, ver Tabla 3.2. Pero en cuanto a las magnitudes de  $\eta$ , estas son mayores en la fase TTAB. El que este sistema presente mayor viscosidad es esperado dado que contiene alrededor del doble de  $\text{TTA}^+$  con respecto a la fase TTAC.

### **3.2.6. Cambio de fase.**

Con el fin de pesquisar el cambio de fase evidenciado por MOLP (ver Figura 3.23) se midió  $\eta$  a diferentes concentraciones de TTAB, de manera de ver si se produce el mismo cambio de pendiente presentado en la fase TTAC alrededor de la concentración a la cual se



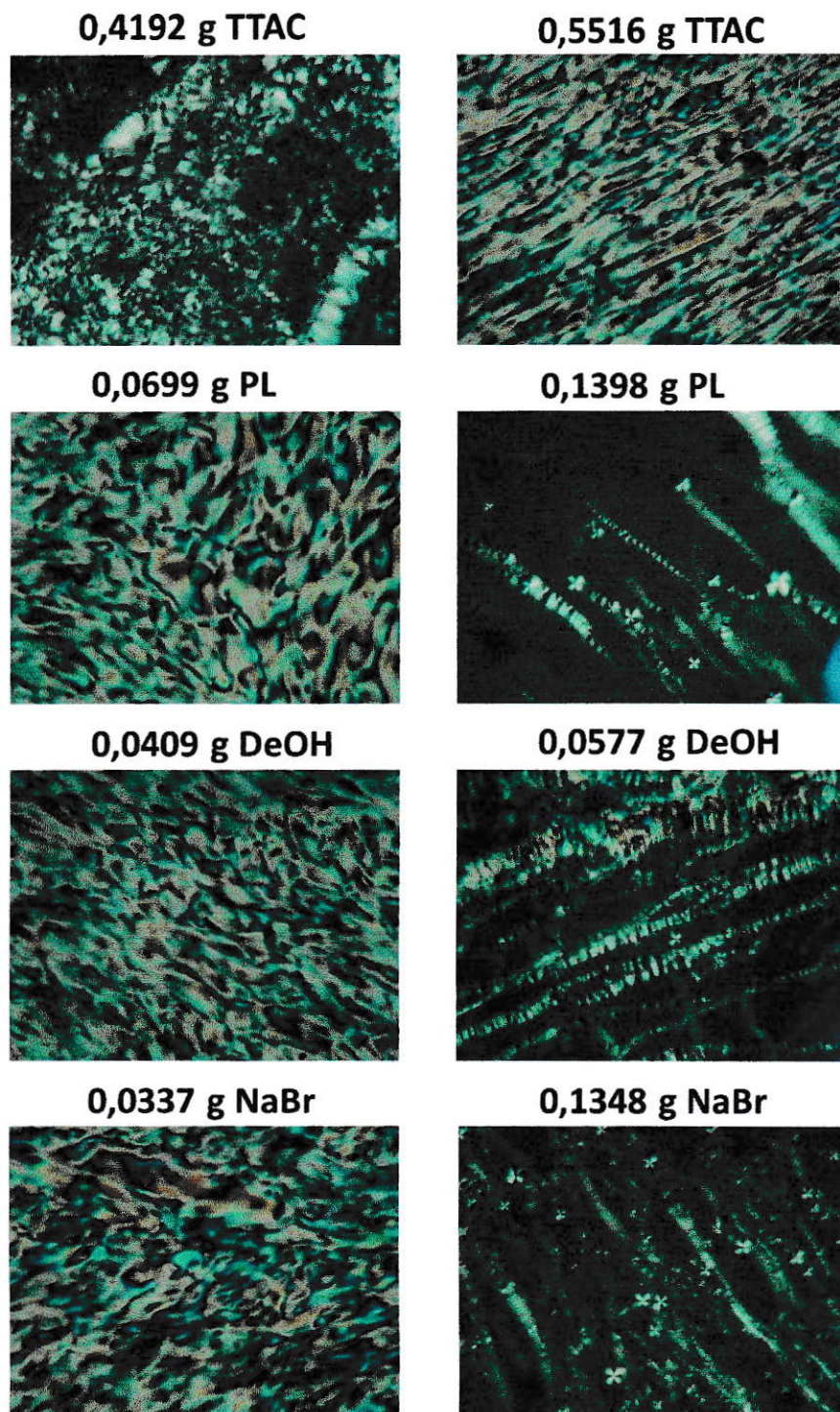


Figura 3.23: Texturas MOLP de todos los extremos de la fase TTAB.

Muestra	$\eta$ ( $mPa \cdot s$ )
0,4192 g/ml TTAB	$48.9 \pm 0.8$
0,5516 g/ml TTAB	$811.1 \pm 9$
0,0699 g/ml PL	$393.4 \pm 7$
0,1398 g/ml PL	$56.3 \pm 0.7$
0,0409 g/ml DeOH	$417.5 \pm 3$
0,0577 g/ml DeOH	$32.3 \pm 0.3$
0,0337 g/ml NaBr	$395.4 \pm 3$
0,1348 g/ml NaBr	$38.1 \pm 0.7$

Tabla 3.7:  $\eta$  de los extremos de la fase TTAB.

pasa de un textura de “oily streak” a una Schlieren. Adicionalmente, se analizó de manera más detallada los gráficos de  $\Delta v_q$  de DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub> en función de las cantidades de PL y NaBr.

En el gráfico presentado en la Figura 3.24, se ve como aumenta la viscosidad a medida que aumenta el contenido de TTAB, al contrario que en la fase TTAC, no existe un cambio de pendiente pronunciado alrededor del punto donde cambias las texturas MOLP ( $\approx 0,50$  g de TTAB), aunque como lo evidencia las regresiones lineales antes y después de los cambios en las texturas de MOLP se puede apreciar un leve cambio de pendiente, siendo mayor la pendiente en la fase que presenta texturas de Schlieren, concordante con el paso de un agregado mono-axial a uno bi-axial, al igual que en la fase TTAC, ver sección 3.1.3.

Más evidencia de un cambio de fase se presenta en los gráficos de  $\Delta v_q$  de DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub> en función de las cantidades de PL y NaBr, ver Figuras 3.25 y 3.26, en estos gráficos las regresiones lineales, antes y después del contenido de PL y NaBr donde cambian las texturas de MOLP, evidencian un claro cambio de pendiente, lo que sostiene que está ocurriendo un cambio de fase, a pesar de que se mantiene la propiedad nemática.



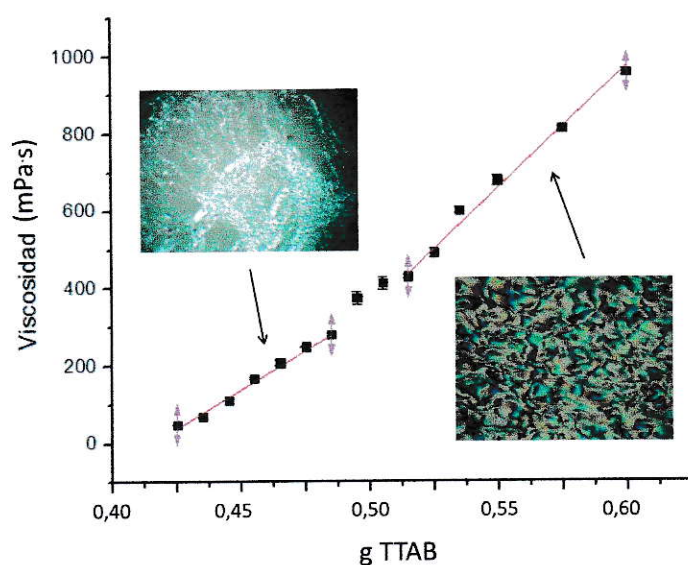


Figura 3.24:  $\eta$  en función del contenido de TTAB.

### 3.3. Resultados Fase SDS.

Finalmente se estudio esta fase, la que se diferencia de las anteriores porque los agregados son a base de dodecildulfato ( $DS^-$ , anión de SDS) en lugar de  $TTA^+$ . Un agregado a base de  $DS^-$  es un mimético de membrana más adecuado dado que las membranas plasmáticas contienen interfaces aniónicas, además la fase se presenta a 310 K, temperatura cercana a la fisiológica, por lo que se estudiarían moléculas insertas en estos agregados a la temperatura que actúan en el cuerpo humano.

Tras un estudio preliminar, con el fin de maximizar el contenido de PL y minimizar el de la sal, pues la concentración salina en las que se encuentran las membranas plasmáticas está muy por debajo de las ocupadas en nuestros estudios, se decidió que la sb a trabajar en esta fase contiene 0,5240 g de SDS, 0,0874 g de PL, 0.0307 g de  $Na_2SO_4$ , 108  $\mu l$  de DeOH

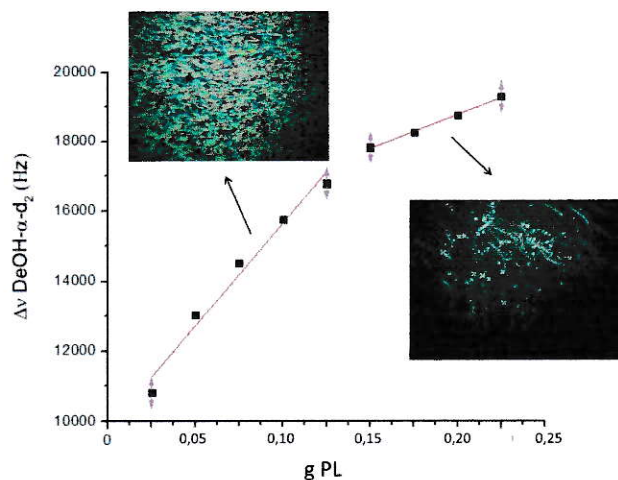


Figura 3.25:  $\Delta v_q$  de DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub> en función del contenido de PL, fase TTAB.

y 1 ml de H<sub>2</sub>O. Al igual que las fases anteriores, trabajamos a diferentes concentraciones pero siempre conservando la fase nemática, que sabemos que es nemática por las mismas razones erguidas para las fases de TTAC y TTAB ver secciones 3.1.1 y 3.2.4.

Al igual que las fases anteriores, en la misma región nemática se presentan dos fases, evidenciado por el cambio de texturas de “oily streak” a Schlieren, que se pudo apreciar cambiando el contenido de PL, ver Figura 3.27. En el gráfico presente en esta misma Figura, se ve que la pendiente tiene un cambio significativo, aunque no muy pronunciado, alrededor del contenido de PL donde se genera el cambio de texturas en MOLP, pudiéndose registrar un cambio de fase a través de los cambios en las tendencias de  $\Delta v_q$ .

### 3.4. Inserción L-DOPA.

L-DOPA o L-3,4-dihidroxifenilalanina (ver Figura 3.28), es un compuesto sintetizado naturalmente por el ser humano a partir del aminoácido tirosina. Es el precursor de las

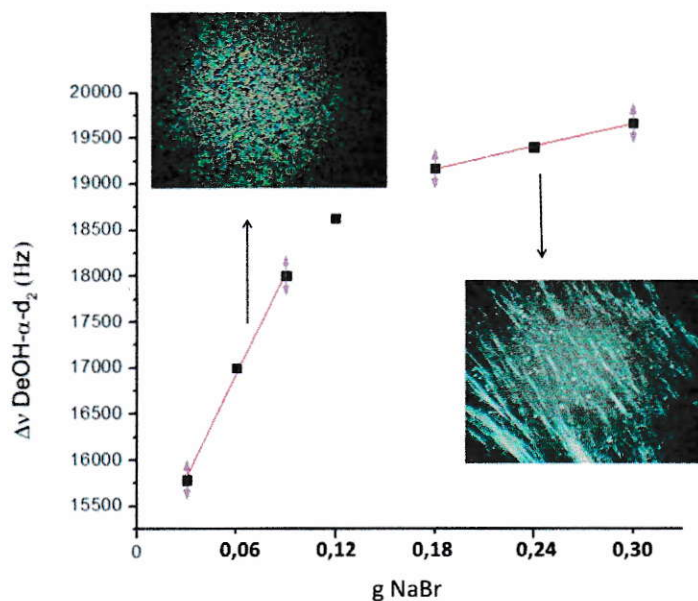


Figura 3.26:  $\Delta\nu_q$  de DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub> en función del contenido de NaBr, fase TTAB.

catecolaminas, neurotransmisores a bases de aminas, tales como la dopamina, noradrenalina y adrenalina. Dado que los problemas motores asociados al Parkinson son debido a una falta de dopamina en la sustancia negra ubicada dentro de la barrera Hematoencefálica [109], L-DOPA al ser precursor de este neurotransmisor y al tener la capacidad de cruzar la barrera Hematoencefálica (dopamina no puede cruzar esta barrera), se ha convertido en el tratamiento del Parkinson más ampliamente utilizado a lo largo del mundo. Pero el uso de L-DOPA para tratar el Parkinson tiene efectos adversos, tales como discinesia y fluctuación motora [110, 111], ya que sólo del 5% al 10% de L-DOPA suministrada para el tratamiento pasa por la barrera Hematoencefálica y el resto es metabolizado a dopamina en otras partes del cuerpo, generando estos efectos adversos. Por esto es importante la investigación sobre el paso de L-DOPA a través de las membranas citoplasmáticas en orden

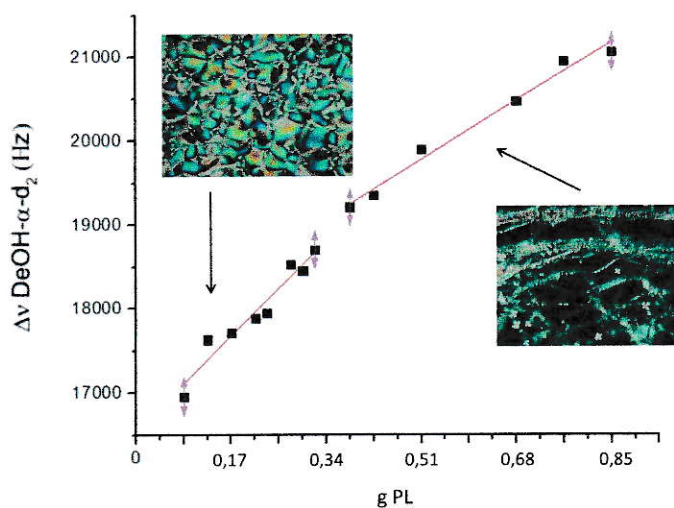


Figura 3.27:  $\Delta\nu_q$  de DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub> en función del contenido de PL, fase SDS.

de maximizar el paso de L-DOPA a través de la barrera Hematoencefálica y así disminuir los efectos secundarios.

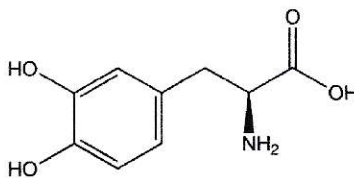


Figura 3.28: Estructura de L-DOPA.

Estudios farmacocinéticos demuestran que L-DOPA es transportado a través de la barrera Hematoencefálica vía el transportador de amino ácidos tipo L [110, 112], el mismo que transporta tirosina. La estructura de esta molécula presenta cuatro grupos funcionales, dos hidroxilos de pKa 9,96 y 11,79, un grupo amonio de pKa= 8,72 y un grupo carboxilo



de  $pK_a=2,32$ . Nuestros sistemas, es decir tanto las fases TTAC, TTAB y SDS, oscilan entre un  $pH=5$  a un  $pH=6$ , por lo tanto L-DOPA en nuestros sistemas tendrá el grupo amonio protonado ( $-NH_3^+$ ) y el carboxilo desprotonado ( $-COO^-$ ), por lo que cae en la clasificación de zwitterión. Básicamente estos grupos cargados estarían impidiendo el paso de esta molécula de manera espontánea a través de la membrana, esto a pesar que posee un anillo aromático. Con el fin de optimizar el paso de L-DOPA a través de la barrera Hematoencefálica se plantea el estudio de la inserción de esta molécula en un mimético de membrana y así poder postular modificaciones estructurales que hagan posible el cruce a través de una bicapa lipídica. Específicamente se pretende determinar el mecanismo de inserción, distribución, orientación promedio, dinámica e interacciones entre L-DOPA y la bicapa, y así identificar el origen de las barreras energéticas asociadas al cruce de la membrana.

### **3.4.1. Inserción de L-DOPA en fase SDS.**

Dado que esta fase presenta agregados con carga superficial negativa, al igual que las membranas citoplasmáticas, y es una fase estable a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura fisiológica, esta fase es un mimético de membrana más representativo de la membrana celular que la fase TTAC o TTAB, por esto se seleccionó esta fase para el estudio de inserción de L-DOPA. El sistema seleccionado para este estudio es la sb de la sección 3.3, que corresponde a un contenido de 0,5240 g de SDS, 0,0874 g de PL, 0,0307 g de  $Na_2SO_4$ , 108  $\mu\text{l}$  de DeOH y 1 ml de  $H_2O$ .

El primer paso en este estudio es determinar la cantidad apropiada de L-DOPA que se le agregará al sistema en cuestión, esta cantidad será la máxima que soporte el cristal líquido antes de que haya un cambio de fase. La cantidad de L-DOPA debe maximizarse pues necesitamos una buena señal de L-DOPA- $d_3$ . La Figura 3.29 muestra los espectros

$^2\text{H}$ -RMN de  $\text{DeOH-}\alpha\text{-d}_2$  y DHO, con sus respectivas fotos de MOLP, del cristal líquido con diferentes cantidades de L-DOPA por ml de agua. En los espectros RMN de esta figura se aprecia claramente que con 8 mg de L-DOPA por ml de cristal líquido la fase se destruye, hecho sustentado por el cambio de textura de MOLP cuando se le adiciona esta cantidad de L-DOPA al sistema seleccionado. Con 6 mg de L-DOPA por ml de cristal líquido la fase nemática aún se mantiene, evidenciado tanto por  $^2\text{H}$ -RMN de  $\text{DeOH-}\alpha\text{-d}_2$  como por MOLP. Esta cantidad de L-DOPA no deteriora el espectro  $^2\text{H}$ -RMN de  $\text{DeOH-}\alpha\text{-d}_2$  (ver Figura 3.29) como para hacer posteriores estudios, por lo que esta cantidad es seleccionada para el estudio de inserción de L-DOPA. Analizando las imágenes de MOLP de la misma figura se puede apreciar como L-DOPA induce un cambio de fase evidenciado por el cambio de textura de “oily streaks” a Schlieren cuando se le agrega 2 mg y 6 mg de L-DOPA.

Un fenómeno interesante ocurre con los desdoblamientos cuadrupolares de DHO al agregar L-DOPA, la Figura 3.30 muestra los  $\Delta\nu_q$  de DHO de los mismos espectros  $^2\text{H}$ -RMN presentados en la Figura 3.29. Se puede ver que aparentemente la presencia de L-DOPA induce la aparición de dos fases que coexisten sin separarse, como lo evidencia los dos  $\Delta\nu_q$ s de DHO (528,1 Hz y 264,2 Hz), también se puede observar como a medida que aumenta la cantidad de L-DOPA hay una inclinación a la fase representada por el menor desdoblamiento de DHO (264,2 Hz), presumiblemente correspondiente a la fase nemática con textura de Schlieren, dado que el desdoblamiento de DHO del cristal líquido sin L-DOPA que presenta textura de “oily streaks” presenta el mayor desdoblamiento de DHO (528,1 Hz). En esta misma figura se presenta el espectro de DHO de las mismas muestras tras 50 días, se observa que todos los espectros tienden al mismo desdoblamiento cuadrupolar de DHO (552,8 Hz), el que corresponde a la muestra sin L-DOPA. Esto se explica porque con el tiempo las dos fases presentes tras la adición de L-DOPA se separan,

pudiéndose apreciar en el espectro sólo una de ellas, esta separación se pudo comprobar visualmente. Por este fenómeno se hace poco viable la utilización de esta fase para el estudio de inserción de L-DOPA por lo que se ocupará para este estudio una fase más estable, correspondiente a la fase TTAC sin PL.

### 3.4.2. Inserción de L-DOPA en fase TTAC.

Por estudios anteriores en esta fase con moléculas similares a L-DOPA se decidió agregar 5 mg de L-DOPA por gr de muestra. El sistema seleccionado para este estudio presenta la siguiente composición: 0,3448 g de TTAC + 0,1094 g de NaCl + 0,0730 g de DeOH + 1 ml de H<sub>2</sub>O, utilizado en estudios previos [20]. En la Figura 3.31 se presentan espectros <sup>2</sup>H-RMN de este sistema, A) corresponde al espectro <sup>2</sup>H-RMN de L-DOPA-d<sub>3</sub> y de DHO, B) corresponde al espectro <sup>2</sup>H-RMN de SDS-d<sub>25</sub> y DHO cuando se agrega L-DOPA y C) es el espectro <sup>2</sup>H-RMN de SDS-d<sub>25</sub> y de DHO. Comparando los espectros B) y C) se observa que la adición de L-DOPA no tiene mayores efectos sobre los desdoblamientos cuadrupolares de SDS-d<sub>25</sub>, pero tiene un efecto en el ancho de la señal, aumentando esta al agregar L-DOPA, probablemente por un deterioro de la fase o un aumento de viscosidad. En el espectro A) se ve la señal de L-DOPA-d<sub>3</sub> a la izquierda y la de DHO a la derecha, no se observan desdoblamientos en la señal de L-DOPA-d<sub>3</sub>, por lo que presumiblemente no interactúa con los agregados de este sistema, sino que debiera mantenerse en el dominio isotrópico, conformado principalmente por el solvente. Esto concuerda con la mantención de los desdoblamientos cuadrupolares de SDS-d<sub>25</sub> constantes al adicionar L-DOPA, pues la incorporación de esta molécula al agregado no debiera influir en la dinámica del mismo por lo tanto tampoco en los  $\Delta\nu_q$  de SDS-d<sub>25</sub>.



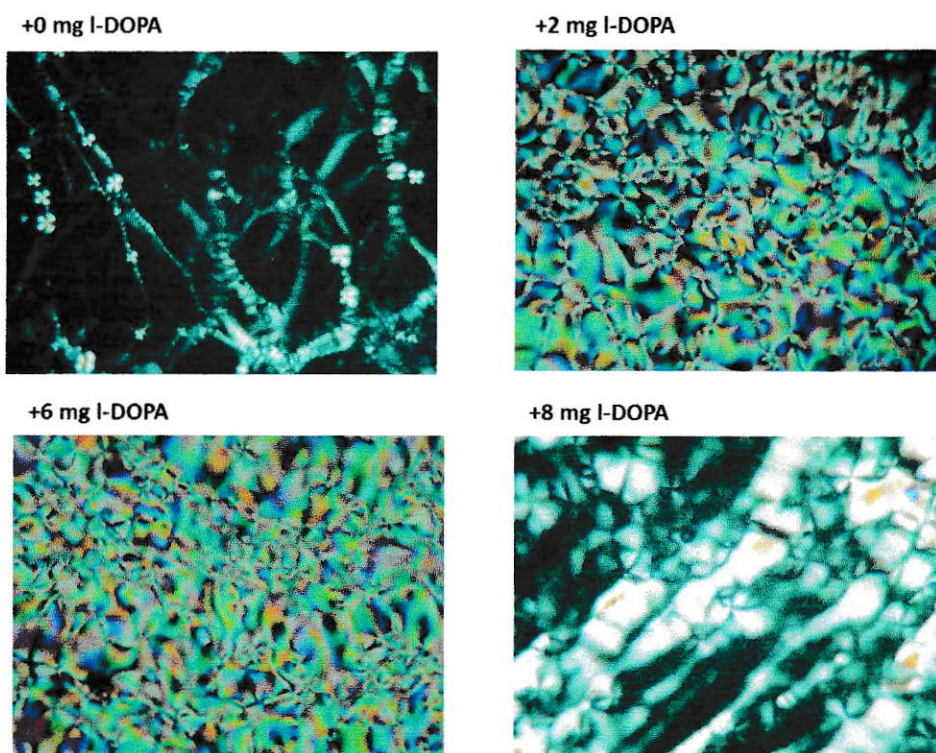
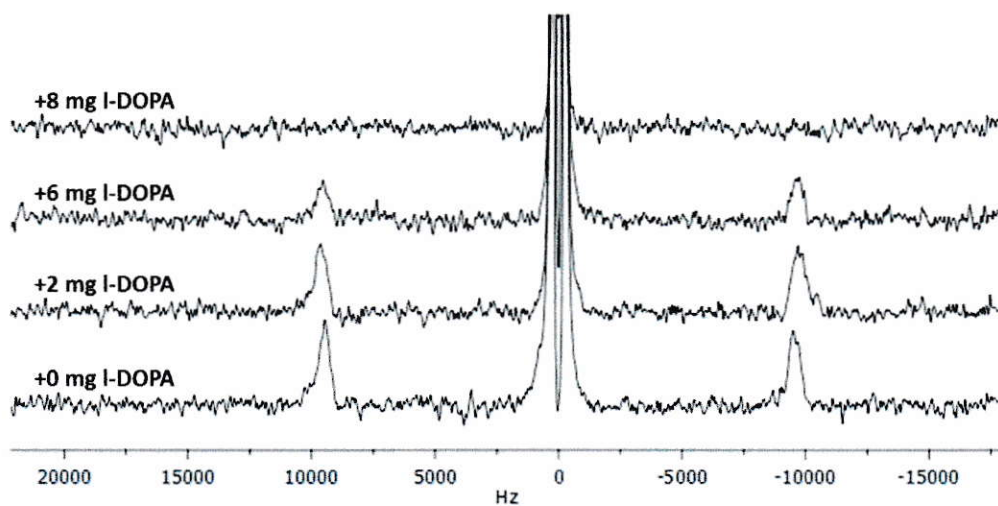


Figura 3.29: Espectro  $^2\text{H}$ -RMN de  $\text{DeOH-}\alpha\text{-d}_2$  y DHO de sb de SDS con diferentes cantidades de L-DOPA por ml de agua con sus respectivas texturas MOLP.



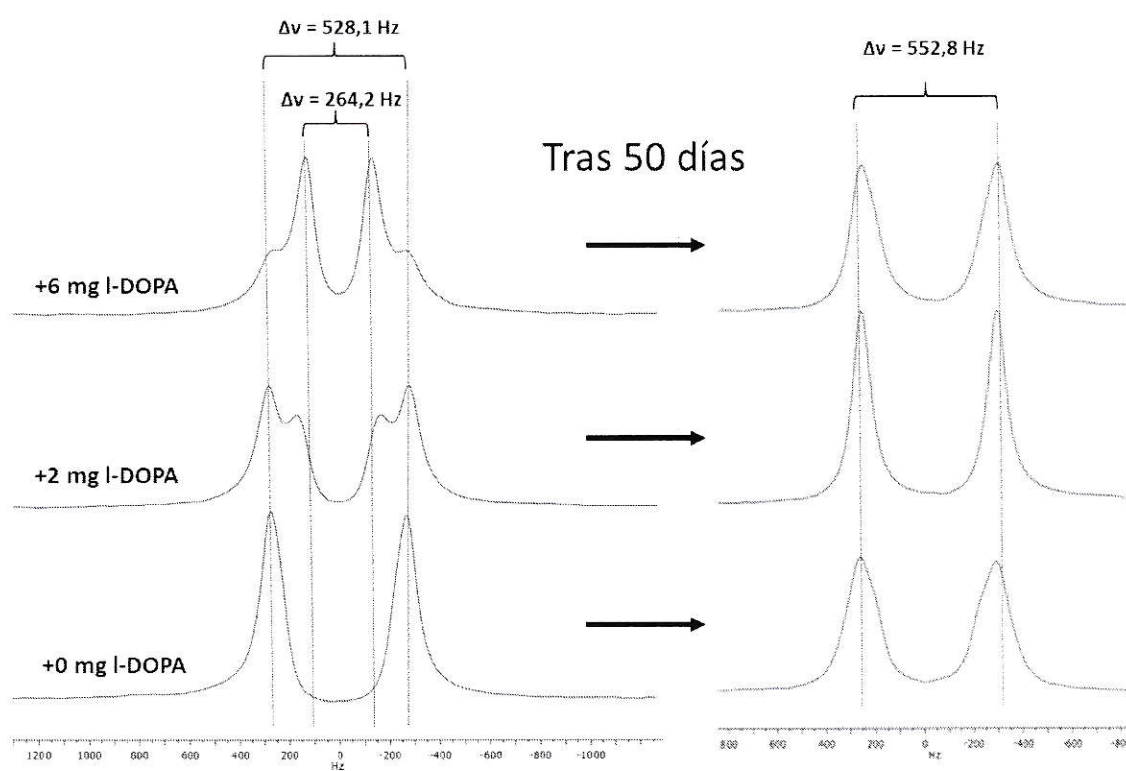


Figura 3.30: Espectro  $^2\text{H}$ -RMN de DHO de sb de SDS con diferentes cantidades de L-DOPA por ml de agua y los mismo espectros de las mismas muestras tras 50 días.

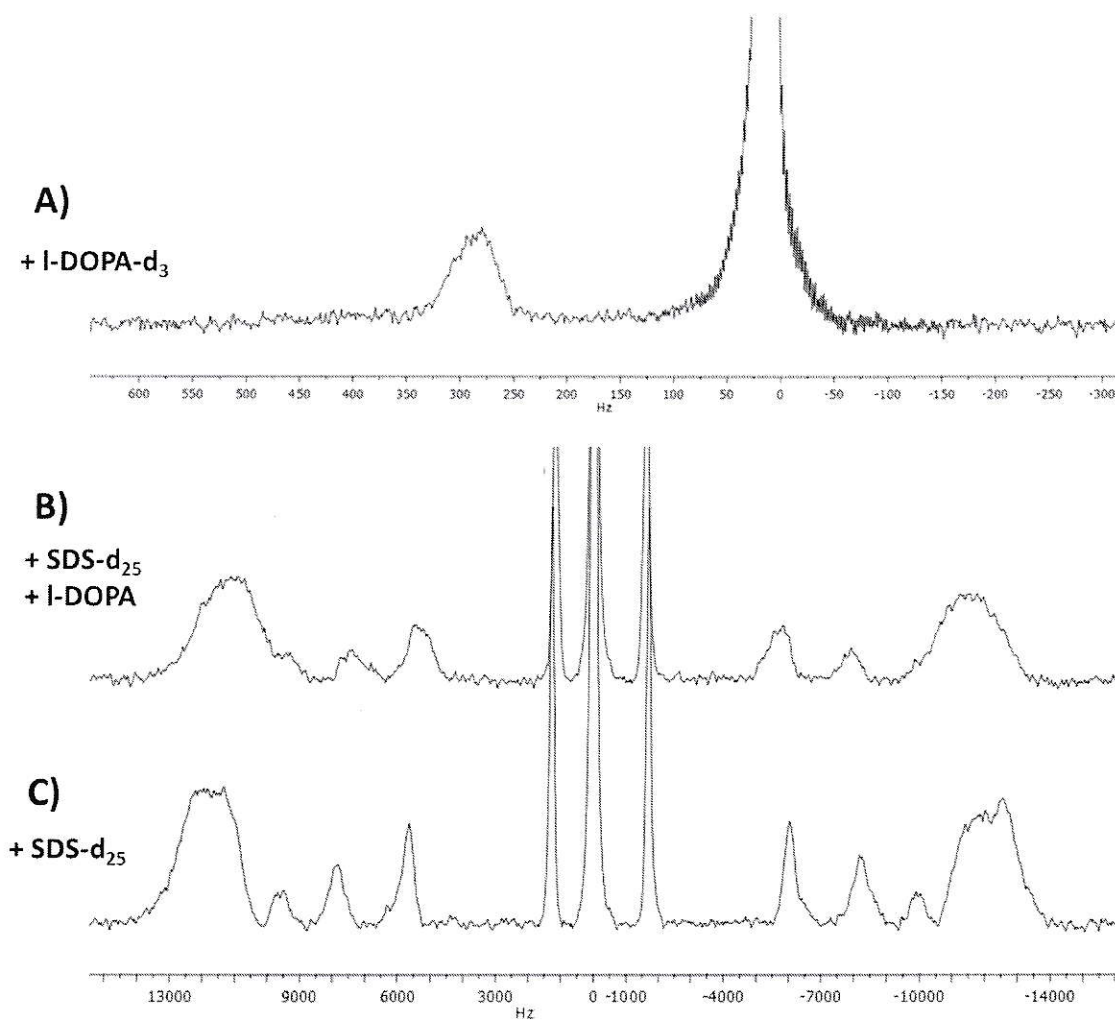


Figura 3.31: Espectro  $^2\text{H}$ -RMN de A) L-DOPA-d<sub>3</sub> y de DHO, B) SDS-d<sub>25</sub> y DHO cuando se agrega L-DOPA y C) de SDS-d<sub>25</sub> y de DHO.

# Capítulo 4

## Conclusiones.

- I Las tres sistemas estudiado TTAC, TTAB y SDS, presentan dos fases nemáticas al cambiar la relación del contenido de sus componentes en los rangos estudiados, como se evidencia por MOLP y  $\eta$ . Estas dos fases corresponden a cristales líquidos liótropos nemáticos con estructura dinámica, demostrado por MOLP y  $^2\text{H-RMN}$ .
- II En el sistema TTAC se demostró que una de estas fases es discoidal mono-axial y la otra elipsoidal bi-axial, esto tras estudios de viscosidad, simulación (HYDRO), microscopía (TEM, Cryo-TEM y FF-TEM) y espectroscopía  $^2\text{H-RMN}$ . Estudios de viscosidad en la fase TTAB también sugiere que esta tiene un comportamiento similar.
- III El cambio de geometría del agregado de mono-axial a bi-axial está determinado por los cambios en la densidad de carga superficial.
- IV El cambio de forma y tamaño del agregado, de mono-axial a bi-axial y 10 veces más grande, junto con el cambio en la constante de bending determinada por simulación (GROMACS), explican el marcado aumento de viscosidad al aumentar el contenido de  $\text{TTA}^+$ .
- V Los cambios en  $\Delta v_q$  de las señales de los deuterios presentes en las cadenas de anfífilos

que conformen estos sistemas, dados por cambios en la relación del contenido de sus componentes, no necesariamente se deben a cambios en la dinámica interna del agregado, sino que también pueden ser debido a fluctuaciones orientacionales de las cadenas originadas en movimientos colectivos del agregado.

- VI El acercamiento de capas de la misma carga durante el fenómeno de interdigitación en los agregados al aumentar 30 % p/p TTAC en la fase TTAC, ocurre gracias al aumento de las interacciones de LJ entre las cadenas de los anfifilos de TTA<sup>+</sup>.
- VII Propiedades dinámicas del solvente, tales como coeficientes de difusión y tiempos de correlación rotacional, están fuertemente influenciadas por la densidad de carga superficial y la distancia a la interfase, efectos que desaparecen a 3,5 nm de esta.
- VIII La formación de balsas lipídicas, registradas por simulación (GROMACS), es energéticamente favorable por la mayor afinidad entre PLs que entre PL y TTA<sup>+</sup>.
- IX La inserción de L-DOPA en la fase SDS induce la aparición de dos fases que se separan totalmente tras 50 días.
- X L-DOPA no se inserta en un agregado de carácter catiónico, como lo son los que forman la fase TTAC.





## **Capítulo 5**

### **Apéndice**

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 7455

## Effect of shape and bending modulus on the properties of nematic lyotropic liquid crystals

 A. R. Ruiz-Fernández,<sup>ab</sup> J. J. López-Cascales,<sup>\*b</sup> J. J. Giner-Casares,<sup>d</sup> R. Araya-Maturana,<sup>e</sup> F. G. Díaz-Baños,<sup>c</sup> D. Muñoz-Gacitúa<sup>a</sup> and B. E. Weiss-López<sup>\*a</sup>

Synovial liquid is a natural lubricant of articular joints, such as shoulders, knees and hips. Thus, the development of biocompatible lubricants that can be employed in medical prosthesis for artificial implants, and eventually in certain therapies against osteo-arthritis or rheumatoid-arthritis diseases, is of an undoubted importance. Lyotropic liquid crystals have been used in the synthesis of silica and metals containing regularly oriented nanoporous, to obtain oriented carbon nanotube materials, in several pharmaceutical applications, as membrane mimetics and in lubrication applications. In this context, a new nematic lyotropic liquid crystal has been developed based on tetradecyltrimethyl ammonium chloride (TTAC), decanol (DeOH), a natural mixture of lipids (PL) extracted from soybean and sodium chloride (NaCl), all dissolved in water. A 30% w/w increase in TTAC content respect a certain composition of reference produces a more than 24-fold increase in the macroscopic viscosity of the solution. To understand the molecular principles that explain this behavior, several experimental and theoretical studies have been carried out. In this regard, <sup>2</sup>H-NMR quadrupole splittings of fully deuterated sodium dodecyl sulphate (SDS-d<sub>25</sub>) introduced as molecular probe, transmission electron microscopy (TEM), freeze fracture transmission electron microscopy (FF-TEM), cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM) and polarized light microscopy (PLM) were obtained. In addition, hydrodynamic studies determined how the enhancement in viscosity requires a change in the shape of the aggregate, from circular to elliptic. Finally, molecular dynamics simulations allowed to estimate how variations in the bending modulus,  $k^B$ , can explain the observed tendency of the quadrupole splittings, on the basis of a modification in the flexibility of the aggregate.

Received 13th November 2015  
Accepted 4th January 2016

DOI: 10.1039/c5ra24019k

www.rsc.org/advances

### 1 Introduction

Synovial liquid plays a crucial role as a natural lubricant and shock absorption of articular joints such as hips, shoulders and knees, where an optimal lubrication is required for the proper joint mobility and a reduction in cartilages degradation.<sup>1,2</sup> In this regard, a deficiency in hyaluronic acid as a consequence of degradation in chronic diseases, such as osteo-arthritis and rheumatoid-arthritis, reduces the lubrication ability of synovial liquid, increasing the wearing of cartilages in knees, shoulders and hips.<sup>1–5</sup> Furthermore, the sphingolipid and cholesterol composition of synovial liquid have been investigated with the

goal of deciphering the role of these lipids in the lubrication of natural joints.<sup>1,2</sup>

By increasing the concentration of amphiphiles in aqueous solution above certain value, known as critical micellar concentration (CMC), it is possible to observe the formation of a variety of different molecular organizations or phases. The main forces that drive these aggregation processes are of hydrophobic and electrostatic nature. These materials have been used in the synthesis of silica and metals containing regularly oriented nanoporous,<sup>6–11</sup> to obtain oriented carbon nanotube materials,<sup>12–14</sup> as carriers in pharmaceutical formulations,<sup>15–17</sup> as membrane mimetics<sup>18–20</sup> and in lubrication applications.<sup>21</sup>

In this context, Kupchinov *et al.*<sup>4</sup> determined that synovial liquid contains about 2% nematic liquid crystals, to which important lubrication effects have been associated. The particular rheological properties and bio-compatibility of nematic lyotropic liquid crystals made of natural phospholipids makes them excellent candidates to be used as lubricants in joints of medical prosthesis for artificial implants and in potential therapeutic applications. Nematic lyotropic liquid crystals of finite size can be spontaneously generated in the laboratory

<sup>a</sup>Uni. de Chile, Fac. de Ciencias, Departamento de Química, Casilla 653, Santiago, Chile. E-mail: bweiss@uchile.cl

<sup>b</sup>Uni. Politécnica de Cartagena, Grupo de Bioinformática y Macromoléculas (BioMac), Campus de Alfonso XIII, Aulario II, 30203 Cartagena, Murcia, Spain. E-mail: javier.lopez@upct.es

<sup>c</sup>Uni. de Murcia, Fac. de Química, Dep. de Química Física, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

<sup>d</sup>CIC biomaGUNE, Biofunctional Nanomaterials – Laboratory 6 Parque tecnológico de San Sebastián, Ed. Miramón 182, Guipúzcoa, 20009 Donostia – San Sebastián, Spain

<sup>e</sup>Uni. de Talca, Inst. de Química de Recursos Naturales, Casilla 747, Talca, Chile



when amphiphiles are dissolved in water in the presence of aliphatic alcohols and salt. Thus, at least two types of aggregates can be spontaneously generated: calamitic ( $N_C$ ) derived from hexagonal phases with prolate average symmetry, and discotic ( $N_D$ ), derived from the lamellar phase with oblate average symmetry.<sup>22–24</sup> Searching for the development of an artificial and bio-compatible nematic liquid crystal that can be used as lubricant in prosthetic joints for medical applications, and eventually as substitute of synovial liquid in certain therapeutic applications,<sup>25</sup> different liquid crystals have been prepared from the mixture of tetradecyltrimethyl ammonium chloride (TTAC), decanol (DeOH), a natural mixture of phospholipids (PL) extracted from soybean and sodium chloride (NaCl), all in aqueous solution. Few mg of fully deuterated sodium dodecylsulphate (SDS- $d_{25}$ ) were added as a probe to test for the mobility of the aliphatic chains towards the interior of the hydrophobic core. The main advantage of using these liquid crystals as lubricant is that it is possible to modulate its lubricating power. In effect, an increase of 30% w/w in TTAC content, produces a more than 24-fold increase in the solution viscosity. Thus, small variations in TTAC composition allows to modulate the lubricating properties of the solution within a wide range of values.

In this article, we focused our efforts on explaining how the kinematic viscosity of the liquid crystal is related to the size, shape and flexibility of the molecular aggregate. To characterize the structure of the aggregates, different experimental and theoretical studies have been carried out. Thus, to observe the order degree of the molecular packing along the aliphatic chains of the aggregate, a  $^2\text{H}$ -NMR study was performed in the presence of SDS- $d_{25}$ , used as molecular probe. The kinematic viscosity of the solutions were measured at 298 K in all the studied concentration range. To explore the shape and size of the molecular aggregates, Transmission Electron Microscopy (TEM), freeze fracture transmission electron microscopy (FF-TEM) and Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM) images of selected samples were obtained. To assist with the characterization of the phases, polarized light microscopy (PLM) textures were also observed. With the aim of obtaining detailed insights into the properties of these liquid crystals, several molecular dynamics (MD) simulations were carried out with atomic detail. Finally, on the basis that our MD simulations are not capable to provide information related with the molecular rearrangements that should take place to explain the increase in viscosity with the increase in TTAC, a hydrodynamic modeling study was performed to explain the experimental observations.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Mesophase preparation

PL from soybean, SDS- $d_{25}$ , TTAC and DeOH were purchased from Aldrich and used as received. Water of HPLC grade and NaCl at the highest purity available were purchased from Merck and used as received. The liquid crystal solutions were prepared by initially dissolving 0.2140 g of TTAC, 0.1165 g of PL, 0.012 g of SDS- $d_{25}$ , 0.0912 g of NaCl and 58  $\mu\text{l}$  of DeOH in 1 ml of  $\text{H}_2\text{O}$ .

Furthermore, the TTAC concentration was increased up to a total of 0.2930 g of TTAC, maintaining the other components constant. This TTAC content corresponds the range of TTAC concentrations in which the liquid crystal generated exists. All mesophases were allowed to equilibrate at least 48 hours at 300 K before any measurements were made. These mesophases displayed thermal stability up to 315 K.

### 2.2 $^2\text{H}$ -NMR spectra

All NMR spectra were obtained at 300 K in a Bruker Avance 400 NMR spectrometer, located at the Universidad de Santiago de Chile, using a broadband probe tuned to 61.425 MHz. The  $^2\text{H}$  90° pulse was 19  $\mu\text{s}$  long and more than 1000 transients from a spectral window of 40 kHz were accumulated in 32 kB files.

### 2.3 Polarized light microscopy (PLM) and viscosity ( $\eta$ )

A Motic series B microscope equipped with crossed polarizers was employed to observe the textures. The samples were placed in a concave slide with a depth of 1 mm and were allowed to orient in a 2.35 T magnet for 15 min; longer periods in the field had no effects on the textures. The photos were taken at 300 K with a 20-fold magnification, from the center of the concavity, avoiding variations in the thickness of the sample due to the curvature of the slide.

Kinematic viscosities of the liquid crystals,  $\eta$ , were measured using a standard Ubbelohde viscometer at 298 K and 1 atmosphere. Within the range of TTAC content, a noticeable change in the slope of the plot viscosity vs. TTAC concentration was observed. This is attributed to a change of phase and is corroborated with the PLM textures modification, observed at the same TTAC concentration. In this context, an special interest was paid on the following three experimental samples, which correspond to different phases of the synthesized liquid crystals:

Sample 1: this sample was prepared with 0.2250 g of TTAC, 0.1165 g of PL, 0.012 g of SDS- $d_{25}$ , 0.0912 g of NaCl and 58  $\mu\text{l}$  of DeOH in 1 ml of  $\text{H}_2\text{O}$ .

Sample 2: this sample was prepared with 0.2930 g of TTAC, 0.1165 g of PL, 0.012 g of SDS- $d_{25}$ , 0.0912 g of NaCl and 58  $\mu\text{l}$  of DeOH in 1 ml of  $\text{H}_2\text{O}$ . In summary, this phase was prepared starting from sample 1 in which the TTAC content was increased by 30% w/w and the rest of the components were maintained constant.

Sample 3: this sample was prepared with 0.2250 g of TTAC, 0.1165 g of PL, 0.012 g of SDS- $d_{25}$ , 0.1048 g of NaCl and 58  $\mu\text{l}$  of DeOH in 1 ml of  $\text{H}_2\text{O}$ . We note that sample 3 and 1 are of equal composition except that the NaCl content was increased by 15% w/w.

### 2.4 Transmission electron microscopy (TEM)

TEM images were collected with a JEOL JEM-1400PLUS instrument operating at 120 kV, using carbon coated 400 square mesh copper grids. Samples were drop casted onto the TEM grids.



## 2.5 Freeze fracture transmission electron microscopy (FF-TEM)

FF-TEM samples were prepared according to a previously described methodology.<sup>26</sup> The solution was deposited between two copper platelets using a 400-mesh gold grid spacer. The samples were frozen by immersion in liquid propane, at  $-189\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and fractured at  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $10^{-8}$  mbar in a BAF 060 freeze-etching system (Leica Microsystems, Vienna). The replicas were obtained by unidirectional shadowing at  $45^{\circ}$  with 2 nm of Pt/C and at  $90^{\circ}$  with 20 nm of C; they were floated on distilled water during 5 min and observed at 120 kV in a Tecnai Spirit microscope (FEI Company, Eindhoven, Netherlands).

## 2.6 Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM)

Dipping and withdrawing a bare glow-discharged holey carbon grid from the solution a thin film was formed. The grid was blotted against filter paper, leaving thin sample films spanning the grid holes. These films were vitrified from room temperature by dipping into boiling ethane, using a Vitrobot (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). The sample was kept at 100% humidity before freezing. Then it was transferred to a Tecnai F20 microscope (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) using a Gatan cryoholder (Gatan, Pleasanton, CA). Images were taken at 200 kV, below  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ , using low-dose imaging conditions and an Eagle 4k  $\times$  4k CCD camera (FEI Company, Eindhoven, Netherlands).

## 2.7 Setting up the computational boxes

To explore the effects of TTAC concentration and ionic strength on the properties of these liquid crystals, we have performed 3 simulations, representing sample 1, 2 and 3 as bilayer fragments. Consequently, three computational boxes were generated, with periodic boundary conditions in all directions of space.

(1) System 1: this system was constituted by 392 tetradecyltrimethyl ammonium ion ( $\text{TTA}^+$ ) + 72 phosphatidylcholine (DOPC) + 32 phosphatidylethanolamine (POPE) + 200 DeOH + 32 dodecylsulphate ion ( $\text{DS}^-$ ) + 32 *cis*-10-octadecanoic acid (AOL) + 32 sodium ions ( $\text{Na}^+$ ) + 392 chloride ions ( $\text{Cl}^-$ ). We must mention in this point, that  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  are not balanced in the system, because they were introduced only for maintaining the electroneutrality of the system (392  $\text{Cl}^-$  are required to balance the 392  $\text{TTA}^+$  and 32  $\text{Na}^+$  are required to balance the 32  $\text{DS}^-$ ). The dimensions of the original computational box were 10.3, 10.3 and 9.5 nm for the *x*, *y*, and *z* axis, respectively, and the molecular ratios among  $\text{TTA}^+$ , DOPC, POPE, DeOH and  $\text{DS}^-$  were close to the experimental values. This computational box is a representation of the experimental sample 1 (see Section 2.3), corresponding to the liquid crystal with 0.2250 g of TTAC.

(2) System 2: in this system, the number of TTAC was increased by 30% with respect to system 1. Thus, the total number of molecules that constituted this system resulted as follows: 512  $\text{TTA}^+$  + 72 DOPC + 32 POPE + 200 DeOH + 32  $\text{DS}^-$  + 32 AOL + 32  $\text{Na}^+$  + 512  $\text{Cl}^-$ . The starting dimensions of the computational box were 12.2, 12.2 and 10.6 nm, for the *x*, *y* and

*z* axis, respectively. In this case, this computational box is a representation of the experimental sample 2 (see Section 2.3), which corresponds to the liquid crystal with 0.2930 g of TTAC.

(3) System 3: in this case, system 1 was simulated including NaCl at 1 M concentration. The dimensions of the starting computational box were 10.4, 10.4 and 9.6 nm, for the *x*, *y* and *z* axis, respectively. In this case, this computational box is a representation of the experimental sample 3 (see Section 2.3), which corresponds to the liquid crystal with 0.2250 g of TTAC (sample 1) with an increase in the ionic strength.

In all three systems described above, the species were symmetrically distributed between the two leaflets that constitute the bilayer. Fig. 1 shows a snapshot of system 1 and system 2 after 100 ns of trajectory.

## 2.8 MD simulation parameters

Once all three systems mentioned above were generated, the steepest descent minimization method was applied to remove the excess of energy associated with the overlapping between adjacent atoms. Once the energy achieved a minimum, 200 ns of trajectory length were simulated for each one of the systems previously described. GROMACS package 4.5.3 was used to carry out the molecular dynamics simulations. In this regard, an integration time step of 4 fs was employed. van der Waals interactions were simulated using the Lennard Jones potential (LJ), and long range electrostatic interactions were calculated using the Particle Mesh Ewald (PME) method.<sup>27,28</sup> In both cases, for the LJ and the electrostatic interactions, a cut-off of 1.2 nm was employed. The bond lengths were restrained using the LINCS algorithm.<sup>29</sup> All simulations were carried out in a NPT ensemble at 300 K and 1 atm, coupled to weak temperature and pressure baths algorithms,<sup>30</sup> with time constants of 0.1 ps and 1 ps for temperature and pressure, respectively. The Ryckaert-Bellemans potential<sup>31</sup> was used in all torsions along the

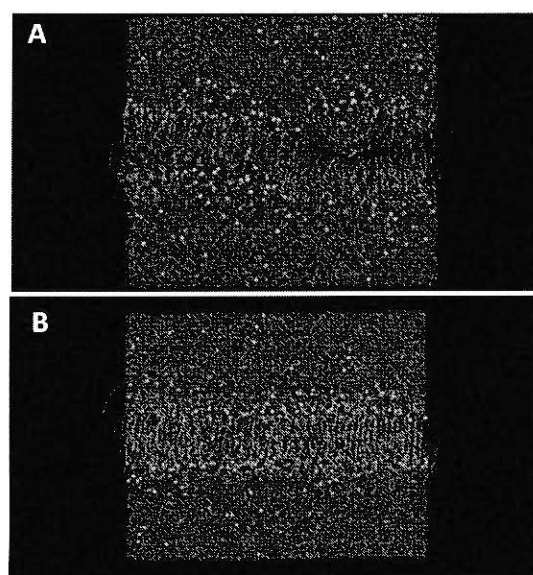


Fig. 1 Snapshots of the system 1 (A) and system 2 (B). For further information, see the text.



Table 1 CNDO atomic charges of all molecules involved in this study, according to the atom numeration of Fig. 2

Atom number	TTA <sup>+</sup>	DOPC	POPE	DeOH	DS <sup>-</sup>	AOL
1	0.400	0.40	0.645	0.426	-0.404	0.24
2	0.400	0.40	0.148	-0.722	-0.404	-0.24
3	0.400	0.40	0.005	0.329	-0.404	0.41
4	-0.500	-0.50	-0.383	-0.033	0.418	-0.304
5	0.300	0.30	0.447	0.0	-0.286	-0.106
6	0.0	0.40	-0.256	0.0	0.108	0.0
7	0.0	-0.80	-0.259	0.0	-0.028	0.0
8	0.0	1.70	-0.347	0.0	0.0	0.0
9	0.0	-0.80	0.060	0.0	0.0	0.0
10	0.0	-0.80	0.109	0.0	0.0	0.0
11	0.0	-0.70	-0.232	0.0	0.0	0.0
12	0.0	0.40	0.380	0.0	0.0	0.0
13	0.0	0.30	-0.344	—	0.0	0.0
14	0.0	-0.70	0.027	—	0.0	0.0
15	0.0	0.070	0.0	—	0.0	0.0
16	0.0	-0.70	0.0	—	0.0	0.0
17	0.0	0.0	0.0	—	0.0	0.0
18–21	—	0.0	0.0	—	—	0.0
22–30	—	0.0	0.0	—	—	0.0
31	—	0.0	0.121	—	—	—
32	—	0.0	-0.233	—	—	—
33	—	0.0	0.426	—	—	—
34	—	0.50	-0.341	—	—	—
35	—	-0.70	0.027	—	—	—
36	—	0.8	0.0	—	—	—
37	—	-0.6	0.0	—	—	—
38–53	—	0.0	0.0	—	—	—
Total charge	1.0	0.0	0.0	0.0	-1.0	0.0

aliphatic chains, for a better reproduction of *cis-trans* transitions.

The Lennard-Jones parameters were the same than those specified in a previous work,<sup>32</sup> along with the standard GRO-MOS 54a7 force field.<sup>33</sup> The atomic charges distribution of TTA<sup>+</sup>, DS<sup>-</sup>, DeOH, DOPC, POPE and AOL were calculated using the semi-empirical Complete Neglect of Differential Overlap (CNDO) method.<sup>34</sup> Table 1 shows the atomic charge distributions (in e units), considering the atom numeration of Fig. 2. Such as argued in a previous work,<sup>32</sup> the charge distributions of all species with net charge were halved, to consider the absence of polarizability in all molecules involved and the constancy of

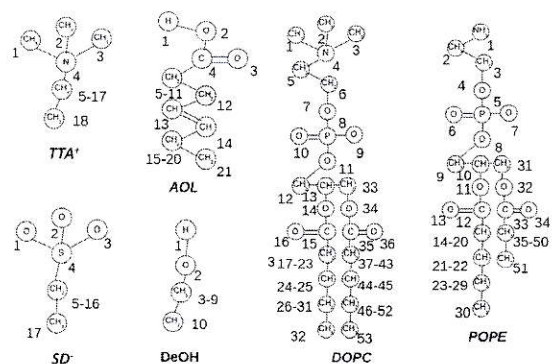


Fig. 2 Atoms numeration of all molecules involved in the simulations.

the dielectric medium.<sup>32,35–40</sup> Simple Point Charge (SPC) water model<sup>41</sup> was employed in all simulations.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Characterization of the molecular aggregates

Fig. 3 shows the <sup>2</sup>H-NMR spectra of SDS-d<sub>25</sub> dissolved in sample 1 (A) and in sample 2 (B). The presence and magnitude of the quadrupole splittings along with the line shape of both spectra, strongly suggests that the aggregates correspond to bilayer structured micelles with nematic order.<sup>42–46</sup> It is important to emphasize that these aggregates can not be spherical micelles since they can not generate <sup>2</sup>H-NMR quadrupole splittings.

Table 3 shows the experimentally measured quadrupole splittings of SDS-d<sub>25</sub> in samples 1, 2 and 3 (sample compositions were described in Section 2.3). A significant decrease in the splittings is observed when increasing the TTAC content, however both spectra are very similar. Accepting that in the range of studied concentrations the average orientation of the aggregate in the magnetic field is not modified, the value of the observed <sup>2</sup>H-NMR quadrupole splitting of a given C–D bond in a deuterated probe, such as SDS-d<sub>25</sub>, is a measurement of the alignment of that C–D bond with the spectrometer magnetic field; in other words it is representative of the mobility of the C–D bond. Therefore we can test for modifications in the dynamics of the aliphatic chains at different depths towards the interior of the hydrophobic core. A significant decrease in the general alignment is observed when augmenting the TTAC content. In addition, both mesophases display a region, near the interface, that shows similar mobility; in particular, this region increases from C1 to C5 in sample 1 to C1 to C7 in sample 2.

Despite the similarities between the <sup>2</sup>H-NMR spectra of sample 1 and sample 2, they present very different polarized light microscopy textures (see Fig. 3C and D). This observation evidences the existence of two different nematic mesophases, necessarily arising from structural changes in the aggregates. However, this change does not seem to affect the bilayer structure of the micelles, as evidenced from the <sup>2</sup>H-NMR spectra. The oily streaks texture observed in Fig. 3C usually appears as a consequence of homeotropic order, generally observed in lamellar phases, however, sometimes it is displayed by nematic discotic lyotropic liquid crystals, such as in this case. The texture observed in Fig. 3D is the typical schlieren texture, usually observed in nematic mesophases.<sup>47</sup> These textures can not arise from smectic phases since these phases display a <sup>2</sup>H-NMR spectrum typical of a powder pattern; smectic phases do not orient in the spectrometer magnetic field. All discussed evidence strongly suggest that the structure of the aggregates should be associated to some type of bilayer structured micelles.

Fig. 4 shows Cryo-TEM (A) and FF-TEM (B) images of sample 1. Both figures corroborate the existence of individual aggregates of finite size, strongly suggesting the presence of a nematic phase. In particular, aggregates of about 2 to 5 nm can be observed from both figures, however clusters of aggregates can also be observed, which could be the origin of the oily streaks observed in PLM. In an effort to experimentally explore variations in the size of the aggregates with the modification in



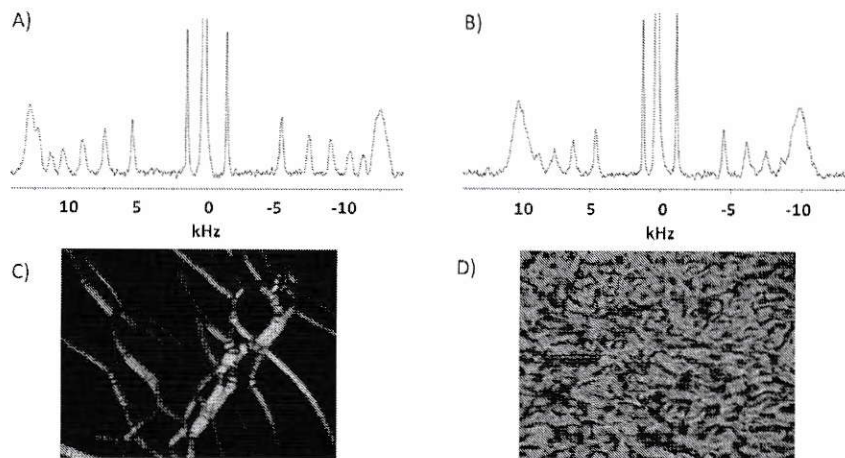


Fig. 3 (A) and (B) show the  $^2\text{H}$ -NMR spectrum of sample 1 and sample 2 (see Section 2.3) respectively. Quadrupolar splitting of SDS- $\text{d}_{25}$  can be measured directly from the spectra. (C) and (D) show polarized light microscopy textures observed in sample 1 and sample 2 respectively.

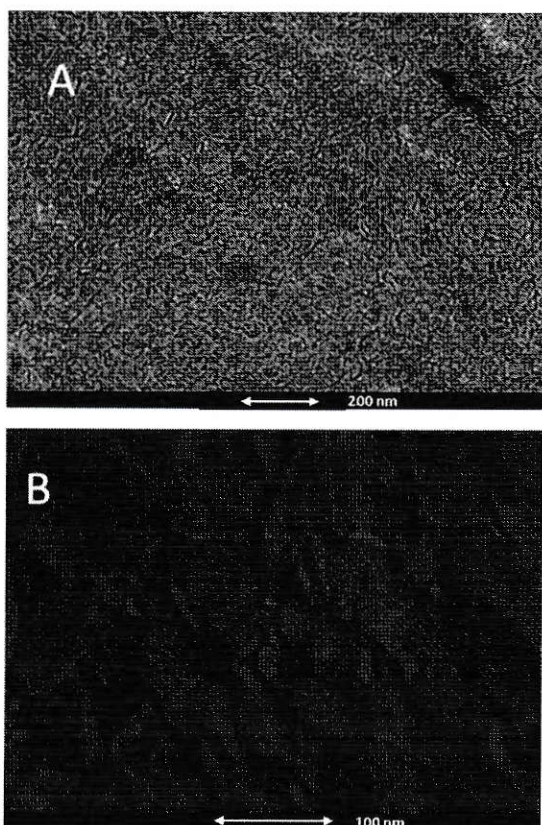


Fig. 4 (A) Cryo-TEM image of sample 1 and (B) FF-TEM image of sample 1. Sample compositions were described in Section 2.3.

TTAC content, TEM images of samples 1 and 2 were also obtained (Fig. 5). All TEM results, allow to discard the presence of lamellar or hexagonal smectic phases, usually surrounding the nematic region of the phase diagram.<sup>48</sup> A simple comparison of the images in Fig. 5A and B show that aggregates of roughly 10–20 nm are observed in sample 2, large when compared with the image of sample 1, in which aggregates of scarcely 1–2 nm diameter can be observed. These experimental results are in

excellent agreement with a hydrodynamic modeling calculation presented below.

### 3.2 Aggregate bending modulus ( $k^b$ )

The flexibility of the molecular aggregates that constitute the liquid crystal were estimated through the calculation of the bending modulus,  $k^b$ , defined as:<sup>49</sup>

$$k^b = \frac{K_A \xi^2}{24} \quad (1)$$

here  $\xi$  is called the *effective* bilayer thickness, defined by  $\xi = d - 1$  where  $d$  is the distance between the maxima of the nitrogen atom distributions of TTA<sup>+</sup> head-groups in both leaflets of the bilayer.  $K_A$  represents the area compressibility modulus, which is defined as follows:

$$K_A = \frac{k_B T A}{\sigma^2(A)} \quad (2)$$

where,  $A$  and  $\sigma^2(A)$  correspond to the mean and mean-squared fluctuation of the interfacial area per TTA<sup>+</sup>, respectively.  $k_B$  is the Boltzmann constant and  $T$  the absolute temperature. Table 3 shows the calculated bending modulus,  $k^b$ , using MD simulations.

Unfortunately, no experimental values to validate the bending modulus listed in Table 3 were found. However the values obtained here are in reasonable agreement with bending modulus obtained for lipid bilayers of different composition, where values from 15 to 30  $k_B T$  have been measured using X-ray,

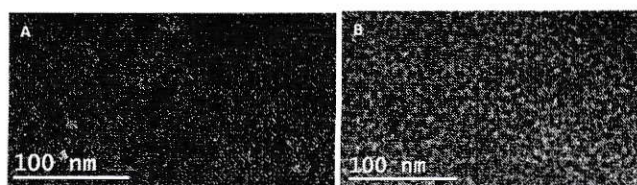


Fig. 5 TEM images corresponding to (A) sample 1 and (B) sample 2. Sample compositions were described in Section 2.3.



pipette aspiration and neutron spin echo experiments,<sup>50–54</sup> and from MD simulations.<sup>55</sup>

From the results shown in Table 3, we observe a reduction of more than 50% in the bending modulus of the bilayer with an increase of 30% w/w in TTAC content (or in other words, the flexibility of the aggregate becomes doubled with the increase in TTAC content). Furthermore, we observe how a moderate increase in ionic strength (which corresponds to system 3 of Section 2.7) produces less than 20% increment in the bending modulus, relative to system 1. Therefore, as expected, an increase in ionic strength produces a moderate increase in the stiffness of the bilayer, in good agreement with the experimental results reported by Claessens *et al.*<sup>56</sup> for a DOPG and DOPC bilayers at different ionic strength of the aqueous solution, and from molecular dynamics simulations of binary DPPC/DPPS bilayers in presence and absence of salt.<sup>55</sup> Thus, this increase in bending modulus in system 3 is related with the fact that an increase in the ionic strength produces an additional stabilization of the interface, as expected from a counterion neutralization, that is reflected into an increase in the stiffness of the molecular aggregates.

From Table 3 we see how this increase in flexibility in sample 2 respect to sample 1, arises mainly from a reduction in the thickness of the bilayer. This decrease is associated with an increase in the interdigitation degree of the TTA<sup>+</sup> hydrocarbon tails, since  $K_A$  and  $A$  both remained almost invariable for all three studied cases.

### 3.3 Viscosity

Fig. 6 shows the kinematic viscosity of the liquid crystal as a function of TTAC content in the composition window in which the liquid crystal remains, outside of this windows it changes to a different isotropic phase. From Fig. 6 we appreciate a change in the slope of the viscosity with TTAC composition at a certain critical concentration of TTAC. Thus, values of  $12.90 \pm 0.06$  and  $310 \pm 4$  mPa s were obtained for samples 1 and 2 respectively (see Section 2.3 for their composition). For the case of sample 3 (in which NaCl increased 15% w/w respect to the sample 1), a viscosity of  $10.28 \pm 0.06$  mPa s was measured, showing a moderate dependence on ionic strength. These results show an

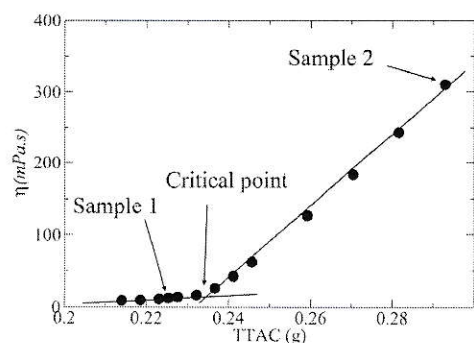


Fig. 6 Viscosity of the liquid crystal as a function of TTAC content (in grams) maintaining constant the rest of the components.

increase in the solution viscosity with TTAC content, where an increase in TTAC of scarcely 30% w/w in sample 1 produces an increase of more than 24 times in viscosity of sample 2 respect to the measured in sample 1. From Fig. 6, the composition at which the slopes change corresponding to 0.234 g in TTAC, is coincident with the concentration at which changes in the PLM textures were observed, corroborating the occurrence of a phase transition.

This change in the viscosity slope will be associated to a change in size and shape of the molecular aggregates, such as it will be discussed in the section below.

**3.3.1 Shape of molecular aggregates.** A factor to consider in the explanation of the notorious increase in viscosity of the solution with TTAC content is related with the size and shape of the molecular aggregates. For this purpose, a deeper study, based on changes in size and shape of the aggregates, is presented.

The intrinsic viscosity,  $[\eta]$ , provides information related to the shape and flexibility of the species dissolved, such as synthetic polymers, macromolecules, nanoparticles, aggregates or colloids,<sup>57,58</sup> where  $[\eta]$  can be written as follows:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_r - 1}{c} \quad (3)$$

being  $\eta_{sp}$  the specific viscosity of the micellar solution of concentration  $c$  (in this case  $c$  corresponds to the concentration of aggregates) and  $\eta_r$  is the relative viscosity calculated from the ratio,  $\eta_r = \eta/\eta_0$ , where  $\eta$  is the viscosity of the solution and  $\eta_0$  the viscosity of pure solvent.

Solomon-Ciuta<sup>59</sup> eqn (4), provides a relation between the intrinsic viscosity  $[\eta]$  of a solute and the viscosity  $\eta$  of the solution:

$$[\eta] = \frac{(2 \times (\eta_{sp} - \ln \eta_r))^{1/2}}{c} \quad (4)$$

where  $[\eta]$  is the intrinsic viscosity (or viscosity at infinite dilution) described above.

Therefore, the Solomon-Ciuta equation can be rewritten as follows:

$$[\eta]c = (2 \times (\eta_{sp} - \ln \eta_r))^{1/2} \quad (5)$$

The ratio between the intrinsic viscosities of two liquid crystals with different TTAC content can be calculated from eqn (6):

$$\frac{[\eta]_2 c_2}{[\eta]_1 c_1} = \frac{(2 \times (\eta_{sp,2} - \ln \eta_{r,2}))^{1/2}}{(2 \times (\eta_{sp,1} - \ln \eta_{r,1}))^{1/2}} \quad (6)$$

Assuming that  $\eta_0$  is the viscosity of pure water at 298 K ( $\eta_0 = 1$  mPa s), and  $\eta_1 = 12, 9$  mPa s and  $\eta_2 = 310, 2$  mPa s for samples 1 and 2 respectively, eqn (6) can be reduced to the following expression:

$$\frac{[\eta]_2 c_2}{[\eta]_1 c_1} = 5.7 \quad (7)$$

From results of TEM microscopy, and considering that the size of the molecular aggregates for sample 2 is roughly 10 times



bigger than for sample 1 and that TTAC composition increased scarcely a 30% w/w from sample 1 to sample 2, we can assume that  $c_1 \approx 10c_2$ , and then, eqn (7) can be re-written as follows,

$$\frac{[\eta]_2}{[\eta]_1} = 57.0 \quad (8)$$

In general, the intrinsic viscosity  $[\eta]$  depends on the shape and size of the macromolecule or colloid in solution. At this point, the main goal is try to reproduce the ratio between intrinsic viscosities for liquid crystals of different TTAC content, using hydrodynamic calculations based on molecular aggregates of different size and shape.

Thus, the program HYDRO<sup>60</sup> (available from <http://leonardo.inf.um.es/macromol>), allows to calculate a dimensionless intrinsic viscosity. A model composed of two layers of 244 hard spheres each, forming a circular monoaxial structure, such as the one depicted in Fig. 7 was constructed. For this model, an intrinsic viscosity of  $[\eta]_{1,circular}^* = 1.39$  (where the star means that we are working in dimensionless units) was calculated. To explain the increase in the viscosity of sample 2, the intrinsic viscosity was calculated for two different shapes, circular and elliptic (with a ratio in its semi-axes  $a/b = 20$ ), with 2440 hard spheres that reproduce an increase in the surface area 10 times bigger than the corresponding to the circular shape in sample 1. From these calculations, a  $[\eta]_{2,circular}^* = 6.25$  and  $[\eta]_{2,elliptic}^* = 75$  were obtained, which provide a  $[\eta]_{2,circular}^*/[\eta]_{1,circular}^* = 4.5$  and  $[\eta]_{2,elliptic}^*/[\eta]_{1,circular}^* = 54$ , considering that the aggregates adopt an circular and elliptic shape in sample 2. From these calculations, we can assert that the increase in TTAC content, not only increases the size but also induce changes in the shape of the molecular aggregates that form the liquid crystal, going from a circular to an elliptic symmetry, and that this change in the shape in the molecular aggregates is the main responsible of the increase in the viscosity of the liquid crystal.

### 3.4 <sup>2</sup>H-NMR study

Table 2 shows the <sup>2</sup>H-NMR quadrupole splittings ( $\Delta\nu_Q$ ) of SDS-d<sub>25</sub> dissolved in samples 1, 2 and 3 (samples details were described in Section 2.3).

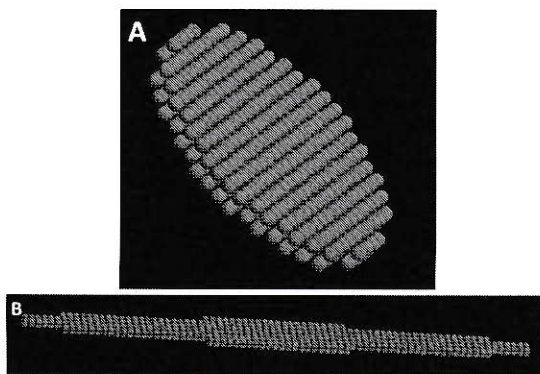


Fig. 7 Hydrodynamic models used in the estimation of  $[\eta]$ . (A) Circle and (B) ellipse with  $a/b = 20$ .

Table 2 Experimental values of <sup>2</sup>H-NMR quadrupole splittings ( $\Delta\nu_Q$ ) in Hz. Sample compositions were described in Section 2.3

Carbon	Sample 1, $\Delta\nu_Q$ (Hz)	Sample 2, $\Delta\nu_Q$ (Hz)	Sample 3, $\Delta\nu_Q$ (Hz)
1	25 371	20 153	25 232
2	25 371	20 153	25 232
3	25 371	20 153	25 232
4	25 371	20 153	25 232
5	25 371	20 153	25 232
6	24 783	20 153	24 489
7	22 734	20 153	22 564
8	20 750	17 386	20 663
9	18 016	15 094	17 951
10	14 815	12 371	14 710
11	10 852	9046	10 792
12	2889	2383	2854

Table 2 shows how the quadrupole splittings of SDS-d<sub>25</sub> significantly decreased with the increase in TTAC content. This indicates a significant decrease in the alignment of the aliphatic chains with the magnetic field, which could have different origins, including electrostatic repulsions among the ammonium head groups. On the other hand, an increase of 15% w/w in NaCl (sample 3) has no significant effect on the experimental splittings, showing that the integrity of aggregates does not depend markedly on ionic strength.

Values of  $\Delta\nu_Q$  obtained from <sup>2</sup>H-NMR are related to deuterium order parameters,  $S_{CD}$ , through the following expression:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3C\langle S_{CD} \rangle}{2} \quad (9)$$

$C$  is the quadrupole coupling constant ( $C = 170$  kHz (ref. 61)), and  $S_{CD}$  is the order parameter of a given C–D bond. Order parameters can be extracted directly from simulations, using eqn (10).

$$\langle S_{CD} \rangle = \frac{\langle 3 \cos^2 \phi - 1 \rangle}{2} \quad (10)$$

Here  $\phi$  is the angle between the C–D bond and the bilayer normal, and the average is carried out over the simulation time and the number of identical molecules in the computational box. However, and bearing in mind that hydrogens from methylene groups have not been explicitly considered, the order parameters corresponding to a given C–D bond, can be

Table 3 Compressibility ( $K_A$ ) and bending modulus ( $k^b$ ) for the bilayers of different TTAC content, in the presence and absence of salt, estimated from simulations.  $A$  corresponds to the mean surface area per TTA<sup>+</sup> and  $d$  is the average distance between nitrogen atoms of TTA<sup>+</sup> head groups located in different leaflets of the bilayer. Systems 1, 2 and 3 were described in Section 2.7

System	$A$ (nm <sup>2</sup> )	$d$ /nm	$K_A$ /(J m <sup>-2</sup> )	$k^b$ /(k <sub>B</sub> T)
1	$0.5361 \pm 0.0007$	3.7	$0.181 \pm 0.019$	$12.9 \pm 1.4$
2	$0.574 \pm 0.003$	2.6	$0.25 \pm 0.06$	$6.1 \pm 1.4$
3	$0.537 \pm 0.007$	3.8	$0.24 \pm 0.08$	$16 \pm 3$



**Table 4** Calculated values of  $^2\text{H}$ -NMR quadrupole splittings ( $\Delta\nu_Q$ , Hz) from MD simulations. Systems 1, 2 and 3 were described in Section 2.7

Carbon	System 1, $\Delta\nu_Q$ (Hz)	System 2, $\Delta\nu_Q$ (Hz)	System 3, $\Delta\nu_Q$ (Hz)
1	25 467 $\pm$ 525	24 975 $\pm$ 816	24 183 $\pm$ 391
2	25 639 $\pm$ 663	25 596 $\pm$ 844	25 483 $\pm$ 589
3	26 260 $\pm$ 670	26 415 $\pm$ 1110	26 721 $\pm$ 559
4	26 651 $\pm$ 678	26 414 $\pm$ 1254	27 390 $\pm$ 583
5	26 858 $\pm$ 716	26 949 $\pm$ 1360	27 600 $\pm$ 622
6	26 652 $\pm$ 659	27 162 $\pm$ 1354	27 566 $\pm$ 692
7	25 699 $\pm$ 647	27 067 $\pm$ 1439	27 299 $\pm$ 717
8	25 268 $\pm$ 619	26 755 $\pm$ 1390	26 864 $\pm$ 690
9	23 572 $\pm$ 568	26 091 $\pm$ 1388	26 019 $\pm$ 711
10	20 904 $\pm$ 410	24 831 $\pm$ 1236	24 489 $\pm$ 586
11	16 389 $\pm$ 223	22 688 $\pm$ 1020	21 038 $\pm$ 557

calculated employing a well described methodology, exhaustively explained elsewhere.<sup>32,38</sup> Consequently, order parameter for C<sub>12</sub>-D bond can not be calculated. Table 4 shows the quadrupole splittings obtained from simulations, corresponding to the systems 1, 2 and 3 (described in Section 2.7) which correlate with the experimental samples 1, 2 and 3 described in Section 2.3.

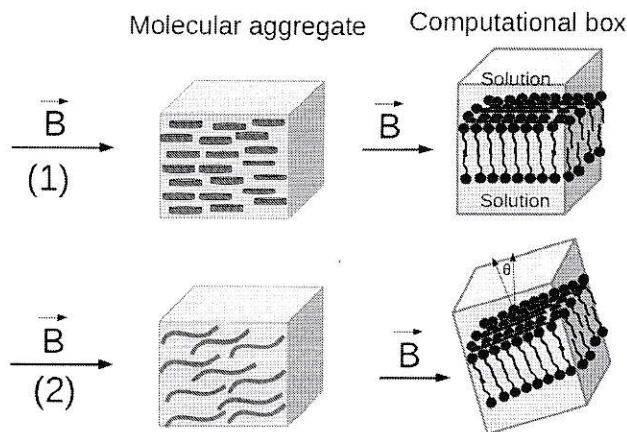
An inspection to Tables 2 and 4 shows that a semi-quantitative agreement between calculated splittings of SDS-d<sub>25</sub> in system 1 and the experimental measured values in sample 1, is obtained for the first few carbon atoms of the aliphatic chain, near the interface. However, a significant deviation emerged when we look at the last C-D bonds of the chain. This discrepancy could arise either from the fact that our simulations corresponds to bilayer fragments, neglecting completely the curved rims which can be particularly important for small aggregates, or from molecules present as impurities in the PL mixture, which perturb the order of the hydrophobic core.

The observed  $^2\text{H}$  quadrupole splitting along the SDS-d<sub>25</sub> tail are not significantly altered by an increase in the solution ionic strength, as shown in Table 2 for samples 1 and 3. This behavior is reproduced by the simulation, as shown in Table 4, for systems 1 and 3 respectively.

As mentioned before, comparing systems 1 and 2 with their corresponding experimental samples 1 and 2, a noticeable

**Table 5** Calculated values of  $^2\text{H}$ -NMR quadrupole splittings ( $\Delta\nu_Q$ , Hz) of system 2 (see Section 2.7 for different tilt angles with respect to the Z axis: (a) 0°, (b) 10° (c) 15° and (d) 20°)

Carbon	( $\Delta\nu_Q$ (Hz)) <sup>a</sup>	( $\Delta\nu_Q$ (Hz)) <sup>b</sup>	( $\Delta\nu_Q$ (Hz)) <sup>c</sup>	( $\Delta\nu_Q$ (Hz)) <sup>d</sup>
1	24 183 $\pm$ 391	21 302 $\pm$ 1211	18 440 $\pm$ 1425	14 845 $\pm$ 1718
2	25 483 $\pm$ 589	22 557 $\pm$ 1354	19 603 $\pm$ 1575	15 917 $\pm$ 1882
3	26 721 $\pm$ 559	23 633 $\pm$ 1268	20 525 $\pm$ 1465	16 645 $\pm$ 1752
4	27 390 $\pm$ 583	24 229 $\pm$ 1253	21 048 $\pm$ 1455	17 080 $\pm$ 1755
5	27 600 $\pm$ 622	24 448 $\pm$ 1237	21 235 $\pm$ 1433	17 226 $\pm$ 1726
6	27 566 $\pm$ 692	24 381 $\pm$ 1231	21 178 $\pm$ 1423	17 183 $\pm$ 1720
7	27 299 $\pm$ 717	24 132 $\pm$ 1246	20 955 $\pm$ 1436	16 943 $\pm$ 1724
8	26 864 $\pm$ 690	23 733 $\pm$ 1199	20 599 $\pm$ 1393	16 695 $\pm$ 1681
9	26 019 $\pm$ 711	22 960 $\pm$ 1183	19 910 $\pm$ 1368	16 115 $\pm$ 1646
10	24 489 $\pm$ 586	21 596 $\pm$ 1123	18 720 $\pm$ 1298	15 146 $\pm$ 1561
11	21 038 $\pm$ 557	18 524 $\pm$ 1063	16 036 $\pm$ 1217	12 942 $\pm$ 1443



**Fig. 8** Orientation of the aggregate with respect to the magnetic field direction. (1) Represents the orientation of stiff aggregates with oblate shape perfectly orientated in the magnetic field. (2) Represents distorted flexible aggregates with an elliptic shape, partially orientated with respect to the magnetic field.

discrepancy between simulation and experiment arises. Experimentally it is observed how a moderate increase in TTAC content produces a reduction of about 19% in the quadrupole splitting for the first methylene groups of SDS-d<sub>25</sub>. This results clearly diverge from the results obtained from simulations, in which the same increase in TTAC content, produces no variation in the quadrupole splittings of the first C-D bonds, but a significant increment at the interior of the hydrophobic core.

This discrepancy between experiment and simulation can be explained on the basis of changes in the shape and flexibility of the aggregates when increasing the TTAC content, such as it was deduced in the previous Sections 3.2.1 and 3.2.2. Therefore, due to the increase in size and symmetry modifications of the aggregate, to a larger and elongated shape, there appear collective motions, similar to undulations observed in extended lamellar phases, which could increase the mobility of all C-D bonds, decreasing the quadrupole splittings without affecting their average orientation. Thus, to explore the effect of undulations on  $\Delta\nu_Q$ , values of  $\Delta\nu_Q$  have been recalculated considering four different tilt angles between the C-D bonds and the magnetic field, and the results are displayed in Table 5. It is observed that an angle deviation of  $\approx 15^\circ$ , such as it is represented in Fig. 8, is sufficient to reduce the values of  $\Delta\nu_Q$  close to the experimental values, as observed from Table 5. Therefore, undulations with oscillations of  $15^\circ$  amplitude around the average orientation should be enough to explain the decrease in  $\Delta\nu_Q$ . This result evidences how considerations of flexibility and size of the molecular aggregates are of crucial importance for the correct interpretation of the experimental data.

## 4 Conclusions

The use of molecular dynamics in conjunction with hydrodynamic calculations have proven to be very useful in the interpretation of the experimental results.



From the change in the slope of the plot of kinematic viscosity vs. TTAC content, a phase transition process between different bilayer structured aggregates is evidenced. Additional experimental evidence to support this hypothesis arises from the observation of PLM texture modification, at the same concentration where the slope of viscosity vs. TTAC content is observed. Cryo-TEM, FF-TEM and room temperature TEM images point in the same direction.

Hydrodynamic calculations support a phase transition from disk shaped mono-axial aggregates to bigger elliptic shaped bi-axial aggregates, explaining the viscosity increase. A decrease in bending modulus going from system 1 to system 2 is predicted by MD simulations. This increase in flexibility, which arises from the inter-digitation of TTA<sup>+</sup> hydrocarbon chains, also contributes to increase the viscosity.

Finally, the increase in size and flexibility of the aggregates allows collective motions to occur, which decreases the alignment of the C–D bonds with the magnetic field, decreasing the values of  $\Delta\nu_Q$ . MD simulations indicates that oscillation amplitudes which deviates by 15° the alignment with the field, should be sufficient to explain the observed splittings.

## Acknowledgements

The authors are pleased to acknowledge financial support from Fondecyt-Chile (Grant No. 1150135), Universidad de Chile (VID Grant ENL-003 and Facultad de Ciencias). The authors also acknowledge the invaluable assistance from the staff and facilities at the Computing Center of the Universidad Politécnica de Cartagena and the National Laboratory for High Performance Computing (NLHPC), Universidad de Chile. ARRF acknowledges a doctoral fellowship from Conicyt. JJLC acknowledges the financial support from Fundación Séneca (19353/PI/14).

## References

- 1 S. Sivan, A. Schroeder, G. Verberne, Y. Merkher, D. Diminsky, A. Prieu, A. Maroudas, G. Halperin, D. Nitzan, I. Etsion and Y. Barenholz, *Langmuir*, 2009, **26**, 1107–1116.
- 2 M. Knosinska, G. Liebisch, G. Lochnit, J. Wilhelm, H. Klein, U. Kaesser, G. Lasczkowski, M. Rickert, G. smitz and J. Steinmeyer, *PLoS One*, 2014, **9**, e91769.
- 3 E. Waters, P. Spedding, A. Doherty and R. Spedding, *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, 2009, **4**, 80–89.
- 4 B. Kupchinov, S. Ermakov, V. Rodnenkov, S. Bobrysheva, E. Beloenko and V. Kestelman, *Smart Mater. Struct.*, 1993, **2**, 7–12.
- 5 C. Myant and P. Cann, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2014, **34**, 338–348.
- 6 A. Takai, Y. Yamauchi and K. Kuroda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **132**, 208–214.
- 7 S. Warren and U. Wiesner, *Pure Appl. Chem.*, 2009, **81**, 73–84.
- 8 X. Zhang, W. Lu, J. Dai, L. Bourgeois, J. Yao, H. Wang, J. Friend, D. Zhao and D. MacFarlane, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 7420.
- 9 S. Che, Z. Liu, T. Ohsuna, K. Sakamoto, O. Terasaki and T. Tatsumi, *Nature*, 2004, **429**, 281–284.
- 10 H. Lin and C. Mou, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 927–935.
- 11 S. Umadevi, H. Lee, V. Ganesh, X. Feng and T. Hegmann, *Liq. Cryst.*, 2014, **41**, 265–276.
- 12 G. Scalia, *ChemPhysChem*, 2010, **11**, 333–340.
- 13 D. Vijayaraghavan, *J. Mol. Liq.*, 2014, **199**, 128–132.
- 14 M. Casavant, D. Walters, J. Schmidt and R. Smalley, *J. Appl. Phys.*, 2003, **93**, 2153–2156.
- 15 M. Cohen-Avrahami, A. Shames, M. Ottaviani, A. Aserin and N. Garti, *Colloids Surf., B*, 2014, **122**, 231–240.
- 16 C. Guo, J. Wang, F. Cao, R. Lee and G. Zhai, *Drug Discovery Today*, 2010, **15**, 1032–1040.
- 17 M. Ki, J. Lim, J. Ko, S. Park, J. Kim, H. Cho, E. Park and D. Kim, *J. Controlled Release*, 2014, **185**, 62–70.
- 18 V. Bahamonde-Padilla, J. López-Cascales, R. Araya-Maturana, M. Martínez-Cifuentes and B. Weiss-López, *ChemPhysChem*, 2014, **15**, 1422–1431.
- 19 U. Dürr, M. Gildenberg and A. Ramamoorthy, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 6054–6074.
- 20 D. Warschawski, A. Arnold, M. Beaugrand, A. Gravel, É. Chartrand and I. Marcotte, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2011, **1808**, 1957–1974.
- 21 L. Pinchuk, Y. Chernyakova and V. Goldade, *J. Frict. Wear*, 2008, **29**, 224–233.
- 22 A. Nesrullajev, F. Tepehan and N. Kazanci, *Mater. Chem. Phys.*, 2002, **73**, 74–77.
- 23 R. Montecinos, H. Ahumada, R. Araya-Maturana, A. Olea and B. Weiss-López, *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **316**, 126–131.
- 24 A. Neto and S. Salinas, *The Physics of Lyotropic Liquid Crystals: Phase Transitions and Structural Properties: Phase Transitions and Structural Properties*, Oxford University Press, 2005.
- 25 J. Lagerwall and G. Scalia, *Curr. Appl. Phys.*, 2012, **12**, 1387–1412.
- 26 O. López, A. de la Maza, L. Coderch, C. López-Iglesias, E. Wehrli and J. Parra, *FEBS Lett.*, 1998, **426**, 314–318.
- 27 T. Darden, D. York and L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 10089–10092.
- 28 U. Essmann, L. Perera, M. Berkowitz, T. Darden, H. Lee and L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, 1995, **103**, 8577–8593.
- 29 B. Hess, H. Bekker, H. Berendsen and J. Fraaije, *J. Comput. Chem.*, 1997, **18**, 1463–1472.
- 30 H. Berendsen, J. Postma, W. van Gunsteren, A. DiNola and J. Haak, *J. Chem. Phys.*, 1984, **81**, 3684–3690.
- 31 J. Ryckaert and A. Bellemans, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 1978, 95–106.
- 32 V. Bahamonde-Padilla, J. Espinoza, B. Weiss-Lopez, J. L. Cascales, R. Montecinos and R. Araya-Maturana, *J. Chem. Phys.*, 2013, **139**, 14703–14711.
- 33 N. Schmid, A. Eichenberger, M. Winger, A. Mark and W. van Gunsteren, *Eur. Biophys. J.*, 2011, **7**, 843–856.
- 34 J. Pople and G. Segal, *J. Chem. Phys.*, 1966, **44**, 3289.
- 35 B. Jonsson, O. Edholm and O. Teleman, *J. Chem. Phys.*, 1986, **85**, 2259–2271.
- 36 E. Egberts, S. Marrink and H. Berendsen, *Eur. Biophys. J.*, 1994, **22**, 423–436.
- 37 P. Ahlstrom and H. Berendsen, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 13691–13702.



- 38 J. J. López Cascales, J. García de la Torre, S. Marrink and H. Berendsen, *J. Chem. Phys.*, 1996, **104**, 2713–2720.
- 39 P. David, W. van Gunsteren and A. Mark, *J. Comput. Chem.*, 2010, **31**, 1117–1125.
- 40 T. Heinz, W. van Gunsteren and P. Hünenberger, *J. Chem. Phys.*, 2001, **115**, 1125–1136.
- 41 H. Berendsen, J. Postma, W. van Gunsteren and J. Hermans, *Intermolecular Forces*, D. Reidel Publishing Company, 1981.
- 42 G. Raffard, S. Steinbruckner, A. Arnold, J. H. Davis and E. J. Dufourc, *Langmuir*, 2000, **16**, 7655–7662.
- 43 L. S. Vermeer, B. L. de Groot, V. Réat, A. Milon and J. Czaplicki, *Eur. Biophys. J.*, 2007, **36**, 919–931.
- 44 M. Bloom, J. H. Davis and A. L. Mackay, *Chem. Phys. Lett.*, 1981, **80**, 198–202.
- 45 *Biological Membranes. A Molecular Perspective from Computation and Experiment*, ed. K. Merz and B. Roux, Birkhäuser, Boston, 1996.
- 46 M. Brown, R. Thurmond, S. Dodd, D. Otten and K. Beyer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 8471–8484.
- 47 H. Stegemeyer and H. Behret, *Liquid Crystals*, Steinkopff, 1994.
- 48 A. A. de Melo Filho, A. Laverde and F. Y. Fujiwara, *Langmuir*, 2003, **19**, 1127–1132.
- 49 M. Orsi, D. Haubertin, W. Sanderson and J. Essex, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 802–815.
- 50 N. Chu, N. Kucerka, Y. Liu, S. Tristram-Nagle and J. Nagle, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2005, **71**, 71.041904.
- 51 W. Rawicz, K. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham and E. Evans, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 328–339.
- 52 H. Petrache, S. Tristram-Nagle, K. Gawrisch, D. Harries, V. Parseguian and J. Nagle, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 1574–1586.
- 53 J. Pan, S. Tristram-Nagle, N. Kucerka and J. Nagle, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 117–124.
- 54 H. Seto, N. Yamada, M. Nagao, M. Hishida and T. Takeda, *Eur. Phys. J. E: Soft Matter Biol. Phys.*, 2008, **26**, 217–223.
- 55 J. J. Lopez Cascales, S. D. Oliveira Costa, A. Garro and R. D. Enriz, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 11743–11750.
- 56 M. Claessens, B. van Oort, F. Leermakers, F. Hoekstra and M. C. Stuart, *Biophys. J.*, 2004, **87**, 3882–3893.
- 57 H. Elias, *Macromolecules: structure and properties*, Plenum Press, 1984, vol. 1, p. 7420.
- 58 S. Harding, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1997, **68**, 207–262.
- 59 R. Pamies, J. H. Cifre, M. L. Martínez and J. de la Torre, *Colloid Polym. Sci.*, 2008, **286**, 1223–1231.
- 60 J. García de la Torre, S. Navarro, M. L. Martínez and J. J. López Cascales, *Biophys. J.*, 1994, **67**, 530–531.
- 61 A. Seelig and J. Seelig, *Biochemistry*, 1974, **13**, 4839–4845.

## PAPER



# Composition effect on the aggregate/solution interface of a nematic lyotropic liquid crystal†

A. R. Ruiz-Fernández,<sup>ac</sup> J. J. López-Cascales,<sup>\*c</sup> J. J. Giner-Casares,<sup>b</sup>  
R. Araya-Maturana,<sup>d</sup> F. G. Díaz-Bañós<sup>e</sup> and B. E. Weiss-López<sup>\*a</sup>

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 85411

Received 25th May 2016  
Accepted 12th August 2016

DOI: 10.1039/c6ra13597h

www.rsc.org/advances

Lyotropic nematic liquid crystals (Inlc) have attracted attention due to their resemblance to natural membranes and several technological applications. The effect of tetradecyltrimethyl ammonium chloride (TTAC) in the viscosity of a new Inlc containing also decanol, NaCl and natural lipids, was studied. In this article we study how the concentration of phospholipids, decanol and NaCl affects the bilayer and the liquid crystal/solution interface structures. <sup>2</sup>H-NMR quadrupole splittings and longitudinal relaxation times of several deuterated species were measured. Polarized light microscopy, transmission electron microscopy and kinematic viscosity measurements were also obtained. The structure of the bilayer is dominated by the surface charge density of TTAC. Water rotation, translation and ion solvation depend on the charge and distance from the interface. With increasing TTAC, MD predicts hydrocarbon chain inter-digitation and lipid rafts formation. This was rationalized using energy arguments.

## 1 Introduction

Different lyotropic liquid crystalline phases result from the self-assembly of amphiphilic molecules, such as lipids and surfactants in water when their concentration achieves a certain value because of hydrophobic and electrostatic interactions.<sup>1–4</sup> In this context, water plays a crucial role in regulating the forces that drive the formation of these molecular aggregates. Different properties such as <sup>2</sup>H-NMR quadrupole splitting ( $\Delta\nu_q$ ), the longitudinal relaxation time ( $T_1$ ), water re-orientation, the translational diffusion coefficient and ion solvation, among others, can be modified by changes in the composition of the aggregate/solvent interface. For instance, different types of water molecules, in terms of their physico-chemical properties, are expected in the solution, depending on their distance from the interface, and it is very likely that the structure of the bilayer itself is also affected by its composition.

A new nematic lyotropic liquid crystal formed by tetradecyltrimethyl ammonium chloride (TTAC), decanol (DeOH),

sodium dodecyl sulphate (SDS), sodium chloride (NaCl) and a natural mixture of lipids extracted from soybean (PL), constituted mostly by phosphatidylcholine (DOPC) and phosphatidylethanolamine (POPE), all dissolved in water, has been previously prepared. This nematic liquid crystal shows that variations of about 30% w/w in TTAC content continuously increase the magnitude of the viscosity by more than 24 times, making them suitable for certain biomedical applications as lubricants for artificial implants in hips, shoulders and knees, and certain therapies against osteo-arthritis or rheumatoid-arthritis diseases.<sup>5</sup> Therefore, since the effects of TTAC content on the structure and dynamics of the aggregate itself were already studied,<sup>5</sup> in this work we explore the consequences of introducing variations in DeOH, PL and NaCl content on the structures of the bilayer and the interface.  $\Delta\nu_q$  and  $T_1$  from DHO and  $\Delta\nu_q$  from DeOH- $\alpha$ -d<sub>2</sub>, were measured to explore the dynamics near the interface, mainly to locate the phase transitions.  $\Delta\nu_q$  and  $T_1$  from DHO and SDS-d<sub>25</sub> were measured in selected samples, to probe the dynamics at the interface and towards the interior of the hydrophobic core. Transmission electron microscopy (TEM) and polarized light microscopy (PLM) images of representative compositions were also obtained. Because the structure of the molecular aggregates that form the liquid crystal appears to be very dependent on the surface charge density provided by TTA<sup>+</sup>, here we study how it affects solvent properties going from the interface to the bulk aqueous solution. Effectively, water dynamic properties such as the diffusion coefficient, rotational correlation time and ion solvation, were obtained from previously simulated trajectories. To validate the molecular dynamics simulations,  $T_1$  values of DHO were measured and the results compared with values

<sup>a</sup>Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Casilla 653, Santiago, Chile. E-mail: bweiss@uchile.cl

<sup>b</sup>CIC biomaGUNE, Biofunctional Nanomaterials – Laboratory 6 Parque tecnológico de San Sebastián, Ed. Miramón 182, 20009 Donostia – San Sebastián, Guipúzcoa, Spain

<sup>c</sup>Universidad Politécnica de Cartagena, Grupo de Bioinformática y Macromoléculas (BioMac), Area de Química Física Aulario II, Campus de Alfonso XIII, 30203 Cartagena, Murcia, Spain. E-mail: javier.lopez@upct.es

<sup>d</sup>Universidad de Talca, Instituto de Química de Recursos Naturales, Casilla 747, Talca, Chile

<sup>e</sup>Univ. de Murcia, Fac. de Química, Dep. de Química Física, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ra13597h



obtained from simulation. Finally, the effect of variations in TTAC composition on the structures of the bilayer and interface were examined as well.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Mesophase preparation

TTAC, SDS, SDS- $d_{25}$ ,  $D_2O$ , DeOH and the PL mixture were purchased from Aldrich. Water of HPLC grade and NaCl at 99.8% purity were purchased from Merck. All reagents were used as received.

DeOH- $\alpha$ - $d_2$  was synthesized by reduction of ethyl decanoate ester with  $LiAlD_4$  and purified by vacuum distillation. 5% w/w  $D_2O$  was added to the solvent to provide  $^2H$ -NMR signal from DHO. For a detailed characterization of the dynamics towards the interior of the hydrophobic core, SDS was replaced by SDS- $d_{25}$  in selected samples.

In order to explore concentration effects on the interface properties, from components not studied before, we have prepared three series of samples, one for DeOH, one for PL and a third series extending the range of the NaCl concentration. Consequently, a series of 4 samples containing 0.2253 mg TTAC, 0.0912 mg NaCl, 0.0481 mg DeOH, 0.012 mg SDS and 0.0466, 0.0816, 0.1165 and 0.1400 mg PL, were dissolved in 1 ml of water each. Similarly, a second series of 4 samples containing 0.1165 mg PL, 0.2253 mg TTAC, 0.0912 mg NaCl, 0.012 mg SDS and 0.0351, 0.0442, 0.0506 and 0.0547 mg of DeOH was prepared. Finally, a third series of 4 samples containing 0.1165 mg PL, 0.2253 mg TTAC, 0.0481 mg DeOH, 0.012 mg SDS and 0.0623, 0.0771, 0.0912 and 0.1070 mg NaCl each, was also prepared. All mentioned samples contained DeOH- $\alpha$ - $d_2$  and  $D_2O$ . Selected samples, representative of the different phases found, were reproduced by using DeOH and SDS- $d_{25}$  instead of DeOH- $\alpha$ - $d_2$  and SDS.

Before any measurement was performed, all mesophases were allowed to equilibrate at least 48 hours at either 300 K or 298 K, for NMR or kinematic viscosity ( $\eta$ ), respectively.

### 2.2 $^2H$ -NMR spectra

All NMR spectra were registered using a Bruker Avance 400 NMR spectrometer, located at the Universidad de Santiago de Chile, employing a broadband probe tuned to 61.425 MHz. The  $^2H$  90° pulse was 19  $\mu s$  long and more than 1000 transients from a spectral window of 40 kHz were accumulated in 32 kB files.  $T_1$  were obtained using the standard T1IR experiment.

### 2.3 Polarized light microscopy (PLM) and kinematic viscosity ( $\eta$ )

A Motic series B microscope equipped with crossed polarizers was used to obtain the textures. To orient the aggregates, the samples were mounted in a concave glass microscope and exposed to a 1.4 T magnet for 15 minutes; more time in the magnet did not modify the textures. Photographs were obtained at 300 K, along the direction of the field, with a 20-fold magnification, from the center of the concavity, to assure that all textures arise from the same sample thickness.

Kinematic viscosities of the solutions,  $\eta$ , were measured using a standard Ubbelohde viscometer at 298 K and 1 atmosphere.

### 2.4 Transmission electron microscopy

TEM images were collected with a JEOL JEM-1400PLUS instrument operating at 120 kV, using carbon coated 400 square mesh copper grids. Samples were drop casted onto the TEM grids. All TEM images were obtained in conditions identical to those previously reported.<sup>5</sup>

### 2.5 Molecular dynamics calculations

The GROMACS package 4.5.3 was used to calculate the molecular dynamics trajectories, and most of the analyses of this work were carried out using our own code. The integration time step was 4 fs. van der Waals forces were simulated using the Lennard-Jones potential (LJ), and electrostatic interactions were calculated with the particle mesh Ewald (PME) method.<sup>6,7</sup> In both cases, a cut-off of 1.2 nm was employed. The bond lengths were restrained using LINCS.<sup>8</sup> All simulations were carried out in an NPT ensemble at 300 K and 1 atm, coupled to weak temperature and pressure bath algorithms,<sup>9</sup> with time constants of 0.1 ps and 1 ps for temperature and pressure, respectively. The Ryckaert–Bellemans potential<sup>10</sup> was used in all torsions along the aliphatic chains, for a better reproduction of *cis-trans* transitions. Simple point charge (SPC)<sup>11</sup> was the water model considered in all simulations. Atom numeration and charge distribution, can be found elsewhere.<sup>5</sup>

Finally, since most properties of the aggregate depend on the surface charge from  $TTA^+$ , a series of calculations employing previously reported trajectories of different systems were performed. The calculated trajectories correspond to experimental samples containing 0.2253 g ml<sup>-1</sup> TTAC (system 1), 0.295 g ml<sup>-1</sup> TTAC (system 2) and 0.2253 g ml<sup>-1</sup> TTAC including 1 M NaCl (system 3).

## 3 Results and discussion

### 3.1 Interface composition

In order to modify the composition of the interface, PL, DeOH and NaCl contents were modified and the splittings from DeOH- $\alpha$ - $d_2$  and DHO measured. The results of these experiments are displayed in Fig. 1 of the ESI.† These experiments were performed mainly to locate the compositions at which the characteristic spectrum of the nematic anisotropic liquid crystal is lost, an unequivocal sign that the mesophase was destroyed. Once these limits had been identified, samples representative of the different nematic mesophases found were prepared incorporating SDS- $d_{25}$ , to probe the order and dynamics not only at the interface but also towards the interior of the hydrophobic core.<sup>12</sup> Fig. 1 shows the  $^2H$ -NMR spectra from SDS- $d_{25}$  and DHO, Fig. 2 displays the PLM textures and Fig. 3 corresponds to TEM images arising from selected samples. Fig. 1A, 2A and 3A were reproduced from a previous work.<sup>5</sup> Measured values of  $\Delta\nu_q$  and  $T_1$  from SDS- $d_{25}$  and DHO are



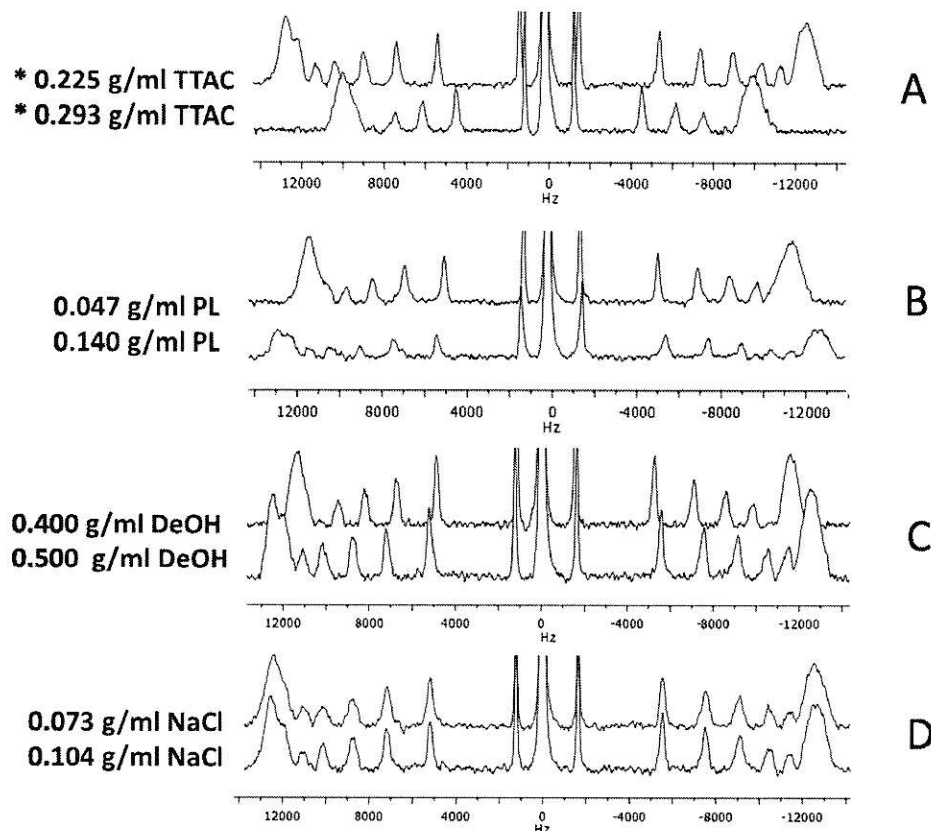


Fig. 1  $^2\text{H}$ -NMR spectra from SDS- $\text{d}_{25}$  and DHO of selected samples. \*Previously reported results.<sup>5</sup>

presented in Table 1, and values of  $\eta$  for these samples are listed in Table 2.

An inspection of Table 1 reveals that, as expected,  $\Delta\nu_q$  is greater for the first  $\text{CD}_2$  of the chain and decreases towards the interior of the bilayer. It is also observed that increasing either the content of PL or DeOH has the same effect on the  $\Delta\nu_q$  and  $T_1$  of SDS- $\text{d}_{25}$ ; the first increases and the second decreases for all deuterium atoms towards the interior of the aggregate. This indicates that the degree of alignment of the aliphatic chains with the magnetic field increases and, consequently, their re-orientational dynamics becomes slower. This trend is opposite to that observed when increasing TTAC,<sup>5</sup> and is very likely to arise from charge screening and spacing effects experienced by the  $\text{TTA}^+$  head-groups present at the interface when increasing the concentration of non-charged amphiphiles.

On the other hand, from Table 2 it is observed that augmenting the content of either PL or DeOH decreases  $\eta$  by about an order of magnitude in both cases. This is presumably because the aggregates become smaller. In effect, an increase of either DeOH or PL appears to be equivalent to a decrease in TTAC content, which in accordance with previous results,<sup>5</sup> decreases the size of the aggregate. This makes sense if we observe that  $\Delta\nu_q$  from DHO increases in both cases. Decreasing the aggregate's size generates a greater interfacial volume, able to accommodate more oriented solvent molecules, increasing the observed DHO splitting. An inspection of Table 1 reveals that the increase in DHO splitting is 20.4 Hz for PL and only 1

Hz for DeOH. Calculated radial distribution functions for the solvation of all head-groups (see Section 3.3) show that solvation capability of PL is greater than for DeOH. Effectively, the ratio between the first solvation layer of (DOPC + POPE)/DeOH is 2.1, supporting this interpretation.

Increasing the ionic strength does not affect significantly the order and dynamics of the amphiphiles.<sup>5</sup> Despite the above,  $\eta$  decreased to almost one third of the original value with the increase in NaCl, presumably because of a size decrease. A plausible explanation arises from the forces involved in the aggregation process. The higher screening of charges at the interface, at higher ionic strength, allows smaller aggregates to form, since less aliphatic chain association is necessary to balance the electrostatic repulsions.

As previously reported,<sup>5</sup> a TTAC increment of 30% w/w leads to significant differences in the SDS- $\text{d}_{25}$   $^2\text{H}$ -NMR spectrum and solution  $\eta$ . These observations were explained because higher surface charge density from  $\text{TTA}^+$  increased repulsions among the head-groups, incrementing the mobility, decreasing the alignment and modifying the values of  $\Delta\nu_q$  and  $T_1$ . However, to explain the unusual  $\eta$  increment, another phenomenon, related to modifications in the size and structure of the aggregate itself, going from circular mono-axial to larger elliptic bi-axial, was invoked.

PLM images from selected samples (Fig. 2) shows the appearance of the same images observed when modifying TTAC content,<sup>5</sup> oily streaks and schlieren textures, an indication that



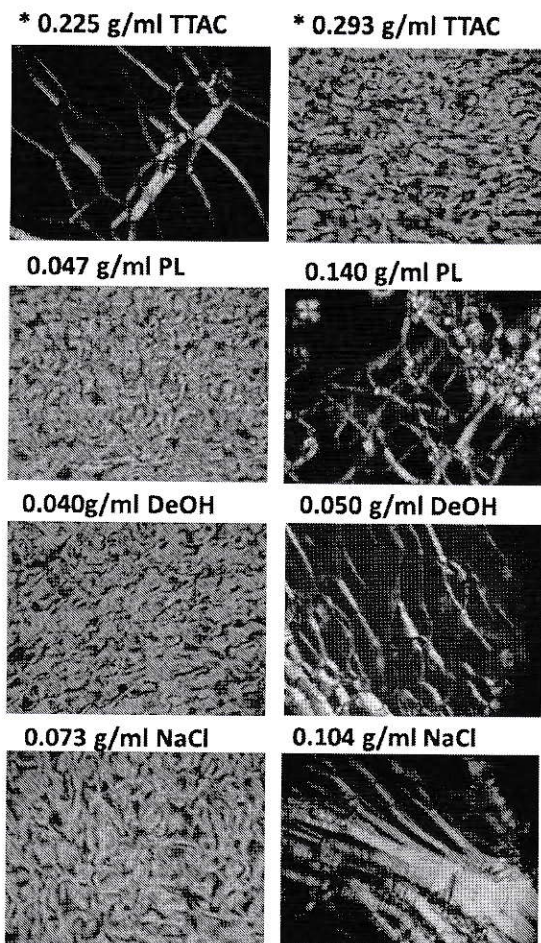


Fig. 2 PLM textures of selected samples. \*Previously published results.<sup>5</sup>

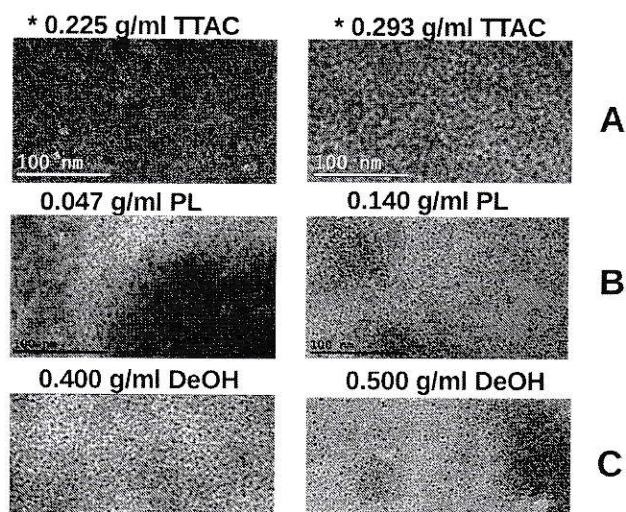


Fig. 3 TEM images of selected samples. \*Previously published results.<sup>5</sup>

the previously observed phase transitions are also occurring with variations in the content of the other components of the aggregate. Previously we concluded that this corresponded to structural changes preserving the bilayer arrangement and

nematic character, as evidenced by the  $^2\text{H-NMR}$  spectra. The oily streak texture is characteristic of homeotropic order, more likely to be found in smaller and better aligned aggregates, but is more usually observed in lamellar phases. Schlieren textures are usually found in nematic mesophases.<sup>13</sup> Despite the similarities observed, there is an obvious difference appreciated in Fig. 2: schlieren textures appear at low concentrations of either PL or DeOH, however at higher concentrations oily streaks appear. This order is reversed in the case of TTAC. This observation reveals that it is effectively the surface charge density, *i.e.* the content of  $\text{TTA}^+$ , which controls the morphology of the aggregates, since increasing the concentration of either PL or DeOH appears to be equivalent to decreasing the concentration of  $\text{TTA}^+$ , inducing the same phase transitions observed before. To provide more experimental evidence of these changes, TEM images of the selected compositions were obtained and they are displayed in Fig. 3. It is possible to observe similar images to those previously obtained when modifying TTAC content, but in reverse order, corroborating the previous hypothesis.

Since many properties of the aggregate are mostly dependent on the surface charge of TTAC, a detailed theoretical study using previously reported MD trajectories<sup>5</sup> is presented below. As mentioned before, in these simulations a variation in TTAC concentration and ionic strength were introduced. Therefore, the following study is oriented to explore surface charge effects on the bilayer itself, and to reveal how the charge and distance from the surface affect some dynamic properties of the solvent, such as the translational diffusion coefficient, rotational correlation time and ion hydration.

### 3.2 Rotational dynamics of water

To obtain information on the rotational dynamics of the water electric dipole moment near the liquid crystal interface, rotational correlation times at different distances from the center of the bilayer were estimated, defining parallel planes of equal thickness at different distances from the interface. Once the thickness of this planes was defined, rotational correlation times were calculated on the basis that each solvent molecule can be assigned to different slabs. To do this, the 200 ns trajectory length was split into sub-trajectories of 20 ps each and the correlation time calculated in each slice. Therefore, from a single trajectory the values going from the interface to the aqueous solution were calculated for systems 1, 2 and 3.

In general, water dipole moment re-orientational dynamics can be described by the rotational correlation function which can be formulated in terms of the first Legendre polynomial:

$$\langle P_1(t) \rangle = \langle \vec{\mu}(0) \cdot \vec{\mu}(t) \rangle, \quad (1)$$

where  $\vec{\mu}(0)$  and  $\vec{\mu}(t)$  correspond to the water dipole moment orientation separated by a time interval  $t$ .

$\langle P_1(t) \rangle$  can be fitted to a multi-exponential function, as follows:

$$\langle P_1(t) \rangle = \sum_{i=1}^3 a_i e^{-t/\tau_i}, \quad (2)$$



**Table 1** Experimental values of  $^2\text{H}$ -NMR quadrupole splittings ( $\Delta\nu_q$ , Hz) and longitudinal relaxation time ( $T_1$ , ms) of SDS- $d_{25}$  and DHO from selected samples. \*Previously reported results<sup>5</sup>

Carbon	*0.225 g ml <sup>-1</sup> TTAC		*0.293 g ml <sup>-1</sup> TTAC		0.047 g ml <sup>-1</sup> PL		0.140 g ml <sup>-1</sup> PL	
	$\Delta\nu_q$ /Hz	$T_1$ /ms	$\Delta\nu_q$ /Hz	$T_1$ /ms	$\Delta\nu_q$ /Hz	$T_1$ /ms	$\Delta\nu_q$ /Hz	$T_1$ /ms
1	25 371	34.2	20 153	45.9	22 966	40.4	25 792	35.4
2	25 371	34.2	20 153	45.9	22 966	40.4	25 792	35.4
3	25 371	34.2	20 153	45.9	22 966	40.4	25 792	35.4
4	25 371	34.2	20 153	45.9	22 966	40.4	25 792	35.4
5	25 371	34.2	20 153	45.9	22 966	40.4	25 792	35.4
6	25 371	34.2	20 153	45.9	22 966	40.4	25 792	35.4
7	22 734	36.7	20 153	45.9	22 966	40.4	22 812	38.7
8	20 750	50.2	17 386	45.9	19 432	66.9	20 988	43.3
9	18 016	61.5	15 054	69.5	16 907	76.3	18 101	56.2
10	14 815	81.9	12 371	186.8	13 890	94.7	14 919	71.7
11	10 852	112.4	9046	120.4	10 106	125.6	10 893	103.4
12	2889	308.3	2383	309.9	2635	352.1	28 885	289.4
DHO	18.8	338.9	28.7	317.7	5.8	365.5	26.2	331.4

Carbon	0.040 g ml <sup>-1</sup> DeOH		0.050 g ml <sup>-1</sup> DeOH		0.073 g ml <sup>-1</sup> NaCl		*0.104 g ml <sup>-1</sup> NaCl	
	$\Delta\nu_q$ /Hz	$T_1$ /ms	$\Delta\nu_q$ /Hz	$T_1$ /ms	$\Delta\nu_q$ /Hz	$T_1$ /ms	$\Delta\nu_q$ /Hz	$T_1$ /ms
1	23 142	37.9	25 269	33.4	24 983	34.6	25 232	31.1
2	23 142	37.9	25 269	33.4	24 983	34.6	25 232	31.1
3	23 142	37.9	25 269	33.4	25 232	34.6	25 232	31.1
4	23 142	37.9	25 269	33.4	24 983	34.6	25 232	31.1
5	23 142	37.9	25 269	33.4	24 983	34.6	25 232	31.1
6	23 142	37.9	25 269	33.4	24 983	34.6	24 489	31.1
7	21 182	41.2	22 482	33.9	22 468	33.5	22 564	36.7
8	20 988	54.6	20 714	41.9	20 562	50.3	20 663	42.2
9	18 101	59.0	17 980	56.1	17 831	58.5	17 951	52.1
10	14 919	75.3	14 779	69.2	14 689	80.3	14 710	70.0
11	10 893	111.9	10 809	109.1	10 723	110.3	10 772	99.1
12	2888	289.5	2883	313.2	2865	307.4	2854	294.4
DHO	23.5	337.0	24.5	339.5	28.1	329.8	18.9	334.8

**Table 2** Kinematic viscosity of selected samples. \*Previously reported results<sup>5</sup>

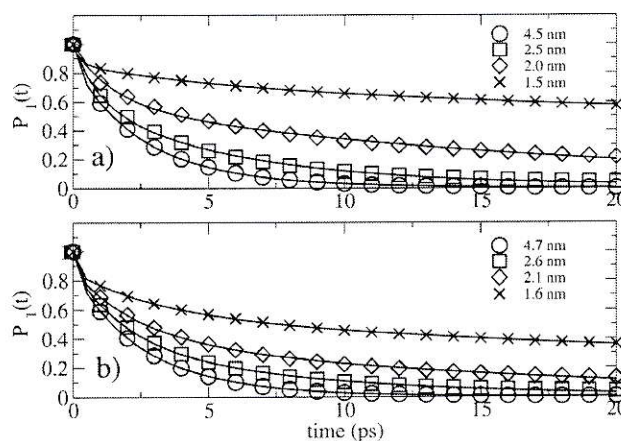
Sample	Viscosity/mPa s
*0.225 g ml <sup>-1</sup> TTAC	12.9 ± 0.1
*0.293 g ml <sup>-1</sup> TTAC	31.0 ± 4
0.047 g ml <sup>-1</sup> PL	106.7 ± 0.8
0.140 g ml <sup>-1</sup> PL	8.0 ± 0.2
0.040 g ml <sup>-1</sup> DeOH	59.8 ± 0.4
0.050 g ml <sup>-1</sup> DeOH	7.7 ± 0.1
0.073 g ml <sup>-1</sup> NaCl	29.5 ± 0.2
*0.104 g ml <sup>-1</sup> NaCl	10.3 ± 0.1

here  $a_i$  and  $\tau_i$  correspond to different amplitudes and relaxation times associated with water dipole reorientation.

Since  $a_i$  and  $\tau_i$  are not single valued, a  $\tau_{\text{eff}}$ , independent of the fit, must be defined. Thus,  $\tau_{\text{eff}}$  is defined as follows:<sup>14</sup>

$$\tau_{\text{eff}} = \frac{\sum_{i=1}^3 a_i \tau_i}{\sum_{i=1}^3 a_i} \quad (3)$$

Fig. 4 shows the best fit of  $\langle P_1(t) \rangle$  as a function of time for different distances from the center of the bilayer in systems 1 and 2. Thus, from the multi-exponential fit just described, a  $\tau_{\text{eff}}$  at different distances from the interface can be calculated. Fig. 5



**Fig. 4**  $\langle P_1(t) \rangle$ , as a function of time for (a) system 1 and (b) system 2 at different distances from the center of the bilayer aggregate. Points represent the values obtained from simulation, and solid lines the regression obtained from the multi-exponential fit.



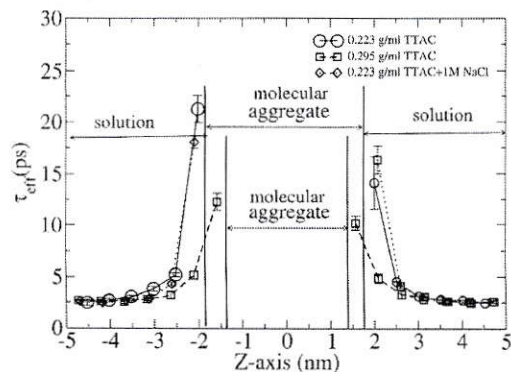


Fig. 5 Relaxation time of water dipole moment for the three studied cases, as a function of the distance from the center of the bilayer,  $Z = 0$ .

displays  $\tau_{\text{eff}}$  of the water dipole moment for systems 1, 2 and 3 as a function of the distance from the center of the bilayer, and shows how it abruptly increases when water approaches the interface. This is due to the fact that water at the interface coordinates the head-group atoms of PL and TTAC, introducing mobility restrictions. From this Figure, we observe how  $\tau_{\text{eff}}$  decreases by roughly one order of magnitude when going from the interface to the bulk aqueous solution. However, for the case corresponding to system 2, this increase is less noticeable than in system 1. This decrease in  $\tau_{\text{eff}}$  with the increase in TTAC content is associated with the relative decrease in PL content, since water coordinates preferentially to PL. Hence, a relative decrease in PL content is reflected by a decrease in  $\tau_{\text{eff}}$  as well. System 3 shows a similar behavior to system 1.

To assure that the simulations provide a good representation of the solvent dynamics,  $T_1$  measurements of DHO from samples 1, 2 and 3 were carried out and compared with values obtained from simulations. The Redfield theory relates  $T_1$  to the rotational correlation time and the electric field gradient experienced by the nucleus as follows:<sup>15</sup>

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{3}{80}\right) \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \left[\frac{2\pi eQ}{h} \frac{\partial^2 V}{\partial z^2}\right]^2 (J(\omega_0) + 4J(2\omega_0)), \quad (4)$$

where  $J(\omega_0)$  is the spectral density. Eqn (4) can be evaluated using  $\tau_{\text{eff}}$ , calculated above. The electric field gradient is axially symmetric along the O–D bond, ( $\eta = 0.00$ ), the term in square brackets is the quadrupole coupling constant in angular frequency units, 308 kHz for the O–D bond, and  $\omega_0$  is the Larmor frequency. Furthermore, assuming that the rotational correlation function is a single exponential decay, the value of  $T_1$  can be easily calculated.<sup>15</sup>  $T_1$  from DHO were measured and values of 339 ms, 318 ms and 334 ms were obtained for samples 1, 2 and 3 respectively. These values are in reasonable agreement with the values 290 ms, 265 ms and 270 ms estimated for bulk water in systems 1, 2 and 3, respectively. Therefore, the simulations appear to represent the solvent dynamics reasonably well.

### 3.3 Translational diffusion coefficient of water, $D_t$

Translational diffusion coefficient of water inside a slice in the  $xy$ -plane can be calculated from the mean square displacement as follows:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle r^2(t) \rangle = 2n \cdot D_t \cdot t, \quad (5)$$

where  $n$  is the number of degrees of freedom, 2 in this case,  $r^2$  is the square displacement parallel to the  $xy$ -plane and  $t$  is the time. To provide insights into the variations of water translational dynamics when going from the interface plane to the aqueous bulk solution,  $D_t$  at parallel planes of equal thickness from the interface were calculated using a methodology similar to that employed in Section 3.2. These results are displayed in Fig. 6. System 3 did not show differences with system 1 and is not included in the Figure.

Fig. 6 shows the calculated values of  $D_t$ , ranging from about  $1.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  near the interfaces to  $5.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , at the bulk of the aqueous phase. These values are in agreement with both experimental and simulation results. In bulk water,  $D_t = 7.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  has been reported from the SPC model,<sup>16</sup> and values ranging from  $2.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  to  $2.74 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  have been measured using  $^1\text{H-NMR}$ <sup>17</sup> and  $^2\text{H-NMR}$ .<sup>18</sup>

At deeper zones of the bilayer interface, the water self-diffusion coefficient becomes one fifth the value at the bulk aqueous solution. This decrease is mainly associated with the fact that near the interface, water molecules more resemble solvation water than free water. Furthermore, Fig. 6 also shows that there is an important decrease in the width of the hydrophobic core when increasing TTAC, which makes the profiles displayed in Fig. 6 significantly different. As previously observed,<sup>5</sup> this reduction has its origin in the inter-digitation of TTAC aliphatic chains when increasing TTAC content and is discussed in Section 3.5.

Besides, a study of water coordination around the atoms of PL, DeOH, and TTA<sup>+</sup> head-groups was performed. The radial distribution function,  $g(r)$  is defined by:

$$g(r) = \frac{N(r)}{4\pi r^2 \rho \partial r}, \quad (6)$$

here  $N(r)$  is the number of atoms in a spherical shell at distance  $r$  and thickness  $\partial r$ , and  $\rho$  is the macroscopic number density, taken as the ratio between the mass of all atoms and the volume

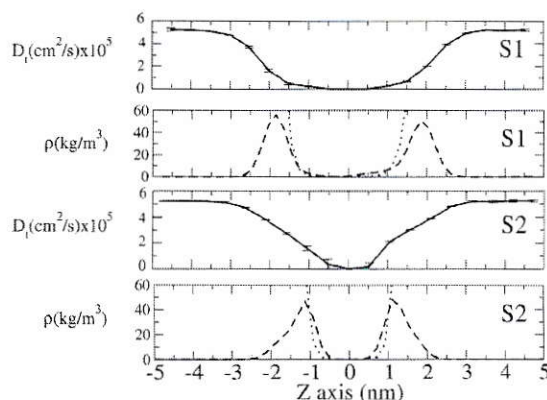


Fig. 6 Water translational diffusion coefficient,  $D_t$  (solid line), water density (dotted line) and TTAC nitrogen distribution (slash line), from bulk water to the interior of the bilayer. (S1) System 1, (S2) system 2.



of the simulation box. In effect, Fig. 7 shows some of these plots and is observed that water is mainly coordinating PL head-groups, and as a consequence, a decrease in the self diffusion coefficient of water in the vicinity of the interface is expected. The head groups of PL and DeOH in system 1 can hold 5.7 and 1.5 water molecules in the first solvation layer, respectively. These values, weighted by the mole fraction of each species, allowed us to estimate the relative degree of solvation. Therefore we can estimate the ratio between the solvation water of PL vs. DeOH to be 2.1. This explains the significant difference observed in the splitting of DHO when increasing either DeOH or PL.

### 3.4 Sodium and chloride hydration shell

Another aspect related to the stability of the liquid crystal is the structure of ions and the dehydration process when approaching the bilayer/solution interface. In this regard, a study on the solvation of sodium and chloride ions at different distances from the center of the bilayer, similar to that of Sections 3.2 and 3.3, has been performed. From integration of the radial distribution function of water around them, the hydration of these ions can be estimated at the previously defined slabs.

Fig. 8 shows the results of this study for sodium. Systems 1 and 2 give the same hydration number in the bulk aqueous solution,  $5.00 \pm 0.002$  and  $4.90 \pm 0.01$  respectively. These values agree with the hydration numbers of sodium ions measured by X-ray and from simulations, in which sodium hydration numbers in a range from 4 to 6 water molecules have been reported.<sup>19</sup> Fig. 8 also shows how in both cases, a dehydration of almost 50% takes place for the sodium ions, going from the bulk aqueous solution to the interface.

Fig. 9 shows the variation of the chloride hydration number from the bulk aqueous solution to the center of the bilayer, for systems 1 and 2. In bulk solution, hydration numbers of  $7.98 \pm 0.04$  and  $8.06 \pm 0.03$  were obtained for systems 1 and 2, respectively. These values agree with the experimental data measured by X-ray spectroscopy<sup>20</sup> and neutron diffraction,<sup>21–23</sup> as well as that calculated from simulations,<sup>19,24</sup> for which coordination numbers from 5.2 to 7.4 were measured. In all cases studied in this work, the counterions completely released

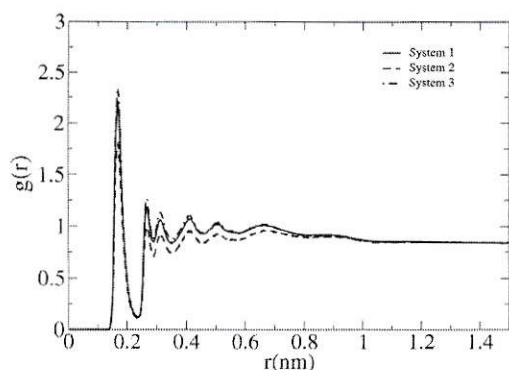


Fig. 7 Radial distribution function of water around the phosphate oxygen of DOPC corresponding to systems 1, 2 and 3.

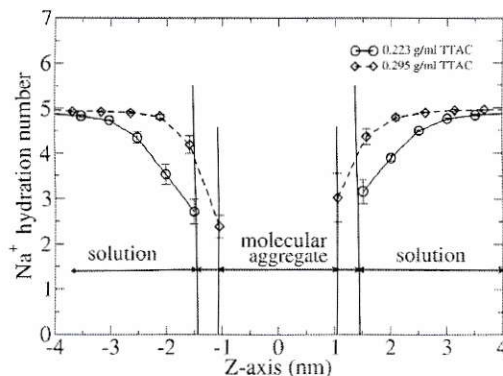


Fig. 8 Sodium hydration number from bulk water to deeper zones of the hydrophobic core for two bilayers, corresponding to systems 1 and 2.

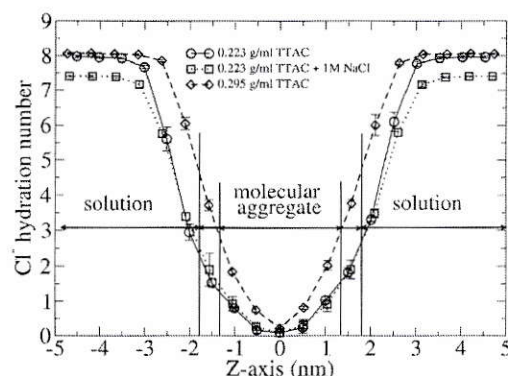


Fig. 9 Chloride hydration number from bulk water to the deepest zone of the hydrophobic core for systems 1 and 2.

their hydration shell when moving from bulk water towards the center of the bilayer. Effectively, a variation from 7 water molecules in the hydration state in bulk water to almost naked ions was estimated for chloride when embedded in the middle of the hydrophobic core. Furthermore, Fig. 9 also reproduces the reported experimental behavior in which the coordination number decreases with the increase in ionic strength.<sup>25</sup> Thus, from simulation, we obtained a 9% decrease in the chloride hydration number when the salt concentration increased to 1 M, following the same behavior as that reported by Cummings *et al.*,<sup>25</sup> in which a decrease of 11% was measured for the chloride hydration number with the increase in ionic strength. This significant decrease in the hydration shell of chloride ions is compensated by chloride coordination to the positive charges of  $\text{TTA}^+$ , as evidenced by the calculated radial distribution function of  $\text{Cl}^-$  around  $\text{TTA}^+$  (see Fig. 2 ESI†).

### 3.5 Bilayer structure

In this section we explore in more detail effects of TTAC content on the structure of the bilayer itself. In this regard, Fig. 10 shows the density profiles of  $\text{TTA}^+$  across the Z axis, perpendicular to the bilayer surface. It is observed that system 1 shows slightly overlapping hydrocarbon chains, as deduced from the valley



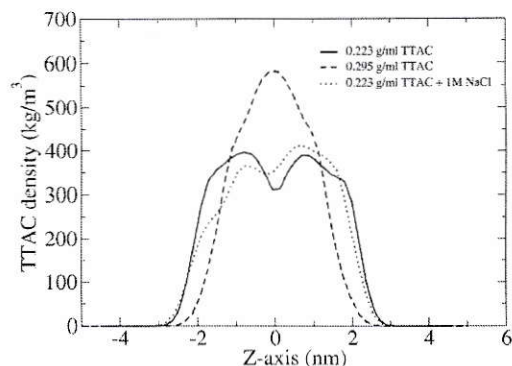


Fig. 10 TTAC density across the molecular aggregate for systems 1 and 2. The origin of the Z-axis was taken at the center of the bilayer.

located at the center of the plot. This profile contrast with that of system 2, in which a maximum in  $\text{TTA}^+$  density is observed at the center of the bilayer. Furthermore, system 2 displays a narrower profile. These observations clearly indicate that interdigitation of the aliphatic chains of  $\text{TTA}^+$  from both leaflets is occurring. This can be understood on the basis of electrostatic and Lennard-Jones interactions. Increasing TTAC content by 30% w/w produces an increment in the ammonium electrostatic repulsions, from  $113 \text{ kJ mol}^{-1}$  to  $312 \text{ kJ mol}^{-1}$ . This is compensated with a better compaction of the hydrocarbon chains, increasing  $\text{TTA}^+ - \text{TTA}^+$  Lennard-Jones attractions from  $-4157 \text{ kJ mol}^{-1}$  to  $-6460 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Furthermore, a visual inspection of the simulated bilayer interfaces reveals the formation of lipid rafts by phospholipid segregation. Fig. 11 shows a snapshot of system 1 after 160 ns simulation and is possible to distinguish the existence of clusters formed by PL only. To provide a thermodynamic explanation for the formation of lipid rafts, we have calculated the potential of mean force (PMF) corresponding to the insertion of DOPC into two ideal systems. Thus, in the first, the insertion of

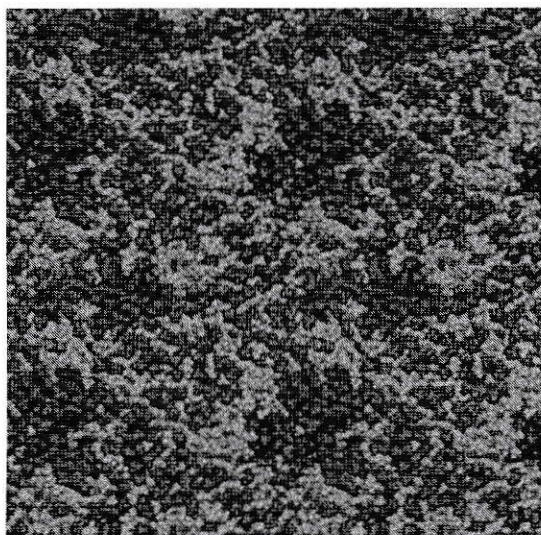


Fig. 11 Snapshot of the xy-plane of system 1 after 160 ns of trajectory. Darker areas correspond to clusters of lipids.

DOPC into a bilayer with a composition identical to system 1, except that all TTAC were removed, was simulated. In the second, DOPC was inserted into a bilayer of TTAC only. The PMF at different depths of the bilayer can be used to estimated the spontaneity of the insertion process in both ideal systems as follows:

$$\Delta G(z) = -RT \ln \frac{c_i(z)}{c_i^0} = \text{PMF}, \quad (7)$$

here  $\Delta G(z)$  is the difference between the free energy from the bulk aqueous solution to a certain position  $z$ , along an axis perpendicular to the bilayer interface.  $R$  is the gas constant,  $T$  the absolute temperature,  $c_i(z)$  the concentration of DOPC at position  $z$ , and  $c_i^0$  the concentration of DOPC in the bulk aqueous solution. Due to sampling incompleteness,  $c_i(z)$  profiles cannot be obtained straightforwardly from normal MD simulations, however, using Umbrella<sup>26</sup> and WHAM<sup>27</sup> methodologies, such as they have been described in previous works,<sup>14,28–30</sup> the PMF associated with the insertion of DOPC into the two systems proposed above was estimated. To improve the sampling, two DOPC molecules were introduced into the system, one placed at the bulk water, at a distance of  $-3.9 \text{ nm}$  from the center of the bilayer, and the other placed at the center of the hydrophobic core. Thus, both DOPC molecules were simultaneously shifted  $0.1 \text{ nm}$  each maintaining a distance of  $3.9 \text{ nm}$  between them. The motion of the center of mass of each molecule was subjected to a restrain along the Z axis using a harmonic potential of  $3000 \text{ N nm}^{-2} \text{ mol}^{-1}$ , within windows of  $0.1 \text{ nm}$  thick, but maintaining the freedom of movement in the  $xy$  plane. For each of the 40 subsystems, 30 ns of trajectory length was calculated.

Fig. 12 shows the PMF associated with the DOPC insertion from bulk water to the interior of the two models described above. This Figure evidences that for any distance along the Z axis, DOPC prefers to be surrounded by other DOPC molecules rather than by TTAC. Therefore, according with this result, the formation of lipid rafts in the aggregate is expected, since DOPC shows greater affinity than other phospholipid molecules. Finally, the formation of lipid rafts is favored by about  $5 \text{ kJ mol}^{-1}$  with respect to insertion in a  $\text{TTA}^+$  bilayer.

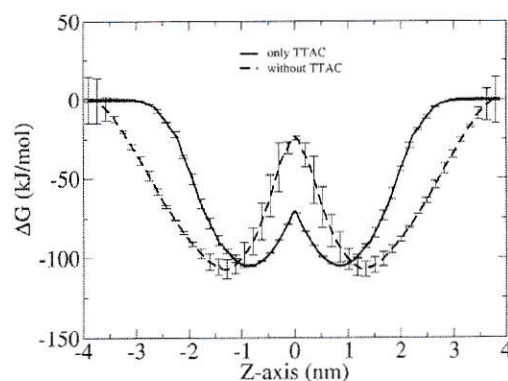


Fig. 12 Potential of mean force (PMF) associated with the insertion of DOPC from the bulk aqueous solution into the two molecular bilayers mentioned above.



## 4 Conclusions

The use of MD simulations in the interpretations of the experimental results arising from complex systems, such as lyotropic nematic liquid crystals, has proven to be very useful. In this particular case, the dynamics of the solvent appears to be adequately represented.

All evidence strongly suggests that the surface charge density, provided by TTA<sup>+</sup>, is responsible not only for the size and shape of the aggregates, but also has a strong influence in the structure of the bilayer itself, inducing inter-digitation and lipids rafts formation.

Dynamical properties of the solvent, such as translation diffusion coefficient and rotational correlation time, are strongly dependent on the surface charge density and the distance from the interface. This effects disappear at a distance of 3.5 nm away from the interface.

Finally, lipid rafts formation arises from a greater affinity between PL molecules rather than PL-TTA<sup>+</sup>.

## Acknowledgements

The authors are pleased to acknowledge financial support from Fondecyt-Chile (Grant No. 1150138). A. R. R. F. acknowledges a fellowship from Conicyt. The authors also acknowledge the Staff of the Computing Center at the Polytechnic University of Cartagena for their support and facilities. J. J. L. C. and F. G. D. B. acknowledge the financial support from Fundación Séneca (Grants No. 19353/PI/14 and 19499/PI/14, respectively). J. J. G. C. acknowledges the Ministry of Economy and Competitiveness for a Ramon y Cajal contract (#RyC-2014-14956).

## References

- 1 C. Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, J. Wiley, 2nd edn, 1980.
- 2 J. Moreno-Razo, E. Sambriski, N. Abbott, J. Hernandez-Ortiz and J. de Pablo, *Nature*, 2012, **485**, 86–89.
- 3 F. Biedermann, W. Nau and H. Schneider, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 11158–11171.
- 4 X. Wang, D. Miller, E. Bukusoglu, J. de Pablo and N. Abbott, *Nat. Mater.*, 2015, **15**, 106–112.
- 5 A. Ruiz-Fernández, J. López-Cascales, J. Giner-Casares, R. Araya-Maturana, F. Díaz-Baños, D. Muñoz-Gacitúa and B. Weiss-López, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 7455–7464.
- 6 T. Darden, D. York and L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 10089–10092.
- 7 U. Essmann, L. Perera, M. Berkowitz, T. Darden, H. Lee and L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, 1995, **103**, 8577–8593.
- 8 B. Hess, H. Bekker, H. Berendsen and J. Fraaije, *J. Comput. Chem.*, 1997, **18**, 1463–1472.
- 9 H. Berendsen, J. Postma, W. van Gunsteren, A. DiNola and J. Haak, *J. Chem. Phys.*, 1984, **81**, 3684–3690.
- 10 J. Ryckaert and A. Bellemans, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 1978, **66**, 95–106.
- 11 H. Berendsen, J. Postma, W. van Gunsteren and J. Hermans, *Intermolecular Forces*, D. Reidel Publishing Company, 1981.
- 12 M. F. Brown, *J. Magn. Reson.*, 1979, **35**, 203–215.
- 13 H. Stegemeyer and H. Behret, *Liquid Crystals*, Steinkopff, 1994.
- 14 V. E. Bahamonde-Padilla, J. J. López-Cascales, R. Araya-Maturana, M. Martínez-Cifuentes and B. E. Weiss López, *ChemPhysChem*, 2014, **15**, 1422–1431.
- 15 A. Abragam, *Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, 2011, p. 314.
- 16 J. López Cascales, J. García de la Torre, S. Marrink and H. Berendsen, *J. Chem. Phys.*, 1996, **104**, 2713–2720.
- 17 D. O'Reilly, *J. Chem. Phys.*, 1974, **60**, 1607–1618.
- 18 K. Tanaka, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1975, **71**, 1127–1131.
- 19 J. Chandrasekhar, D. Spellmeyer and W. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 903–910.
- 20 N. Skipper, S. Cumming, G. Neilson and J. Enderby, *Nature*, 1986, **321**, 52–53.
- 21 M. Yamagami, H. Wakita and T. Yamaguchi, *J. Chem. Phys.*, 1995, **103**, 8174–8178.
- 22 D. Powell, A. Barnes, J. Enderby, G. Neilson and P. Salmon, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 1988, **85**, 137–146.
- 23 D. Powell, G. Neilson and J. Enderby, *J. Phys.: Condens. Matter*, 1993, **5**, 5723–5730.
- 24 J. López Cascales and T. Otero, *J. Chem. Phys.*, 2004, **120**, 1951–1957.
- 25 S. Cummings, J. Enderby, G. Neilson, J. Newsome, R. Howe, W. Howells and A. Soper, *Nature*, 1980, **287**, 714–716.
- 26 G. Torrie and J. Valleau, *J. Comput. Phys.*, 1977, **23**, 187–199.
- 27 S. Kumar, D. Bouzida, R. Swensen, P. Kollman and J. Rosemberg, *J. Comput. Chem.*, 1992, **13**, 1011–1021.
- 28 J. L. MacCallum and D. P. Tieleman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 125–130.
- 29 J. Maccallum, W. Drew Bennett and D. Tieleman, *J. Gen. Physiol.*, 2007, **129**, 371–377.
- 30 J. Lopez Cascales, S. D. Oliveira Costa and R. Porasso, *J. Chem. Phys.*, 2011, **135**, 135103–135110.

## Referencias

- [1] K. Jacobson, E. D. Sheets y R. Simson, *Science* **268**, 1441 (1995).
- [2] H. Lodish, *Molecular Cell Biology* (Macmillan, 2008).
- [3] G. Van Meer, D. R. Voelker y G. W. Feigenson, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 112 (2008).
- [4] P. F. Devaux y R. Morris, *Traffic* **5**, 241 (2004).
- [5] P. F. Devaux y M. Seigneuret, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **822**, 63 (1985).
- [6] L. Fagerberg, K. Jonasson, G. von Heijne, M. Uhlén y L. Berglund, *Proteomics* **10**, 1141 (2010).
- [7] M. Birnbaumer, *Archives of Medical Research* **30**, 465 (1999).
- [8] L. Gillet, S. Roger, M. Potier, L. Brisson, C. Vandier, P. Besson, J.-Y. Le Guennec et al., *Frontiers in Medicinal Chemistry* **5**, 234 (2010).
- [9] G. G. Warr, F. Grieser y D. F. Evans, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* **82**, 1829 (1986).
- [10] E. Wallin y G. V. Heijne, *Protein Science* **7**, 1029 (1998).

- [11] S. White, URL [http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane\\_Proteins\\_xtal.html](http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html) (2009).
- [12] S. J. Opella, *Nature Structural Biology* **4**, 845 (1997).
- [13] N. K. Goto y L. E. Kay, *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 585 (2000).
- [14] M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. M. Ono y P. GÅžntert, *Nature* **440**, 52 (2006).
- [15] A. Abdine, M. A. Verhoeven, K.-H. Park, A. Ghazi, E. Guittet, C. Berrier, C. Van Heijenoort y D. E. Warschawski, *Journal of Magnetic Resonance* **204**, 155 (2010).
- [16] T. Imae, R. Kamiya y S. Ikeda, *Journal of Colloid and Interface Science* **108**, 215 (1985).
- [17] A. Nesrullajev, F. Tepehan y N. Kazanci, *Materials Chemistry and Physics* **73**, 74 (2002).
- [18] G. Colafemmina, R. Recchia, A. S. Ferrante, S. Amin y G. Palazzo, *The Journal of Physical Chemistry B* **114**, 7250 (2010).
- [19] T. Yıldız y N. Kazanci, *Journal of Molecular Structure* **886**, 158 (2008).
- [20] R. Montecinos, H. Ahumada, R. Araya-Maturana, A. F. Olea y B. E. Weiss-López, *Journal of Colloid and Interface Science* **316**, 126 (2007).
- [21] O. S. Andersen y R. E. Koeppe, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 107 (2007).
- [22] M. Carrillo-Tripp y S. E. Feller, *Biochemistry* **44**, 10164 (2005).



- [23] H. Hong y L. K. Tamm, Proceedings of the National Academy of Sciences **101**, 4065 (2004).
- [24] M. R. de Planque, E. Goormaghtigh, D. V. Greathouse, R. E. Koeppe, J. A. Kruijtzter, R. M. Liskamp, B. de Kruijff y J. A. Killian, Biochemistry **40**, 5000 (2001).
- [25] A. G. Lee, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1666**, 62 (2004).
- [26] M. R. de Planque y J. A. Killian, Molecular Membrane Biology **20**, 271 (2003).
- [27] B. Alder y T. Wainwright, The Journal of Chemical Physics **27**, 1208 (1957).
- [28] B. J. Alder y T. Wainwright, The Journal of Chemical Physics **31**, 459 (1959).
- [29] A. Rahman, Physical Review **136**, A405 (1964).
- [30] F. H. Stillinger y A. Rahman, The Journal of Chemical Physics **60**, 1545 (1974).
- [31] F. Khalili-Araghi, J. Gumbart, P.-C. Wen, M. Sotomayor, E. Tajkhorshid y K. Schulten, Current Opinion in Structural Biology **19**, 128 (2009).
- [32] P. J. Stansfeld y M. S. Sansom, Structure **19**, 1562 (2011).
- [33] R. O. Dror, R. M. Dirks, J. Grossman, H. Xu y D. E. Shaw, Annual Review of Biophysics **41**, 429 (2012).
- [34] Z. Cournia, T. W. Allen, I. Andricioaei, B. Antonny, D. Baum, G. Brannigan, N.-V. Buchete, J. T. Deckman, L. Delemotte, C. del Val et al., The Journal of Membrane Biology **248**, 611 (2015).
- [35] K. Arora y C. L. Brooks Iii, Journal of the American Chemical Society **131**, 5642 (2009).

- [36] J. I. Sułkowska, J. K. Noel y J. N. Onuchic, Proceedings of the National Academy of Sciences **109**, 17783 (2012).
- [37] K. Nam, J. Pu y M. Karplus, Proceedings of the National Academy of Sciences **111**, 17851 (2014).
- [38] R. L. Hayes, J. K. Noel, U. Mohanty, P. C. Whitford, S. P. Hennelly, J. N. Onuchic y K. Y. Sanbonmatsu, Journal of the American Chemical Society **134**, 12043 (2012).
- [39] A. Yildirim, M. Sharma, B. M. Varner, L. Fang y M. Feig, The Journal of Physical Chemistry B **118**, 10874 (2014).
- [40] J. Panecka, M. Havrila, K. Réblová, J. Sponer y J. Trylska, The Journal of Physical Chemistry B **118**, 6687 (2014).
- [41] V. Gapsys, B. L. de Groot y R. Briones, Journal of Computer-aided Molecular Design **27**, 845 (2013).
- [42] H. I. Ingolfsson, M. N. Melo, F. J. van Eerden, C. Arnarez, C. A. Lopez, T. A. Wassenaar, X. Periole, A. H. de Vries, D. P. Tieleman y S. J. Marrink, Journal of the American Chemical Society **136**, 14554 (2014).
- [43] Z. A. Levine, R. M. Venable, M. C. Watson, M. G. Lerner, J.-E. Shea, R. W. Pastor y F. L. Brown, Journal of the American Chemical Society **136**, 13582 (2014).
- [44] A. J. Sodt, M. L. Sandar, K. Gawrisch, R. W. Pastor y E. Lyman, Journal of the American Chemical Society **136**, 725 (2014).
- [45] R. Kadirvelraj, O. C. Grant, I. J. Goldstein, H. C. Winter, H. Tateno, E. Fadda y R. J. Woods, Glycobiology **21**, 973 (2011).

- [46] W. Nishima, N. Miyashita, Y. Yamaguchi, Y. Sugita y S. Re, *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 8504 (2012).
- [47] H. S. Lee, Y. Qi y W. Im, *Scientific Reports* **5** (2015).
- [48] S.-J. Marrink y H. J. Berendsen, *The Journal of Physical Chemistry* **98**, 4155 (1994).
- [49] S. E. Feller, R. M. Venable y R. W. Pastor, *Langmuir* **13**, 6555 (1997).
- [50] P. B. Moore, C. F. Lopez y M. L. Klein, *Biophysical Journal* **81**, 2484 (2001).
- [51] E. L. Wu, P. J. Fleming, M. S. Yeom, G. Widmalm, J. B. Klauda, K. G. Fleming y W. Im, *Biophysical Journal* **106**, 2493 (2014).
- [52] E. L. Wu, Y. Qi, S. Park, S. S. Mallajosyula, A. D. MacKerell, J. B. Klauda y W. Im, *Biophysical Journal* **109**, 2090 (2015).
- [53] A. Grossfield, M. C. Pitman, S. E. Feller, O. Soubias y K. Gawrisch, *Journal of Molecular Biology* **381**, 478 (2008).
- [54] R. O. Dror, D. H. Arlow, D. W. Borhani, M. Ø. Jensen, S. Piana y D. E. Shaw, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 4689 (2009).
- [55] T. Darden, D. York y L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **98**, 10089 (1993).
- [56] U. Essmann, L. Perera, M. Berkowitz, T. Darden, H. Lee y L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **103**, 8577 (1995).
- [57] B. Hess, H. Bekker, H. Berendsen y J. Fraaije, *J. Comput. Chem.* **18**, 1463 (1997).
- [58] H. Berendsen, J. Postma, W. van Gunsteren, A. DiNola y J. Haak, *J. Chem. Phys.* **81**, 3684 (1984).



- [59] J. Ryckaert y A. Bellemans, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **66**, 95 (1978).
- [60] V. Bahamonde-Padilla, J. Espinoza, B. Weiss-Lopez, J. L. Cascales, R. Montecinos y R. Araya-Maturana, *J. Chem. Phys.* **139**, 14703 (2013).
- [61] N. Schmid, A. Eichenberger, M. Winger, A. Mark y W. van Gunsteren, *Eur. Biophys. J.* **7**, 843 (2011).
- [62] J. Pople y G. Segal, *J. Chem. Phys.* **44**, 3289 (1966).
- [63] B. Jonsson, O. Edholm y O. Teleman, *J. Chem. Phys.* **85**, 2259 (1986).
- [64] E. Egberts, S. Marrink y H. Berendsen, *Eur. Biophys. J. Biophys.* **22**, 423 (1994).
- [65] P. Ahlstrom y H. Berendsen, *J. Phys. Chem.* **97**, 13691 (1993).
- [66] J. Lopez Cascales, J. De la Torre, S. Marrink y H. Berendsen, *J. Chem. Phys.* **104**, 2713 (1996).
- [67] P. David, W. van Gunsteren y A. Mark, *J. Comput. Chem.* **31**, 1117 (2010).
- [68] T. Heinz, W. van Gunsteren y P. Hunenberger, *J. Chem. Phys.* **115**, 1125 (2001).
- [69] H. Berendsen, J. Postma, W. van Gunsteren y J. Hermans, *Intermolecular Forces* (D. Reidel Publishing Company, 1981).
- [70] G. Raffard, S. Steinbruckner, A. Arnold, J. H. Davis y E. J. Dufourc, *Langmuir* **16**, 7655 (2000).
- [71] L. S. Vermeer, B. L. De Groot, V. Réat, A. Milon y J. Czaplicki, *Eur. Biophys. J.* **36**, 919 (2007).
- [72] M. Bloom, J. H. Davis y A. L. Mackay, *Chem. Phys. Lett.* **80**, 198 (1981).

- [73] K. Merz, B. Roux y B. Membranes, *A Molecular Perspective from Computation and Experiment* (Birkhäuser, Boston, 1996).
- [74] M. Brown, R. Thurmond, S. Dodd, D. Otten y K. Beyer, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8471 (2002).
- [75] H. Stegemeyer y H. Behret, *Liquid Crystals*, Topics in Physical Chemistry (Steinkopff, 1994).
- [76] A. A. de Melo Filho, A. Laverde y F. Y. Fujiwara, *Langmuir* **19**, 1127 (2003).
- [77] M. F. Brown, *Journal of Magnetic Resonance* (1969) **35**, 203 (1979).
- [78] E. Roelants, E. Geladé, J. Smid y F. De Schryver, *Journal of Colloid and Interface Science* **107**, 337 (1985).
- [79] M. Cates y S. Candau, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2**, 6869 (1990).
- [80] M. Orsi, D. Haubertin, W. Sanderson y J. Essex, *J. Phys. Chem. B.* **112**, 802 (2008).
- [81] N. Chu, N. Kucerka, Y. Liu, S. Tristram-Nagle y J. Nagle, *Phys. Rev. E.* **71**, 71.041904 (2005).
- [82] W. Rawicz, K. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham y E. Evans, *Biophys. J.* **79**, 328 (2000).
- [83] H. Petrache, S. Tristram-Nagle, K. Gawrisch, D. Harries, V. Parseguian y J. Nagle, *Biophys. J.* **86**, 1574 (2004).
- [84] J. Pan, S. Tristram-Nagle, N. Kucerka y J. Nagle, *Biophys. J.* **94**, 117 (2008).
- [85] H. Seto, N. Yamada, M. Nagao, M. Hishida y T. Takeda, *Eur. Phys. J. E.* **26**, 217 (2008).

- [86] J. J. L. Cascales, S. O. Costa, A. Garro y R. Enriz, *RSC Advances* **2**, 11743 (2012).
- [87] O. Solomon y I. Ciută, *Journal of Applied Polymer Science* **6**, 683 (1962).
- [88] R. Pamies, J. H. Cifre, M. L. Martínez y J. De la Torre, *Colloid Polym Sci* **286**, 1223 (2008).
- [89] H. Elias, *Macromolecules: structure and properties.*, Vol. 1 (Plenum Press, 194).
- [90] S. Harding, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **68**, 207 (1997).
- [91] J. De la Torre, S. Navarro, M. L. Martinez y J. L. Cascales, *Biohys. J.* **67**, 530 (1994).
- [92] A. Seelig y J. Seelig, *Biochemistry* **13**, 4839 (1974).
- [93] V. E. Bahamonde-Padilla, J. J. López-Cascales, R. Araya-Maturana, M. Martínez-Cifuentes y B. E. Weiss López, *ChemPhysChem* **15**, 1422 (2014).
- [94] A. Abragam, *Principles of Nuclear Magnetism* (Oxford University Press, 2011).
- [95] D. O'Reilly, *J. Chem. Phys.* **60**, 1607 (1974).
- [96] K. Tanaka, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **71**, 1127 (1974).
- [97] J. Chandrasekhar, D. Spellmeyer y W. Jorgensen, *J. Ame. Chem. Soc.* **106**, 903 (1984).
- [98] N. Skipper, S. Cumming, G. Neilson y J. Enderby, *Nature* **321**, 52 (1986).
- [99] M. Yamagami, H. Wakita y T. Yamaguchi, *J. Chem. Phys* **103**, 8174 (1995).
- [100] D. Powell, A. Barnes, J. Enderby, G. Neilson y P. Salmon, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **85**, 137 (1988).



- [101] D. Powell, G. Neilson y J. Enderby, *J. Phys. Condens. Matter* **5**, 5723 (1993).
- [102] J. Lopez Cascales y T. Otero, *J. Chem. Phys* **120**, 1951 (2004).
- [103] S. Cummings, J. Enderby, G. Neilson, J. Newsome, R. Howe, W. Howells y A. Soper, *Nature* **23**, 714 (1980).
- [104] G. Torrie y J. Valleau, *J. Comput. Phys.* **23**, 187 (1977).
- [105] S. Kumar, D. Bouzida, R. Swensen, P. Kollman y J. Rosemberg, *J. Comput. Chem.* **13**, 1011 (1992).
- [106] J. L. MacCallum y D. P. Tieleman, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 125 (2006).
- [107] J. Maccallum, W. Drew Bennett y D. Tieleman, *J. Gen. Physiol.* **129**, 371 (2007).
- [108] J. Lopez Cascales, S.D. Oliveira Costa y R. Porasso, *J. Chem. Phys.* **135**, 135103 (2011).
- [109] M. Kurth, C. H. Adler, M. S. Hilaire, C. Singer, C. Waters, P. LeWitt, D. Chernik, E. Dorflinger y K. Yoo, *Neurology* **48**, 81 (1997).
- [110] T. Kageyama, M. Nakamura, A. Matsuo, Y. Yamasaki, Y. Takakura, M. Hashida, Y. Kanai, M. Naito, T. Tsuruo, N. Minato et al., *Brain Research* **879**, 115 (2000).
- [111] N. C. C. for Chronic Conditions (UK et al. (2006).
- [112] P. Gomes y P. Soares-da Silva, *Brain Research* **829**, 143 (1999).